

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

Dottorato di ricerca in neuroscienze

Ciclo XX

**ARCHITETTONICA E CONNESSIONI DELLA  
CORTECCIA PREFRONTALE VENTROLATERALE  
CAUDALE DELLA SCIMMIA MACACA**

Coordinatore:

*Chiar.mo Prof. Vittorio Gallese*

Tutor:

*Chiar.mo Prof. Giuseppe Luppino*

Tesi di dottorato del dott. Marzio Gerbella

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

# **INDICE**

## **1. Introduzione Pag. 3**

1.1 Corteccia prefrontale nei mammiferi Pag. 3

1.2 Corteccia prefrontale laterale nel macaco Pag. 5

1.3 La corteccia prefrontale ventrolaterale VLPF caudale Pag. 6

## **2. Materiali e metodi Pag. 11**

2.1 Studio architettonico Pag. 12

2.2 Studio odologico Pag. 21

## **3. Risultati: Pag. 27**

3.1 Studio architettonico Pag. 27

3.2 Studio odologico Pag. 63

## **4. Discussione: Pag. 100**

4.1 Organizzazione architettonica della VLPF caudale Pag. 100

4.2 Connessioni corticali delle aree 45A e 45B Pag. 104

4.3 Distribuzione laminare della marcatura nelle aree 45A e 45B Pag. 107

4.4 Connessioni delle aree adiacenti alle aree 45B e 45A Pag. 108

4.5 Considerazioni funzionali Pag. 111

4.6 Conclusioni Pag. 114

## **5. Bibliografia: Pag. 116**

*Sicuramente la corteccia frontale non agisce da sola; tutto quello che fa lo fa in cooperazione con le altre corteccie, con le strutture subcorticali, con certi organi dell'apparato sensorio e motorio, con il sistema autonomo.*

*Essenzialmente ritengo che la corteccia prefrontale abbia un ruolo fondamentale nell'organizzazione temporale del comportamento perchè offre appoggio neuronale a tre funzioni cognitive indispensabili per il compimento di sequenze temporali, o "gestalt" di azioni: 1) memoria breve 2) attenzione motoria 3) controllo inibitorio o interferenza.*

Fuster 2001

# 1. Introduzione

## 1.1 Corteccia prefrontale nei mammiferi

Il nostro atteggiamento mentale, i nostri pensieri e, conseguentemente, i nostri comportamenti, possono essere efficacemente *modulati* sia in funzione del contesto in cui ci troviamo che sulla base di informazioni aggiuntive che possono essere memorizzate oppure create ex-novo all'interno del nostro cervello.

Un ruolo fondamentale nell'elaborazione di questi processi cognitivamente complessi che costituiscono la base del salto evolutivo che distingue l'uomo e le scimmie antropomorfe dal restante mondo animale sembra essere in gran parte dovuto allo sviluppo filogenetico della porzione più anteriore della neo-corteccia: la corteccia prefrontale.

Nella storia evolutiva dei mammiferi la corteccia prefrontale è una struttura relativamente recente; i cervelli di topo e di ratto sono costituiti prevalentemente da regioni puramente sensoriali e motorie, nel gatto la corteccia prefrontale occupa solo il 3,5% della superficie corticale, nel cane diviene il 7% ma è solo nei primati che aumenta significativamente divenendo il 10% della corteccia cerebrale nel caso dei gibboni e dei macachi ed il 16,9% negli scimpanzè.

È nell'uomo però dove lo sviluppo di questa regione corticale si è verificato più considerevolmente divenendo circa il 30% complessivo del manto corticale.

Lo sviluppo della corteccia prefrontale è tardivo non solo filogeneticamente ma anche ontogeneticamente, nell'uomo il massimo sviluppo di questo settore corticale viene raggiunto infatti solo dopo l'adolescenza; il protrarsi dello sviluppo ontogenetico di questo settore corticale fino all'età adulta sembrerebbe essere inoltre in linea e correlato con le peculiari capacità di apprendimento che caratterizzano i nostri primi anni di vita.

Il ruolo di fondamentale importanza che la corteccia prefrontale riveste nell'attuazione di comportamenti cognitivamente complessi, come l'elaborazione di intenzioni, la formazione di piani a breve ed a lungo termine, l'attribuzione della corretta valenza affettiva nelle differenti situazioni contestuali, la capacità di prendere decisioni utilizzando risorse ambientali e mnemoniche e la capacità di astrazione, è drammaticamente evidente nei pazienti che presentano lesioni corticali localizzate specificatamente nei settori prefrontali; pazienti che, pur mantenendo intatte abilità cognitive di base, accusano deficit esclusivamente legati all'esecuzione ed alla programmazione di comportamenti complessi.

In ambito neuroscientifico fino a pochi anni fa la corteccia prefrontale era considerata parte delle cosiddette cortecce "associative", ovvero regioni corticali nelle quali gli input sensoriali sono utilizzati per modulare successive risposte di carattere esecutivo; le cortecce associative secondo questo modello svolgerebbero un ruolo di tipo integrativo e sembrerebbero distinguibili dalle restanti aree corticali esclusivamente in quanto non propriamente sensoriali o motorie. Secondo questo modello localazionista la corteccia prefrontale assumerebbe un ruolo di "comando" all'interno di una struttura in cui le funzioni mentali sono gerarchicamente ripartite nelle varie aree corticali.

Recenti studi condotti sia sull'uomo che sulla scimmia, hanno però rivoluzionato l'idea di una mera ripartizione modulare delle funzioni mentali e di una suddivisione puramente gerarchica delle varie aree corticali, inducendo ad ipotizzare nuovi modelli funzionali nei quali le differenti regioni cerebrali interagiscono tra loro non in modo seriale ma di concerto all'interno di network che sottendono le differenti funzioni cognitive, emozionali e comportamentali; secondo questi recenti modelli le funzioni mentali pur non essendo specificatamente localizzate nelle varie regioni corticali ne sono rappresentate al loro interno in modo differente.

Alla luce di questa riconcettualizzazione della localizzazione delle funzioni mentali, i moderni studi funzionali ed anatomici si sono dunque finalizzati a definire quali meccanismi di base siano rappresentati nei vari settori corticali e come le diverse regioni cerebrali interagendo tra loro costituiscano i circuiti che sottendono le funzioni mentali complesse.

In particolare nel nostro studio ci siamo incentrati nell'analisi di uno specifico settore prefrontale, la porzione ventro-laterale della corteccia prefrontale della scimmia *Macaca*.

## 1.2 Corteccia prefrontale laterale nel macaco

Gli studi fisiologici e comportamentali condotti sul macaco hanno evidenziato che anche in questa specie così come nell'uomo la corteccia prefrontale svolge un ruolo fondamentale nella modulazione dell'atteggiamento comportamentale in funzione delle differenti situazioni contestuali ed ambientali.

Gli studi pionieristici di Jacobsen, basati su lesioni specifiche della regione prefrontale laterale, evidenziarono per primi l'implicazione di questo settore corticale nell'elaborazione di strategie comportamentali che richiedono l'utilizzo di rappresentazioni mnemoniche a breve termine, ovvero l'utilizzo di quella particolare forma mnemonica che lo psicologo cognitivo Baddeley nel 1974 definì come memoria operativa.

La memoria operativa o “working memory” è una forma di pianificazione motoria che comporta il mantenimento attivo di informazioni importanti per il comportamento in atto ovvero la capacità di conservare informazioni, riguardanti un oggetto od una particolare situazione per alcuni periodi di tempo prima dell'esecuzione di un compito per il quale tale informazione sia rilevante (Fuster e coll. 1995).

Fuster e collaboratori furono i primi ad osservare, mediante studi elettrofisiologici di registrazione di singole unità cellulari, la presenza di neuroni nella corteccia prefrontale del macaco la cui attività è modulata dall'esecuzione di strategie comportamentali che richiedono l'utilizzo di memoria operativa, strategie comportamentali quali l'esecuzione di compiti di risposta ritardata in cui è necessario svolgere un movimento degli arti o degli occhi verso uno stimolo osservato alcuni istanti precedenti.

Ulteriori e successivi studi condotti principalmente da Patricia Goldman-Rakic e collaboratori (Goldman-Rakic 1987) hanno portato ad ipotizzare che all'interno della corteccia prefrontale siano presenti vari sistemi in parallelo di “working memory” in grado di utilizzare e processare i differenti input sensoriali allo scopo di modulare specifiche risposte comportamentali per compiti di risposta ritardata tipologicamente molto differenti tra loro.

In particolare in analogia con l'ipotesi dell'esistenza di due distinte vie all'interno del sistema visivo, la via del “what” e del “where”, la Goldman-Rakic ipotizzò che anche nella corteccia prefrontale laterale esistessero due domini: uno situato nella corteccia prefrontale dorsolaterale ed implicato nella processazione di informazioni sensoriali di tipo spaziale ed uno localizzato in quella ventrolaterale ed implicato nella processazione di informazioni di tipo semantico.

Successivamente altri autori hanno però proposto, basandosi sia su studi elettrofisiologici e di lesione condotti sulla scimmia sia su studi funzionali condotti sull'uomo, che la corteccia

prefrontale presenti una suddivisione dorso-ventrale non di carattere sensoriale ma di tipo operativo.

In particolare Passingham e collaboratori (Passingham e coll. 2000) hanno proposto che solo la porzione dorsolaterale della corteccia prefrontale sia sede di processi di “working memory”; la porzione ventrolaterale avrebbe invece un ruolo distinto di elaborazione e di rappresentazione delle differenti strategie comportamentali applicabili nelle diverse situazioni ambientali e contestuali. L'ipotesi proposta da Passingham si fonda principalmente sull'osservazione della presenza, in corrispondenza della corteccia prefrontale ventrolaterale, di neuroni la cui attività è correlata all'esecuzione di compiti comportamentali che richiedono l'utilizzo di specifiche regole operative.

Petrides e collaboratori (Petrides 2005) hanno ulteriormente ampliato il ventaglio delle ipotesi funzionali riguardanti la corteccia prefrontale; in particolare secondo questo autore la corteccia prefrontale dorsolaterale non svolgerebbe compiti di “working memory”, compiti infatti sostenibili adeguatamente dalle porzioni più anteriori delle cortecce temporali e parietali, ma assumerebbe esclusivamente un ruolo di controllo e di monitoraggio durante l'esecuzione di comportamenti cognitivamente complessi; la corteccia prefrontale ventrolaterale, sempre secondo questo autore, sembrerebbe essere invece sede di processi esecutivi di primo ordine come la selezione, il confronto ed il giudizio degli stimoli ambientali e mnemonici necessari per l'esecuzione di risposte comportamentali di tipo intenzionale.

### **1.3 La corteccia prefrontale ventrolaterale VLPF caudale**

Il nostro interesse si è focalizzato specificatamente verso la porzione caudale della corteccia prefrontale ventrolaterale (VLPF) del macaco; settore delimitato posteriormente dall'IAS, dorsalmente dal solco principale (PS) e rostralmente dalla fossetta frontale inferiore (IPD; *inferior prefrontal dimple*) e costituito da almeno 3 differenti domini funzionali: uno localizzato in corrispondenza del banco anteriore del solco arcuato ed implicato in funzioni di tipo oculomotorio (Bruce et Goldberg 1985), uno localizzato in corrispondenza del PS ed implicato nell'esecuzione di compiti visuospatiali (Levy et Goldman-Rakic 2000), ed infine uno localizzato nella regione della convessità inferiore prefrontale ed implicato nella processazione di informazioni non spaziali in termini cognitivamente complessi (Levy et Goldman-Rakic 2000; Goldman-Rakic 2004).

#### *Studi anatomici della VLPF*

La VLPF del macaco è stata oggetto in passato di molteplici studi anatomici il cui risultato sono

state suddivisioni architettoniche non completamente concordi tra loro e che hanno conseguentemente generato conflitti interpretativi riguardanti la localizzazione dei dati funzionali ed odologici e la loro attribuzione alle differenti aree corticali così anatomicamente definite.

Per esempio numerosi autori hanno suddiviso la porzione anteriore della corteccia prearcuata in due differenti settori, uno dorsale ed uno ventrale, definiti da Walker (1940) rispettivamente come area 8A ed area 45, da Barbas e Pandya (1989) come area 8 dorsale ed area 8 ventrale e da Preuss e Goldman-Rakic (1991), analogamente a Walker, come area 8A e 45.

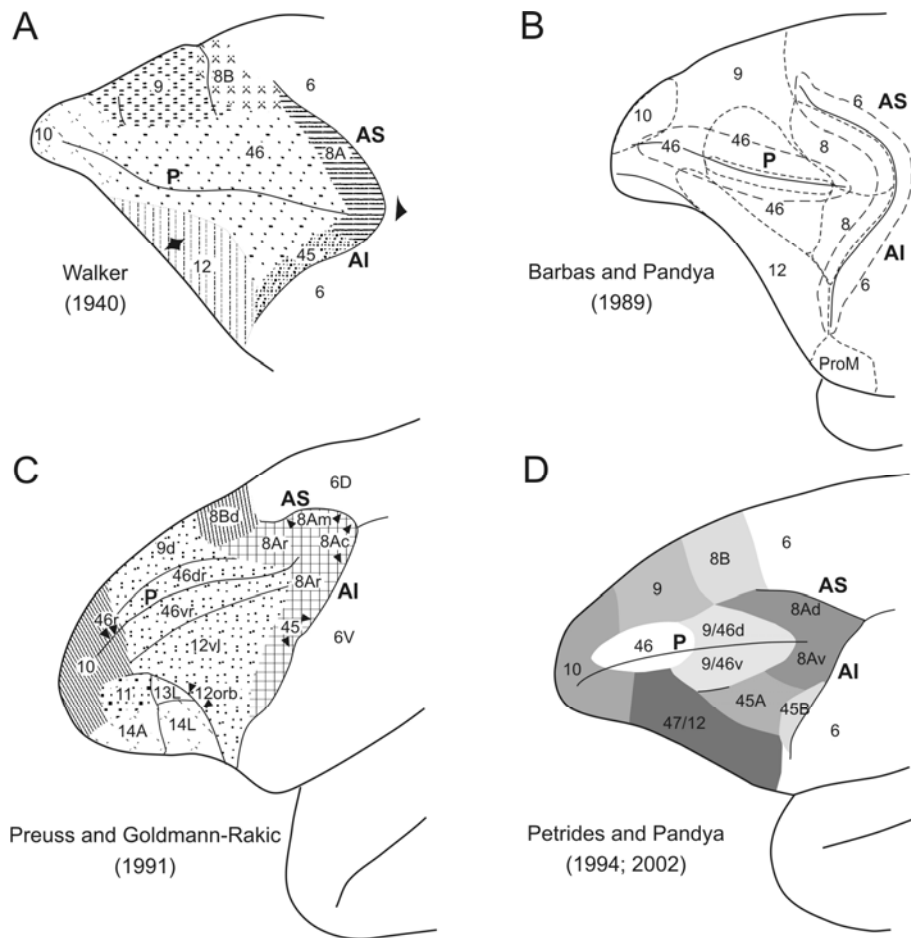
Stanton e coll. (1989) nel contempo hanno però delimitato un settore della corteccia prearcuata, che non era stato identificato in nessuno studio anatomico, contraddistinto da specifiche caratteristiche architettoniche e funzionali ed implicato nella modulazione di movimenti oculari di tipo saccadico: i campi oculari frontali o Frontal Eye Fields-FEF-.

Questo settore è localizzato, prendendo come riferimento la parcellazione di Walker, nella porzione del banco anteriore del solco arcuato occupata dalla parte ventrale dell'area 8A e dalla porzione dorsale dell'area 45, e funzionalmente costituisce la regione del banco anteriore dell'arcuato in cui è possibile evocare con stimoli a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico, regione caratterizzata inoltre dalla presenza di neuroni la cui attività è correlata alla modulazione di questi specifici movimenti oculari; questo settore presenta anche una controparte citoarchitettonica che si distingue dalle restanti porzioni della corteccia prearcuata per la presenza di caratteristiche cellule piramidali di grosse dimensioni in corrispondenza del V strato.

Alla luce di questi studi l'area 45 di Walker si dimostrò pertanto architettonicamente e funzionalmente non omogenea.

Recentemente Petrides e Pandya (Petrides e Pandya 2002) hanno però proposto una nuova parcellazione della VLPF nella quale il bordo tra l'area 8 e l'area 45 è stato localizzato in corrispondenza del bordo funzionale ed architettonico dei FEF.

L'area 45 delimitata da questi autori si distingue dall'area 45 definita da Walker non solo per una diversa localizzazione anatomica ma anche per differenti caratteristiche citoarchitettoniche; l'area 45 definita da Walker è infatti la regione dell'arcuato caratterizzata dalla presenza di grosse cellule piramidali in corrispondenza delle porzioni profonde del III strato ma che presenta, nelle porzioni più dorsali dell'area, anche le grosse cellule piramidali caratterizzanti il V strato dei FEF, l'area 45 definita da Petrides e Pandya è invece la porzione della corteccia prearcuata caratterizzata non solo dalla presenza di grosse cellule piramidali nel III strato ma anche dall'assenza, nel V strato, delle grosse cellule piramidali caratteristiche dei FEF.



**Figura 1.** Mappe architettoniche della corteccia prefrontale della scimmia macaca. Le figure mostrano 4 differenti mappe parcellazioni di: **(A)** Walker (1940); **(B)** Barbas and Pandya (1989); **(C)** Preuss and Goldman-Rakic (1991); **(D)** Petrides and Pandya (1994, 2002). AI =solco arcuato inferiore; AS = solco arcuato superiore; P = solco principale.

L'utilizzo, da parte di Petrides e Pandya, di questi differenti criteri citoarchitettonici giustifica la differente localizzazione anatomica della loro area 45 rispetto all'area 45 definita da Walker, ed in particolare giustifica la presenza di un bordo dell'area 45 con l'area 8 collocato più ventralmente e coincidente con il bordo funzionale dei FEF.

In virtù di questa diversa definizione architettonica l'area 45 di Petrides e Pandya si estende, differentemente dall'area 45 di Walker, anche in corrispondenza della convessità prearcuata, in un settore che in diversi studi è stato oggetto di controversa attribuzione ed assegnato da Walker alle aree 46 e 12, da Preuss e Goldman-Rakic all'area 12 e da Barbas e Pandya all'area 8 ventrale ed all'area 46.

Petrides e Pandya benchè definiscano l'area 45 omogenea citoarchitettonicamente ne distinguono, in base alla loro localizzazione anatomica, due distinti settori: uno giacente all'interno del banco del solco arcuato e denominato 45B ed uno localizzato in corrispondenza dell'adiacente convessità e

denominato 45A.

Il settore denominato 45B rappresenta dunque la porzione del banco anteriore del solco arcuato nella quale, prendendo come riferimento la parcellazione funzionale di Stanton, non è possibile indurre attraverso microstimolazione con stimoli elettrici a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico.

Il settore denominato 45A giace sulla convessità prearcuata e si estende fino alla parte posteriore dell'IPD, che costituisce il principale punto di riferimento anatomico, quando presente, per definire il bordo rostrale dell'area 45.

### *Considerazioni anatomo-funzionali*

Petrides e Pandya sulla base della localizzazione anatomica dell'area 45 ed alla luce di analogie citoarchitettoniche che l'area evidenzia con la corrispondente area 45 dell'uomo, ipotizzano, che nella scimmia, quest'area sia l'omologa dell'area di Broca (Petrides e Pandya 2002). Questa ipotesi è coerente con le connessioni che quest'area evidenzia con le regioni uditive del giro temporale superiore (STG) implicate nella processazione di informazione acustica complessa di tipo non spaziale (Petrides e Pandya 2002) ed è inoltre in linea con recenti studi elettrofisiologici che hanno evidenziato, in prossimità ed in corrispondenza dell'IPD, la presenza di neuroni che rispondono a stimoli acustici complessi di tipo non spaziale, tra cui vocalizzazioni, ed a stimoli bimodali acustico-visivi, tra cui immagini di facce e vocalizzazioni (Romanski e coll., 2005; Sugihara e coll., 2006).

Evidenze indirette, odologiche e funzionali, suggeriscono però che l'area 45 non sia omogenea: 1) in primo luogo infatti le aree acustiche complesse dell'STG (Petrides e Pandya, 1988; Romanski e coll., 1999; Romanski e coll., 1999) e l'area multimodale STP (Seltzer e Pandya, 1989) proiettano esclusivamente al settore della convessità corrispondente alla 45A ma non alla porzione del banco corrispondente alla 45B; contrariamente iniezioni in corrispondenza dei FEF (Huerta e coll., 1987; Stanton e coll., 1993), dei campi oculari supplementari (SEF) (Huerta e Kaas, 1990; Luppino e coll., 2003; Wang e coll., 2005) e nelle regioni visive sensibili al movimento come le regioni caudali del solco temporale superiore -MST- (Maioli e coll., 1998) mostrano marcatura prevalentemente nella zona del banco dell'arcuato corrispondente alla 45B; 2) in secondo luogo i neuroni che rispondono a stimoli di tipo comunicativo sono stati localizzati esclusivamente nella porzione della convessità corrispondente alla 45A (Romanski e coll., 2005; Sugihara e coll., 2006) ma non nel settore del banco corrispondente alla 45B; 3) infine in un recente studio di risonanza magnetica funzionale condotto su scimmie non anesteziate (Nelissen e coll., 2005) l'osservazione di oggetti complessi e di azioni svolte da altri ha evidenziato la presenza di tre differenti e segregati

foci di attivazione, uno in corrispondenza del settore coincidente alla 45B, uno nel settore corrispondente alla 45A ed uno localizzato in prossimità del PS.

Questi dati nella loro globalità pertanto suggeriscono che: a) il settore denominato 45B potrebbe essere funzionalmente distinto da quello della convessità, la 45A; b) il settore denominato 45A sembrerebbe un'entità funzionalmente distinta non solo dalla 45B ma anche dalle altre aree della convessità della VLPF caudale.

### *Scopi del nostro studio*

Alla luce di questi dati il nostro studio si è inizialmente focalizzato ad ottenere una parcellazione della VLPF caudale che permettesse di dirimere i conflitti interpretativi evidenziati nelle parcellazioni precedenti e potesse inoltre fungere da sistema di riferimento per un successivo studio di connettività atto a stabilire se le aree da noi definite architettonicamente possano essere considerate distinte anche odologicamente.

Nel nostro studio architettonico pur basandoci principalmente sui classici metodi di cito e mieloarchitettonica ci siamo serviti anche di approcci di tipo chemoarchitettonico che ci hanno permesso di confermare l'estensione ed i bordi anatomici delle aree studiate mediante l'utilizzo di più criteri morfologici (Carmichael e Price, 1994; Dombrowski e coll., 2001).

In definitiva utilizzando inizialmente un approccio architettonico e successivamente di tipo odologico ci siamo preposti: a) in primo luogo di definire se i due settori 45A e 45B dell'area 45 potessero essere considerati distinti, sia l'uno dall'altro che rispetto alle altre aree della VLPF caudale; b) in secondo luogo di definire quale settore della VLPF caudale corrisponda con la porzione della convessità target di proiezioni da regioni uditive di tipo complesso (Petrides e Pandya, 1988; Romanski e coll., 1999; Romanski e coll., 1999; Seltzer e Pandya, 1989) e nella quale sono stati registrati neuroni che rispondono a stimoli comunicativi (Romanski e coll., 2005; Sugihara e coll., 2006).

## 2. Materiali e metodi

Il nostro studio architettonico è stato condotto su un totale di 26 emisferi cerebrali provenienti da 18 scimmie macache (10 *Macaca Nemestrina*, 6 *Macaca Fascicularis* e 2 *Macaca Mulatta*) di ambedue i sessi e con un peso variabile tra i 5 e gli 8 kg.

I cervelli provenienti da 5 di queste scimmie (PR11, PR17, PR18, PR19 e PR20) sono stati utilizzati solo per studi di tipo architettonico. I casi M3 ed M4 sono stati utilizzati anche come soggetti in esperimenti di fMRI (Nelissen e coll. 2005). Le scimmie restanti sono state utilizzate anche in studi di tipo odologico in cui traccianti assonali sono stati iniettati in aree premotorie e parietali (vedi anche Galletti e coll., 2001; Luppino e coll., 2001; Rozzi e coll., 2006).

Lo studio odologico della VLPF caudale è stato condotto mediante l'esecuzione di interventi neurochirurgici allo scopo di iniettare traccianti neuronali a livello corticale.

Gli esperimenti di iniezioni di traccianti neuronali nelle aree 45A, 45B, 8/FEF, 8r, 46 e 12 sono stati condotti su otto scimmie Macaca (3 *Macaca fascicularis*, 2 *Macaca nemestrina* e 2 *Macaca mulatta*) di ambedue i sessi e con un peso variabile tra i 5 e gli 8 kg.

Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dalla Commissione Veterinaria dell'Università di Parma e sono state applicate in conformità alle direttive europee sull'utilizzo degli animali da laboratorio.

## 2.1 Studio architettonico

*Con il termine architettonica intendiamo lo studio delle alterazioni strutturali che sono dovute a modificazioni della disposizione, del numero e delle dimensioni degli elementi neuronali come tali e visualizzabili anche a piccolo ingrandimento in specifici preparati istologici.*

Vogt and Vogt, 1919

### *Procedure chirurgiche*

Ogni animale è stato anestetizzato con ketamina idrocloruro (15 mg/kg i.m.), trattato con una iniezione letale i.v. di sodio tiopentale (60 mg/Kg) ed infine perfuso attraverso il ventricolo sinistro con, nell'ordine, soluzione salina, 3.5-4% paraformaldeide che svolge una funzione fissativa. In tutti gli animali, tranne i Casi PR18 e PR19, l'infusione di paraformaldeide è stata seguita da quella di una soluzione crioprotettiva costituita da 5% di glicerolo in tampone fosfato. Tutte le soluzioni utilizzate sono state preparate in soluzione di tampone fosfato allo 0.1M a pH 7.4. Terminata la perfusione, l'animale è stato fissato su un apparato stereotassico per l'asportazione dell'encefalo che è stato inoltre fotografato, previa asportazione della teca cranica.

### *Taglio al microtomo*

Tutti i cervelli tranne quelli provenienti dai casi PR18 e PR19 sono stati collocati in una soluzione crioprotettiva di glicerolo al 10% per tre giorni e trasferiti, nuovamente per 3 giorni, in una soluzione di glicerolo al 20%. L'emisfero destro del caso PR18 e l'emisfero sinistro del caso PR19 sono stati invece inclusi in celloidina. Tutti i cervelli sono stati congelati e tagliati allo spessore di 60 µm, tranne i casi PR18 e PR19 che sono stati tagliati ad uno spessore di 50µm. Il taglio è stato attuato utilizzando il microtomo, e mantenendo i cervelli congelati mediante l'utilizzo di ghiaccio secco. Le sezioni così ottenute sono state quindi trattate: a) con una colorazione basata sull'utilizzo della resina tionina, che è utilizzata allo 0,1% in una soluzione tampone di acetato allo 0,1M ed a pH 3.7, (Nissl), per gli studi di citoarchitettonica; b) con tecniche immunoistochimiche, l'SMI-32 e la calbindina, per gli studi di chemoarchitettonica; c) con la colorazione di Gallyas (Gallyas; 1979) per gli studi di mieloarchitettonica.

Per gli studi citoarchitettonici sono stati studiati 12 emisferi, 7 tagliati lungo il piano coronale, 4 tagliati lungo il piano parasagittale, 1 tagliato lungo un piano tangenziale rispetto all'IAS ed 1 tagliato lungo un piano perpendicolare rispetto all'IAS.

Per gli studi mieloarchitettonici sono stati studiati 12 emisferi, 7 tagliati lungo il piano coronale, 4 tagliati lungo il piano parasagittale ed 1 tagliato lungo un piano perpendicolare rispetto all'IAS.

Per gli studi immunohistochimici basati sull'utilizzo dell'anticorpo specifico per l'SMI-32 sono stati studiati 14 emisferi, 4 tagliati lungo il piano coronale, 9 tagliati lungo il piano parasagittale ed 1 tagliato lungo un piano perpendicolare all'IAS.

Per gli studi immunohistochimici basati sull'utilizzo dell'anticorpo per la Calbindina sono stati studiati 7 emisferi, 2 tagliati lungo il piano coronale, 4 tagliati lungo il piano parasagittale ed 1 tagliato lungo un piano perpendicolare all'IAS.

La tabella 1 riassume i casi utilizzati in questo studio.

I piani di taglio tangenziale e perpendicolare all'IAS sono stati utilizzati allo scopo di ottenere una visione ottimale dell'architettura della corteccia prearcuata, che non è facilmente visualizzabile con un taglio standard di tipo coronale a causa dell'andamento obliquo o quasi verticale del solco.

In tutti gli emisferi, tranne il caso M4, ogni quinta sezione è stata trattata per la colorazione di Nissl, nel caso M4 ogni terza sezione di ambedue gli emisferi è stata processata con la stessa metodica. In tutti gli emisferi le sezioni adiacenti a quelle trattate per la colorazione del Nissl sono state utilizzate per gli studi di mieloarchitettura e per gli studi di chemoarchitettura.

### *Tecniche immunohistochimiche*

Le sezioni utilizzate, negli studi di chemoarchitettura, per le procedure istologiche di tipo immunohistochimico sono state lavate in una soluzione tampone di buffer fosfato (PBS) per 10-15 minuti. L'attività delle perossidasi endogene è stata soppressa mediante incubazione in una soluzione allo 0,6% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ed all'80% di metanolo per 15 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi nuovamente lavate in PBS per 4 volte per un totale di 15 minuti e quindi sono state incubate in uno dei seguenti anticorpi primari: antimouse monoclonale SMI-32 (Sternberger Monoclonals, Baltimore, MA, USA) diluito 1:5000 in PBS con l'aggiunta dello 0,3% di Triton (Sigma, St Louis, MO, USA) e di 2% di siero di cavallo normale (Vector, Burlingame, CA, USA) o anti-calbindina D-28K monoclonale (Swant, Bellinzona, Switzerland), diluito 1:5000 in PBS con l'aggiunta dello 0,3% di Triton e del 5% di siero di cavallo normale. Dopo l'incubazione ed il lavaggio in PBS (15 min) le sezioni sono state processate con il metodo dell'avidina-biotina usando il kit ABC della Vectastain e la 3,3'-diamminobenzidina come cromogeno, per aumentare l'intensità del segnale sono state inoltre aggiunte alla soluzione di sviluppo cloruro di cobalto e nickel

ammonio solfato. Le sezioni sono state quindi montate in salina, deidratate in alcool e coperte con vetrini coprioggetto. Per evitare variabilità nell'intensità del segnale tutte le sezioni provenienti dallo stesso caso, sono state processate contemporaneamente nella stessa soluzione di sviluppo.

**TABELLA 1**

<b>Caso</b>	<b>Specie</b>	<b>Emisfero</b>	<b>Taglio</b>	<b>Staining *</b>
PR17	<i>Nemestrina</i>	destro	Perpendicolare all'arcuato	Nissl, Mielina (120), SMI-32 (60), CB (60)
PR18	<i>Nemestrina</i>	destro	Tangenziale all'arcuato	Nissl (celloidina)
PR19	<i>Nemestrina</i>	sinistro	Parasagittale	Nissl (celloidina)
PR11	<i>Nemestrina</i>	sinistro	Parasagittale	Nissl, SMI-32 (60)
PR20	<i>Nemestrina</i>	destro	Parasagittale	Nissl, Mielina (120), SMI-32 (60), CB (60)
M4	<i>Mulatta</i>	sinistro	Parasagittale	Nissl, Mielina (60), SMI-32 (60)
		destro	Parasagittale	Nissl, Mielina (60), SMI-32 (60)
M3	<i>Mulatta</i>	destro	Parasagittale	Nissl, Mielina (120), SMI-32 (60), CB (60)
		sinistro	Coronale	Nissl, Mielina (120), SMI-32 (60), CB (60)
MEF16	<i>Fascicularis</i>	destro	Parasagittale	Nissl, SMI-32 (120), CB (60)
		sinistro	Parasagittale	Nissl, SMI-32 (120), CB (60)
MEF17	<i>Fascicularis</i>	sinistro	Parasagittale	Nissl, SMI-32 (60)
MEF18	<i>Fascicularis</i>	sinistro	Parasagittale	Nissl, SMI-32 (60)
Case 12	<i>Nemestrina</i>	destro	Coronale	Nissl, Mielina (120), SMI-32 (120), CB (60)
Case 18	<i>Nemestrina</i>	destro	Coronale	Nissl, Mielina (120), SMI-32 (60)
		sinistro	Coronale	Nissl, Mielina (60)
Case 13	<i>Fascicularis</i>	destro	Coronale	Nissl
		sinistro	Coronale	Nissl, SMI-32 (60)
Case 14	<i>Nemestrina</i>	destro	Coronale	Nissl
		sinistro	Coronale	Nissl
Caso 20	<i>Nemestrina</i>	destro	Coronale	Nissl
		sinistro	Coronale	Nissl
Caso 23	<i>Fascicularis</i>	sinistro	Coronale	Nissl, Mielina (60)
		destro	Coronale	Nissl
Caso 29	<i>Fascicularis</i>	sinistro	Coronale	Nissl, Mielina (60)
Caso 38	<i>Nemestrina</i>	sinistro	Coronale	Nissl, Mielina (60)

- i numeri tra parentesi indicano la distanza alle sezioni di nissl espressa in  $\mu\text{m}$

### *Analisi architettonica qualitativa*

L'analisi architettonica delle regioni corticali di nostro interesse è stata svolta mediante osservazioni qualitative di sezioni istologiche rappresentative di ciascun area studiata. Le osservazioni che hanno richiesto un basso livello di ingrandimento sono state attuate con un microscopio Universal Wild M420 equipaggiato con un obiettivo Apozoom; le osservazioni che hanno richiesto un medio ed un grosso ingrandimento sono state invece attuate con un microscopio Nikon Optiphot-2 e un Zeiss Axioscop 2. Almeno 4 ricercatori indipendentemente gli uni dagli altri hanno valutato il materiale studiato; la stima della posizione dei bordi citoarchitettonici assegnata da ciascun ricercatore era generalmente in accordo e se, occasionalmente, differiva con differenze non superiori ai 500  $\mu\text{m}$ .

In ogni sezione il bordo della superficie corticale, il bordo tra la sostanza grigia e la sostanza bianca e la posizione dei bordi tra le varie aree sono stati tracciati utilizzando un software sviluppato nel nostro laboratorio. Mediante questo software le coordinate dei punti situati in corrispondenza dei vari bordi sono state acquisite, separatamente, all'interno di un sistema di riferimento cartesiano, usando dei trasduttori lineari, montati sugli assi X ed Y del tavolino traslatore collegato al microscopio; le coordinate acquisite, per ciascuna sezione analizzata, sono state quindi digitalizzate separatamente da un altro software, implementato anch'esso nel nostro laboratorio, mediante il quale sono state visualizzate graficamente come disegni bidimensionali delle singole sezioni.

L'analisi qualitativa delle sezioni processate per gli studi di mieloarchitettonica e di chemoarchitettonica è stata svolta indipendentemente dagli studi di citoarchitettonica ma utilizzando le stesse metodologie e le stesse strumentazioni.

Per correlare la posizione dei bordi osservati negli studi di mielo ed immunoarchitettonica con i bordi delimitati negli studi di citoarchitettonica abbiamo utilizzato una camera lucida collegata al microscopio. La camera lucida è stata usata anche per trasferire i bordi osservati tra gli strati corticali delle sezioni trattate per gli studi di citoarchitettonica alle sezioni processate per gli studi di tipo immunostochimico, in cui i bordi tra gli strati sono difficilmente identificabili.

### *Analisi quantitativa di cellule immuno positive*

Oltre ad uno studio puramente qualitativo della distribuzione delle cellule immunopositive ci siamo avvalsi di una metodica atta a valutare la densità delle cellule immunopositive nelle differenti aree già definite citoarchitettonicamente e nei differenti strati corticali.

La nostra analisi quantitativa si è focalizzata su ambedue le differenti tipologie di cellule immunopositive utilizzate nello studio qualitativo: l'SMI-32 e la Calbindina.

Le immagini delle aree analizzate sono state in primo luogo acquisite con un microscopio Nikon

Optiphot-2 equipaggiato con telecamera digitale. Le immagini così acquisite sono state analizzate all'ingrandimento del 200X per le cellule immunopositive all'SMI-32 ed all'ingrandimento del 400X per quelle immunopositive alla calbindina; l'analisi è stata attuata visualizzando le immagini acquisite mediante il programma adobe photoshop per mezzo del quale sono state inoltre segnate tutte le cellule immunopositive distribuite dalla superficie piaie fino al bordo del VI strato con la sostanza bianca. Le porzioni corticali così analizzate sono state poi suddivise in strisce di 250µm.

Le strisce di corteccia sono state selezionate da differenti parti delle aree in esame, per ciascun area si utilizzano lo stesso numero di strisce, almeno 8.

Le cellule immunopositive all'anticorpo SMI-32 sono una sottopopolazione di cellule piramidali localizzate esclusivamente in corrispondenza delle profondità del III strato ed in corrispondenza del V strato. La densità di questa tipologia cellulare è stata dunque definita in termini di numerosità come numero di cellule immunopositive segnate in ciascuna striscia diviso per la profondità di ciascun strato espressa in mm. Benchè le cellule immunopositive all'SMI-32 siano assenti nel II strato quest'ultimo ed il III strato sono stati considerati come un unicum a causa della difficoltà di settarne il bordo.

I dati ottenuti sono analizzati con un'ANOVA a due vie (fattori areaXstrato) per misure ripetute seguita da un'analisi post hoc con correzione di Bonferroni per confronti multipli.

Le cellule immunopositive all'anticorpo per la proteina calbindina(Cb) sono una sottopopolazione di cellule Gabaergiche, localizzate sull'intera superficie corticale e provenienti da due differenti tipologie cellulari: cellule non piramidali e piramidali. Le cellule non piramidali sono le predominanti e si trovano nella pressochè totalità della superficie corticale mentre le cellule piramidali sono in numero esiguo e quasi completamente localizzate nelle profondità del III strato.

Le cellule immunopositive alla calbindina sono state studiate con due differenti tipologie di analisi. La prima è stata condotta allo scopo di valutare la densità totale delle due differenti sottopopolazioni cellulari nelle aree studiate; per questa analisi il numero totale delle cellule contate è stato diviso per la profondità corticale espressa in mm; siccome il bordo tra il VI strato e la sostanza bianca è talvolta difficilmente distinguibile, a causa del possibile andamento obliquo della corteccia, abbiamo considerato come profondità corticale totale quella che decorre dalla superficie piaie al bordo V/VI strato.

I dati così ottenuti sono stati analizzati con un'ANOVA a due vie (fattori areaXtipocellula) per misure ripetute seguita da un'analisi post hoc con correzione di Bonferroni per confronti multipli.

La seconda analisi è stata attuata allo scopo di valutare la distribuzione laminare delle cellule non piramidali; una corrispondente analisi laminare non è stata condotta sulle cellule piramidali in quanto queste ultime sono localizzate esclusivamente nelle profondità del III strato. Siccome la distribuzione delle cellule non piramidali all'interno del II/III strato è largamente eterogenea per

ottenere una migliore descrizione dell'andamento della densità all'interno dei due strati, abbiamo suddiviso il complesso II/III strato in 4 sublaminae di ugual lunghezza. La numerosità è stata per cui calcolata in sei differenti strati/sublaminae: 4 sublaminae in cui abbiamo diviso il complesso II/III strato, il IV strato ed il V strato.

I dati ottenuti sono analizzati con un'ANOVA a due vie (fattori areaXstrato) per misure ripetute seguita da un'analisi post hoc con correzione di Bonferroni per confronti multipli.

### *Mappe architettoniche*

In tutti i casi di questo studio le mappe architettoniche sono state realizzate riportando i bordi architettonici ottenuti dallo studio delle singole sezioni corticali su disegni rappresentanti visioni dorsolaterali degli emisferi studiati.

Inoltre i dati di ogni singola sezione studiata sono stati importati in un programma di ricostruzione 3D (Bettio e coll., 2001), che permette di ottenere ricostruzioni volumetriche del cervello, includendovi eventualmente anche dati odologici. Utilizzando questo software, le singole sezioni sono state innanzitutto traslate e ruotate manualmente così da ottenerne il corretto allineamento; l'allineamento è basato sulla localizzazione della traccia di un ago inserito ortogonalmente al piano di taglio e mediante l'utilizzo di diversi punti di riferimento corticali e sottocorticali. Successivamente è stata applicata una trasformazione locale non lineare per correggere la distorsione dovuta alla processazione istologica. Le ricostruzioni 3D così ottenute, ricostruzioni che comprendono anche la posizione dei bordi architettonici, possono essere sezionate lungo qualsiasi piano di interesse, così da permettere il confronto di dati provenienti da emisferi sezionati con differenti piani di taglio, oppure dissezionate in modo tale da esporre la superficie corticale che giace attraverso ciascun solco. La localizzazione anatomica delle aree situate in corrispondenza della convessità della VLPF è stata visualizzata mediante visioni standard dorsolaterali di ciascuna ricostruzione 3D. Le aree localizzate nel banco anteriore dell'arcuato sono state invece visualizzate in visioni non-standard di ciascun emisfero, in cui il banco anteriore dell'arcuato è stato esposto mediante un'appropriata dissezione della corteccia postarcuata.

Per definire una stima della variabilità interindividuale delle mappe architettoniche rispetto ai punti di riferimento anatomici dell'IAS, del PS e dell'IPD abbiamo creato una mappa architettonica delle aree della VLPF caudale.

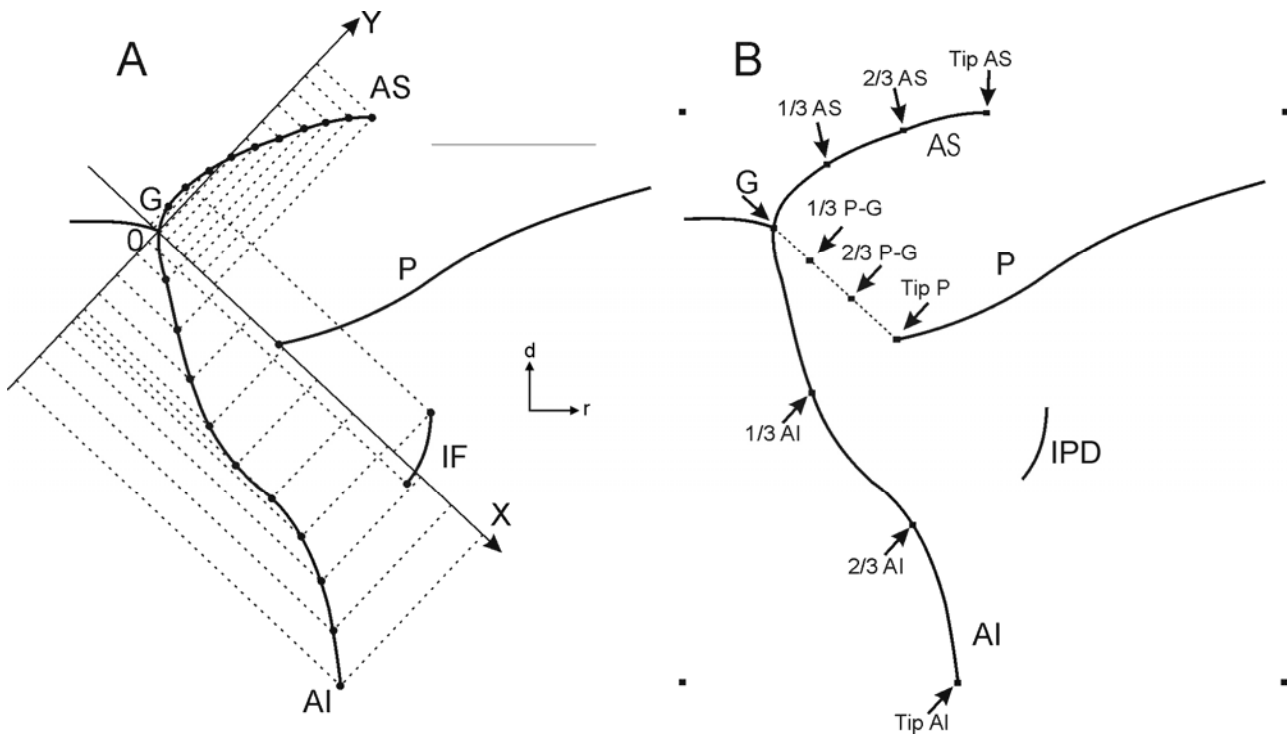
Per ottenere questa mappa architettonica media abbiamo in primo luogo creato un emisfero template della VLPF caudale; per realizzare questo template abbiamo misurato, in ciascuno dei 20 emisferi utilizzati in questo procedimento, la lunghezza totale dell'IAS e del solco arcuato superiore (SAS); l'SAS e l'IAS sono stati inoltre suddivisi in dieci segmenti di uguale lunghezza. Le

coordinate dei punti di ciascuno di questi segmenti sono state poi introdotte in uno spazio cartesiano in cui lo zero è stato centrato in corrispondenza del genu dell'arcuato e l'asse delle x è stato fatto passare in corrispondenza della punta posteriore del PS. L'emisfero template è stato quindi realizzato utilizzando la media delle coordinate dei punti di ciascun emisfero (Fig. 2A).

Successivamente le mappe architettoniche, precedentemente studiate, di dieci emisferi, provenienti da 7 *Macaca nemestrina* e da 2 *Macaca fascicularis*, sono state sovrapposte sul template. Per attuare questa sovrapposizione abbiamo utilizzato uno script di Matlab in grado di applicare delle deformazioni di ciascuna di queste ricostruzioni basandosi su un'interpolazione lineare di triangoli formati a partire dei punti che costituiscono i quattro angoli dell'immagine e di altri punti di riferimento (Watson 1992). Sono stati usati tre gruppi di punti di riferimento per attuare questa procedura: il primo gruppo include la punta dell'SAS e due altri punti localizzati rispettivamente a 1/3 e 2/3 della lunghezza del solco. Il secondo gruppo include la punta dell'IAS e due altri punti localizzati rispettivamente a 1/3 e 2/3 della lunghezza del solco. Il terzo gruppo include la punta del PS e due altri punti localizzati a 1/3 e 2/3 della distanza della punta del PS dal genu dell'arcuato.

### *Immagini fotografiche*

Le immagini fotografiche mostrate nel presente studio sono state ottenute fotografando direttamente le sezioni istologiche di interesse con una fotocamera digitale annessa al microscopio. Le singole immagini così ottenute sono state importate su Adobe Photoshop, mediante il quale sono assemblate e ridotte all'ingrandimento finale. La luminosità e l'intensità del contrasto sono state infine aggiustate, quando necessario, per ottenere una buona riproducibilità del dato istologico originale.



**Figura 2.** Procedura di costruzione del template bidimensionale della porzione caudale della VLPF e metodica di sovrapposizione delle diverse mappe architettoniche.

**A:** Disegno della VLPF caudale, comprendente l'IAS, il PS e l'IPD, costruito in uno spazio cartesiano bidimensionale il cui centro è situato in corrispondenza del genu dell'arcuato ed il cui asse delle X è costituito dalla linea congiungente il genu dell'arcuato e la punta posteriore del PS. I punti segnati con la freccia rappresentano i punti di riferimento utilizzati per generare il template. Le coordinate X-Y di ciascun punto sono ottenute partendo dalla media delle coordinate X-Y dei punti corrispondenti di ciascuno dei 20 emisferi studiati.

**B:** Disegno del template della parte caudale della VLPF in cui sono visualizzati i punti di riferimento utilizzati nella procedura di sovrapposizione delle mappe architettoniche. I punti di riferimento sono indicati da quadrati situati in corrispondenza dei 4 angoli dell'immagine ed in punti equidistanti localizzati lungo il solco arcuato e sulla congiungente del genu dell'arcuato con la punta posteriore del PS. d = dorsale; G = genu del solo arcuato; IPD = fossetta prefrontale inferiore ; r = rostrale. Altre abbreviazioni come in figura 1.

Scala = 5 mm in A (applicata anche a B).

## 2.2 Studio odologico

### *Procedure chirurgiche e elettrofisiologiche*

Ogni animale è stato anestetizzato con ketamina idrocloruro (15-20 mg/kg i.m.) o con sodio tiopentale (10-15 mg/Kg i.v.), e fissato in un apparato stereotassico. Quindi, in condizioni di sterilità, dopo un'incisione sullo scalpo, è stata praticata una craniotomia seguita dall'apertura di un lembo durale in corrispondenza delle zone di interesse.

A seguito dell'esposizione della zona corticale di interesse sono state eseguite iniezioni, dopo le quali il lembo durale aperto è stato suturato, l'osso riposizionato ed i tessuti superficiali suturati secondo i piani anatomici.

Durante le chirurgie l'idratazione dell'animale è stata mantenuta costante mediante somministrazione endovenosa di una soluzione salina (circa 10 ml/h, i.v.), anche la temperatura corporea è stata continuamente monitorata e mantenuta costante mediante l'utilizzo di un cuscinetto riscaldante. Il battito cardiaco, la pressione arteriosa, l'ossigenazione del sangue ed il ritmo respiratorio vengono anch'esse continuamente monitorate. Dopo il recupero dall'anestesia ciascun animale è stato riportato in gabbia e monitorato fino alla completa ripresa. Desametasone ed antibiotici ad ampio spettro sono stati somministrati sia durante il periodo preoperatorio che in quello postoperatorio. Anche la somministrazione di analgesici è stata attuata sia durante l'operazione che nel periodo postoperatorio.

### *Localizzazione dei siti di iniezione*

La localizzazione dei siti di iniezione è stata attuata utilizzando come sistema di riferimento i principali punti di reperi anatomici corticali, facilmente visibili a seguito dell'apertura del lembo durale; i punti di riferimento anatomici che abbiamo utilizzato sono stati: il solco arcuato, il PS e se presente l'IPD; per facilitare la localizzazione e la delimitazione dell'estensione delle aree studiate rispetto ai vari punti di riferimento anatomici abbiamo inoltre utilizzato anche la mappa architettonica media della VLPF caudale che abbiamo ottenuto a seguito dello studio anatomico.

Inoltre in due casi, i Casi 36 (in ambedue gli emisferi) e 37 (nell'emisfero sinistro), la scelta dei siti di iniezione nell'area prearcuata 8/FEF è stata definita anche sulla base delle caratteristiche funzionali di questa regione, studiate mediante stimolazione intracorticale (ICMS); la stimolazione corticale si è rivelata una metodologia estremamente attendibile per definire la localizzazione anatomica dell'area 8/FEF, in quanto quest'area rappresenta la controparte architettonica della porzione della corteccia prearcuata definita funzionalmente come FEF, porzione corticale nella

quale è dunque possibile indurre con stimoli a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico.

In questi casi il banco anteriore dell'IAS è stato esplorato mediante stimolazioni elettriche attuate con un microelettrodo (1-1.5M $\Omega$  a 1000KHz) con cui sono state svolte penetrazioni successive, ciascuna delle quali spaziate di 1 mm.

La localizzazione dei siti di penetrazione è stata inoltre visualizzata mediante una fotografia della zona corticale esposta, immagine fotografica che permette di definire la posizione relativa dell'elettrodo rispetto ai vari punti di riferimento anatomici. In ciascuna penetrazione l'elettrodo è stato inserito ad una distanza di circa 1-1.5 mm dal solco e fatto penetrare per almeno 5-6 mm attraverso il banco; la registrazione dell'attività elettrica corticale, di singole o più unità cellulari, ci ha inoltre permesso di definire se l'elettrodo fosse correttamente localizzato in corrispondenza della sostanza grigia corticale. Lungo tutta la penetrazione, a circa 1 mm di intervallo l'uno dall'altro, treni di corrente catodica (0.2 msec di durata per ogni pulse, 300 Hz di frequenza, per una durata complessiva del treno di stimolazione di 50-100 msec) sono stati rilasciati ad una intensità di corrente inferiore ai 100  $\mu$ A; la presenza o l'assenza di movimenti oculari a seguito della stimolazione è stata valutata da almeno 3 ricercatori.

### *Traccianti neuronali*

Una volta scelti i siti in cui iniettare, i traccianti fluorescenti Fast Blue (FB, 3% in acqua distillata, EMS-POLYLOY GmbH, Gross-Umstadt, Germany), Diamidino Yellow (DY, 2% in 0.2M tampone fosfato a pH 7.2, EMS-POLYLOY GmbH) e Cholera Toxin B subunit, coniugato o con Alexa 488 (CTB green, CTBg) o con Alexa 594 (CTB red, CTBr, 1% in PBS, Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, USA), il tracciante Wheat Germ Agglutinin, peroxidase-conjugated (WGA-HRP, 4% in acqua distillata, SIGMA, St Louis, MO, USA), il tracciante Biotinilated Dextran Amine (BDA, 10% tampone fosfato 0.1M, pH 7.4; Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, USA) o il tracciante Fluoro-Ruby (FR, 10% tampone fosfato 0.1M, pH 7.4; Invitrogen-Molecular Probes) sono stati iniettati utilizzando microsiringhe a pressione costituite da micropipette di vetro (diametro della punta di 50-100  $\mu$ m) attaccate all'ago di una microsiringa Hamilton da 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l o 10  $\mu$ l (Reno, NV, USA).

I dati relativi alla localizzazione dei siti di iniezione, al tipo di tracciante utilizzato ed alla quantità di tracciante iniettata sono riassunti nella Tabella 3

Ogni animale, decorso il periodo di sopravvivenza necessario per il trasporto assonale dei traccianti iniettati (28 giorni per la BDA e il Fluoro-Ruby e 12-14 giorni per FB, DY, CTBgreen e CTBred ), è stato anestetizzato con ketamina idrocloruro (15 mg/kg i.m.), trattato con un'iniezione letale i.v. di sodio tiopentale (60 mg/Kg) ed a seguito perfuso attraverso il ventricolo sinistro con, nell'ordine,

soluzione salina, soluzione al 3.5-4% di paraformaldeide ed infine una soluzione al 5% glicerolo. Le soluzioni di paraformaldeide e glicerolo sono state preparate in tampone fosfato 0.1M, pH 7.4 così da garantire il mantenimento dell'osmolarità tissutale. Su ciascun cervello, dopo fissazione del cranio in un apparato stereotassico, è stata fatta una squadratura nel lobo occipitale secondo il piano coronale. Ciascun cervello è stato poi estratto dalla teca cranica, fotografato ed immerso per 3 giorni in una soluzione tamponata di glicerolo al 10% e per 4 giorni in una soluzione al 20%. Il cervello è stato quindi congelato così da permetterne il taglio al microtomo; il taglio è stato attuato in modo tale da ottenere sezioni coronali di 60  $\mu$ m di spessore.

In tutti i casi di iniezioni di traccianti fluorescenti, FB, DY o CTB, una sezione ogni 5 è stata montata, asciugata e rapidamente coperta con coprioggetto per l'analisi al microscopio a fluorescenza. Nei Casi 36r e 37r, una serie su 5 è stata processata per la visualizzazione della BDA, usando il Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) come cromogeno. La reazione di visualizzazione del tracciante è stata inoltre intensificata utilizzando cloruro di cobalto e nichel ammonio solfato. In tutti i casi una serie delle cinque è stata colorata con il metodo di Nissl (tionina, 0.1% in tampone acetato 0.1M pH 3.7). Nel caso 35r e nei casi 36r e 37r in cui la BDA è stata iniettata contemporaneamente al Fluoro-Ruby (la BDA del caso 35r è stata iniettata nella corteccia premotoria ventrale per cui non compare in questi studio), una serie delle 5 è stata processata per la visualizzazione contemporanea di ambedue i traccianti usando una doppia colorazione simile a quella descritta da Morecraft e coll. (2001). In questa procedura le sezioni dei casi 35r, 36r e 37r sono state inizialmente processate per la visualizzazione della BDA come descritto precedentemente, eccetto che per una più rapida incubazione nella soluzione ABC (overnight) e per una reazione di visualizzazione che non prevede intensificazione mediante nickel e cobalto e permette pertanto di ottenere una colorazione meno intensa di tipo marrone. In seguito le fette così reagite per la visualizzazione della BDA e quelle provenienti dal caso 39l, che pur presentando solo un'iniezione di FR è stato processato allo stesso modo allo scopo di ottenere risultati confrontabili rispetto a quelli degli altri casi, sono state trattate con una soluzione di bloccaggio della biotina (Vector SP-2001), lavate in PBS, ed incubate con l'anticorpo primario anti-FR (1:3000; Invitrogen), in 0,3% Triton e 5% di siero bovino in PBS; dopo ulteriore lavaggio in PBS è stata attuata un'incubazione con un anticorpo secondario biotinilato (1:200, Vector) in 0,3% Triton e 5% di siero bovino in PBS. Infine le sezioni sono state incubate con una soluzione di ABC e processate con un cromogeno, il Vector SG peroxidase substrate kit (SK-4700, Vector) che permette di visualizzare il Fluoro-Ruby con una colorazione blu; in questo modo nella stessa fetta è stato possibile visualizzare contemporaneamente la marcatura di Fluoro-Ruby, con colorazione blu, e la marcatura di BDA, con una medio-debole colorazione marrone.

### *Attribuzione della marcatura*

L'attribuzione della marcatura in corrispondenza delle aree della VLPF caudale è stata definita in accordo con i criteri descritti nello studio architettonico.

Per le aree localizzate rostralmente alla 45A ci siamo invece riferiti alla suddivisione architettonica proposta da Carmichael e Price (1994), con l'unica differenza che, in virtù dei nostri dati architettonici ed in accordo con Petrides e Pandya (1994; 2002), il bordo tra l'area 45A e l'area 12r è stato definito in posizione più caudale, a livello dell'IPD..

La corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPF) è stata suddivisa seguendo la parcellazione di Petrides e Pandya (1994; 1999; 2002), con l'unica eccezione dell'area 46, che abbiamo considerato come un'unica entità.

La convessità della corteccia inferotemporale è stata suddivisa in accordo con Saleem e Tanaka, (1996) mentre per il solco temporale (STS) abbiamo seguito la parcellazione proposta da Boussaoud e coll. (1990), per l'STG e le regioni uditive del belt e del parabelt acustico ci siamo invece riferiti alle suddivisioni proposte da Kaas ed Hackett (2000; ma vedasi anche Saleem e coll. 2008). Per quanto riguarda il lobulo parietale inferiore (IPL), nella delimitazione delle aree localizzate in corrispondenza delle regioni della convessità, ci siamo riferiti alla parcellazione architettonica di Gregoriu e coll. (2006) e, nella delimitazione della posizione delle aree localizzate all'interno del solco, sui criteri funzionali ed odologici descritti da Borra e coll. (2008).

### *Analisi quantitativa e distribuzione laminare della marcatura*

In tutti i casi studiati di iniezioni di traccianti retrogradi abbiamo quantificato il trasporto neuronale in ciascun emisfero ipsilaterale al sito di iniezione contando il numero di neuroni marcati in tutte le aree eccetto quella iniettata, utilizzando un campionamento in cui ciascuna sezione studiata dista di 600  $\mu\text{m}$  da quella successiva.

Il numero dei neuroni marcati è estremamente variabile da caso a caso a causa sia della diversa tipologia dei traccianti utilizzati sia del differente numero e delle differenti dimensioni delle iniezioni presenti in ciascun caso nonché in virtù di una certa variabilità individuale da soggetto a soggetto, per cui abbiamo espresso il quantitativo di afferenze corticali proveniente da ciascun area iniettata in termini percentuali, in particolare come numero dei neuroni osservati in ciascun area diviso per il loro numero totale.

In questa tipologia di analisi abbiamo osservato una disomogenea distribuzione di neuroni marcati sia nell'area 46 che nell'area 12r per cui per ottenere una migliore descrizione della distribuzione della marcatura abbiamo arbitrariamente suddiviso l'area 46 in dorsale e ventrale e l'area 12r in

rostrale e caudale.

Infine per ottenere informazioni riguardanti la distribuzione laminare della marcatura, sia di tipo anterogrado che retrogrado, abbiamo analizzato, in sezioni consecutive distanti 300  $\mu\text{m}$  l'una dall'altra, sia la distribuzione laminare dei terminali, per i casi iniettati con BDA e FR, che la percentuale di cellule marcate osservata negli strati superficiali (II-III) contro quelli profondi (V-VI), nei casi iniettati con traccianti retrogradi o retro-anterogradi, .

I dati così ottenuti sono stati interpretati o secondo i criteri di correlazione gerarchico-funzionale usati da Felleman e Van Essen (1991) o secondo il modello strutturale proposto da Barbas e coll.; nei casi in cui i pattern di marcatura non sono stati facilmente interpretabili secondo questo modelli ci siamo limitati ad una descrizione della distribuzione laminare in quanto tale.

**TABELLA 2.**

Specie di scimmia, localizzazione dei siti di iniezione e tipologia di traccianti usati negli esperimenti

<b>Caso</b>	<b>Specie</b>	<b>Emisfero</b>	<b>Area</b>	<b>Tracciante</b>	<b>Quantitativo (µl)</b>
Caso 23	<i>Fascicularis</i>	L	46v	FB 3%	2 X 0,2 µl
Caso 26	<i>Nemestrina</i>	L	45B	DY 2%	1 X 0,2 µl
		L	46v	CTBg 1%	1 X 1 µl
		L	12	FB 3%	1 X 0,2 µl
Caso 30	<i>Nemestrina</i>	R	45B	FB 3%	1 X 0,2 µl
Caso 35	<i>Mulatta</i>	R	8/FEF	FR 10%	1 X 1 µl
Caso 36	<i>Fascicularis</i>	L	8/FEF	DY 2%	1 X 0,2 µl
		L	45B	FB 3%	1 X 0,2 µl
		L	45A	CTBg 1%	1 X 1 µl
		R	8/FEF	FR 10%	1 X 1 µl
		R	45B	BDA 10%	1 X 1 µl
Caso 37	<i>Mulatta</i>	L	8/FEF	CTBg 1%	1 X 1 µl
		L	8r	CTBr 1%	1 X 1 µl
		L	45A	FB 3%	2 X 0,2 µl
		R	45A	BDA 10%	1 X 1 µl
		R	45B	FR 10%	1 X 1
Caso 39	<i>Fascicularis</i>	L	45A	FR 10%	2 X 1
		R	8r	FB 3%	1 X 0,2 µl
		R	12	DY 2%	1 X 0,2 µl

# 3. Risultati

## 3.1 Studio architettonico

Lo studio architettonico ci ha permesso di definire e delimitare 6 aree totalmente o parzialmente localizzate all'interno della VLPF caudale.

Due di queste, l'area 8/FEF e l'area 45B, decorrono lungo il banco anteriore del solco arcuato; l'area 8/FEF è situata più dorsalmente ed ha una localizzazione anatomica pressochè coincidente con quella della regione fisiologicamente definita come FEF; l'area 45B è localizzata più ventralmente, e si estende dalla metà ventrale del solco arcuato fino a giungerne in prossimità della fine; le restanti quattro aree sono localizzate in corrispondenza della convessità situata anteriormente rispetto al solco arcuato: l'area 8r si trova rostralmente rispetto all'area 8/FEF e si estende fino alla punta posteriore del PS; l'area 45A giace ventralmente rispetto all'area 8r e rostralmente rispetto all'area 45B e si estende fino all'IPD; l'area 45A è delimitata dorsalmente dall'area 46 e ventralmente dall'area 12; il bordo tra l'area 45A e l'area 46 è localizzato a circa 2-3mm dal PS mentre l'area 12 si estende ventralmente fino alla riflessione che delimita la corteccia orbitofrontale.

### *Area 8/FEF*

Nella parte più caudale della VLPF ed in particolare nel banco anteriore del solco arcuato giace l'area 8/FEF. Sebbene in sezioni coronali questo settore corticale sia difficilmente visualizzabile in quanto sezionato quasi tangenzialmente anche in sezioni di questo tipo, (Fig. 3, A e A1), è stato possibile osservare la principale caratteristica morfologica che identifica questo settore corticale: la presenza di numerose e grosse cellule piramidali nelle profondità del V strato. Sezioni parasagittali, perpendicolari all'IAS e tangenziali all'arcuato (Figure 4-7) hanno fornito una migliore e complementare visualizzazione delle caratteristiche architettoniche di questo settore corticale. In tutti i differenti tipi di taglio è stato evidente che l'area 8/FEF è pressochè completamente confinata nel banco anteriore del solco arcuato; inoltre benchè con estrema variabilità individuale è stato interessante notare che all'interno di ciascun caso le grosse cellule piramidali del V strato caratterizzanti l'area sono: a) di dimensioni maggiori rispetto a quelle delle cellule piramidali del III strato; b) di dimensioni maggiori rispetto a quelle di tutte le cellule piramidali della VLPF; c) di dimensioni confrontabili con quelle delle cellule piramidali del V strato dell'adiacente corteccia premotoria. Altre evidenti caratteristiche dell'area 8/FEF sono: un ben distinguibile II strato, un III

strato che presenta, soprattutto nelle porzioni più ventrali dell'area, relativamente numerose cellule piramidali ed un IV strato sottile ma ben evidente (Fig. 8A).

Mieloarchitettonicamente l'area 8/FEF è l'area, tra tutte le aree della VLPF caudale, che ha evidenziato il maggiore grado di mielinizzazione (Fig. 9A); la principale caratteristica mieloarchitettonica di quest'area è inoltre la presenza di plessi di fibre orizzontali e verticali molto densi che si estendono fino a giungere alle porzioni corticali più superficiali (Fig. 10, A e A1).

L'analisi qualitativa dell'SMI-32 è stata estremamente indicativa per delimitare l'area 8/FEF e confermarne i bordi osservati negli studi cito e mieloarchitettonici. Sia in sezioni coronali (Fig. 11), parasagittali (Fig. 12) che tangenziali all'IAS (Fig. 13), abbiamo evidenziato, già a basso ingrandimento, la presenza di numerose cellule piramidali di differente dimensione in corrispondenza del III strato, nel quale inoltre i dendriti apicali erano confinati nelle porzioni più profonde. Nel V strato abbiamo osservato un'evidente banda di neuropilo e numerose cellule piramidali di grossa dimensione; il fatto che queste cellule siano sembrate essere meno numerose rispetto a quelle osservate nelle sezioni analizzate per gli studi di citoarchitettonica, suggerisce che costituiscano solo una sottopopolazione della totalità delle cellule piramidali presenti nell'area (immagini ad alto ingrandimento dell'area sono osservabili nelle Figure 12, pannelli C e E; 13 pannello D; 14 pannello A).

L'analisi quantitativa condotta sulla numerosità laminare delle cellule immunopositive all'SMI-32 ha evidenziato un effetto principale Area [ $F(4;68)=29.438$ ,  $p<0.001$ ] e strato [ $F(1;17)=23.242$ ,  $p<0.001$ ] ed un significativo effetto di interazione (Area x strato) [ $F(4;68)=17.474$ ,  $p<0.001$ ]. Coerentemente con le osservazioni qualitative, nell'area 8/FEF la numerosità delle cellule piramidali nel V strato è risultata significativamente ( $p<0.001$ ) superiore rispetto a quella di tutte le altre aree della VLPF caudale, con l'unica eccezione dell'area 8r rispetto alla quale la numerosità di cellule piramidali è risultata del tutto confrontabile e non significativamente differente (Fig. 14G).

#### *Area 45B*

Rostro-ventralmente l'area 8/FEF confina con l'area 45B; il bordo tra le 2 aree è stato individuato in corrispondenza della metà circa della lunghezza, in senso dorso-ventrale, dell'IAS; ventralmente l'area si estende fino a giungere in prossimità della fine del solco arcuato. Nella totalità della sua estensione l'area 45B è confinata quasi completamente all'interno del banco dell'arcuato e si estende solo marginalmente nell'adiacente convessità (Fig. 3 pannelli B, B1, C e C1).

La principale caratteristica citoarchitettonica dell'area 45B è la presenza di grosse cellule piramidali in corrispondenza delle porzioni profonde del III strato. Immagini a grosso ingrandimento (Fig. 4, pannelli C e D; Fig. 6 pannelli B e C; Fig. 8 pannello B) hanno evidenziato che le grosse cellule

piramidali del III strato caratterizzanti l'area sono facilmente identificabili rispetto ad una popolazione cellulare omogenea sia come densità che come dimensione. Benchè la dimensione e la numerosità delle grosse cellule piramidali del III strato fosse notevolmente variabile nei differenti casi, all'interno di ciascuno di essi queste cellule presentavano una dimensione comunque sempre superiore rispetto a quella delle cellule piramidali del V strato e comparabile, se non superiore, alla dimensione delle grosse cellule piramidali del V strato dell'area 8/FEF. L'area 45B si caratterizza inoltre per un sottile ma ben distinguibile II strato, per un denso ed evidente IV strato ed un V strato che presenta cellule distribuite diffusamente, non è sublaminato ed è pressochè completamente popolato di cellule piramidali di piccole dimensioni, solo occasionalmente più grandi in corrispondenza delle porzioni più profonde (Fig. 8B).

In sezioni coronali il bordo tra l'area 8/FEF e l'area 45B è stato localizzato ventro-caudalmente a circa 1-2 mm rispetto alla punta posteriore del PS. In qualsiasi tipo di sezione: coronale, parasagittale e perpendicolare o tangenziale al solco arcuato, il bordo tra le due aree è stato delimitato dove si osservano la scomparsa delle grosse cellule piramidali caratterizzanti il V strato dell'area 8/FEF e la comparsa delle grosse cellule piramidali caratterizzanti lo strato IIIc dell'area 45B (Fig. 4 pannelli C e D; Fig. 6 pannello B; Fig. 7 pannello B); questo bordo osservato su sezioni tangenziali, ha evidenziato una localizzazione anatomica del tutto comparabile con il bordo ventrale dei FEF, definito su sezioni dello stesso tipo (Stanton e coll. 1989) (Fig. 4 pannelli A e B; Fig. 7 pannello A); alla luce di queste osservazioni l'area 45B può essere dunque definita in parte anche funzionalmente, ovvero come la controparte architettonica della porzione del banco anteriore dell'arcuato nella quale con stimoli a bassa soglia non è possibile indurre movimenti oculari di tipo saccadico.

Per gran parte della sua estensione l'area 45B confina caudalmente, in corrispondenza del fondo dell'IAS, con un settore disgranulare recentemente definito architettonicamente e denominato area 44 (Petrides e Pandya 2005; Belmalih e coll. 2008) (Fig. 3, pannelli B e C).

Ventralmente, l'area 45B confina con un settore granulare che decorre dalla corteccia prearcuata a quella postarcuata e che talvolta si estende dorsalmente anche in corrispondenza della parte più ventrale del solco arcuato (Fig. 4 A e Fig. 7, A e C); quest'area granulare è stata da noi considerata parte dell'area 12l, come definita da Carmichael e Price (1994).

L'analisi mieloarchitettonica (Fig. 9, pannelli B e C) ha confermato la localizzazione anatomica dell'area 45B osservata nello studio citoarchitettonico e ha evidenziato inoltre che benchè il grado di mielinizzazione dell'area sia risultato relativamente elevato era comunque inferiore rispetto a quello dell'adiacente area 8/FEF, area dalla quale l'area 45B si distingueva ulteriormente per la presenza di sottili fibre verticali che terminavano in corrispondenza di un evidente banda di Baillarger esterna (Fig. 10, pannelli B e B1).

L'analisi qualitativa dell'SMI-32 ha evidenziato nell'area 45B un'immunoreattività relativamente elevata soprattutto nelle porzioni più profonde del III strato dove sono stati osservati numerosi dendriti apicali e molte cellule piramidali (Fig. 11, B, B1, C e C1; Fig. 12, A e B; Fig. 13, B e C). Le numerose cellule piramidali di grosse dimensioni delle porzioni più profonde del III strato sembrerebbero corrispondere alle grosse cellule piramidali osservate negli studi citoarchitettonici. Il V strato differentemente dall'area 8/FEF è pressochè privo di cellule piramidali e ha evidenziato complessivamente un'immunoreattività più modesta.

Anche l'analisi quantitativa ha confermato il dato qualitativo: la densità delle cellule immunopositive nel V strato è infatti risultata significativamente inferiore rispetto a quella osservata nell'area 8/FEF ( $p < 0.001$ ) (Fig. 14, pannello G).

### *Area 8r*

L'area 8r è situata nella porzione più caudale della convessità prearcuata e si estende rostralmente fino a raggiungere ed in alcuni casi includere la parte più caudale del PS (Fig 3, B e B1; Fig. 4A e 5A), ventralmente confina con l'area 45B e caudalmente con l'area 8/FEF.

Dal punto di vista morfologico l'area è caratterizzata da un ridotto spessore corticale per il quale si distingue rispetto a tutte le altre aree della VLPF (Fig. 8D); citoarchitettonicamente l'area presenta un III strato relativamente sottile, denso ed omogeneo, un IV strato difficilmente delimitabile rispetto agli adiacenti III e V strato ed infine un V strato popolato da piramidi di piccole dimensioni densamente raggruppate tra loro e solo leggermente più grandi nelle porzioni più profonde.

L'area 8r ha evidenziato un grado di mielinizzazione notevolmente inferiore rispetto alle adiacenti aree 45B ed 8/FEF (Fig. 9B), sottili fibre verticali e due bande di Baillarger: una esterna, meno evidente, ed una interna, più facilmente distinguibile (Fig. 10, D e D1).

L'analisi qualitativa delle sezioni processate per la visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 ha evidenziato una minore immunoreattività, soprattutto nel III strato, dove ridotta, rispetto a quella osservata nelle adiacenti aree 45B ed 8/FEF, è stata la presenza di dendriti apicali immunoreattivi (Fig. 11, B e B1, 12, A e B, 13A). Nel III strato le cellule piramidali erano piccole e confinate nelle porzioni più profonde e sebbene qualitativamente sembrassero essere in numero inferiore rispetto a quelle osservate nell'area 45B e nell'area 8/FEF, quantitativamente la loro densità non è risultata significativamente differente (Fig. 14G); questa discrepanza tra le osservazioni qualitative e l'analisi quantitativa si è rivelata giustificabile in virtù del ridotto spessore del III strato, rispetto a quello osservato nelle aree 45B ed 8/FEF. Il V strato è caratterizzato da un'immunoreattività qualitativamente superiore rispetto a quella dell'area 45B e del tutto comparabile rispetto a quella osservata nell'area 8/FEF; la densità delle numerose cellule piramidali

di piccole dimensioni caratterizzanti questo strato sebbene quantitativamente non significativamente differente rispetto a quella dell'area 8/FEF ( $p < 0.001$ ) è risultata significativamente superiore rispetto a quella di tutte le altre aree della VLPF caudale (Fig. 12G).

#### *Area 45A*

L'area 45A giace nel settore della convessità situato rostralmente rispetto all'area 8r ed all'area 45B all'interno del quale si estende fino all'IPD. La principale caratteristica citoarchitettonica che distingue l'area 45A dalle adiacenti aree della VLPF caudale è l'evidente incremento delle dimensioni cellulari che abbiamo osservato dalle porzioni più superficiali del III strato a quelle più profonde; le cellule piramidali delle porzioni più profonde del III strato dell'area 45A si distinguevano inoltre da quelle caratterizzanti l'adiacente area 45B per dimensioni chiaramente inferiori ed in quanto apparivano, sebbene ad osservazioni puramente qualitative, in numero più elevato (Fig. 3, C, C1, D e D1, 5, B e C e 8C).

Ulteriori caratteristiche citoarchitettoniche dell'area 45A (Fig. 8C) sono un II strato difficilmente distinguibile rispetto all'adiacente III strato, un IV strato granulare molto evidente ed un V strato relativamente denso e popolato da numerose cellule piramidali di piccole dimensioni.

L'area 45A mieloarchitettonicamente ha evidenziato un elevato grado di mielinizzazione, un contenuto di mielina relativamente elevato anche negli strati superficiali (Fig. 9, C e D e 10, C e C1), sottili ed addensati fasci di fibre verticali ed infine due bande di Baillarger, delle quali la più esterna maggiormente marcata.

L'analisi delle sezioni processate per la visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 si è rivelata estremamente utile per evidenziare i bordi tra l'area 45A, che presenta un'immunoreattività relativamente elevata, con le adiacenti aree 46 e 12, nelle quali al contrario abbiamo osservato una brusca caduta della densità di neuropilo e di cellule immunopositive (Fig. 11, C, C1, D e D1 e 13, B e C); l'analisi qualitativa delle sezioni trattate per la visualizzazione di questa sottopolazione cellulare ha evidenziato (Fig. 14C) un denso III strato relativamente ricco di piccole cellule piramidali, che concentravano principalmente nelle porzioni più profonde dello strato, e numerosi dendriti apicali, che in molti casi ne raggiungevano le porzioni più superficiali. Nel V strato benchè la densità cellulare fosse relativamente bassa il neuropilo ci è apparso più denso rispetto a quello osservato nel V strato dell'area 45B.

L'analisi quantitativa (Fig. 14G) ha confermato la relativa densità cellulare nel III strato osservata nell'analisi qualitativa: la densità delle cellule piramidali in questo strato è infatti significativamente superiore rispetto sia alla densità di cellule piramidali osservata nell'area 45B ( $p < 0.01$ ) che rispetto a quella osservata nell'area 46v ( $p < 0.001$ ). Nel V strato dove le cellule immunopositive sono in

numero esiguo, la loro densità è risultata significativamente inferiore rispetto a quella osservata nel corrispondente V strato delle aree 8/FEF ed 8r ( $p < 0.001$ ).

#### *Area 46*

L'area 45A confina dorsalmente con l'area 46, il cui bordo ventrale è localizzato a circa a 2-3mm rispetto alla cresta del PS (Figs. 3, C, C1, D e D1 e 5B).

L'area 46 è caratterizzata, citoarchitettonicamente, da un evidente ma sottile II strato, un III strato molto denso ed omogeneamente popolato di cellule piramidali di piccole dimensioni, un IV strato ben sviluppato e densamente popolato di granuli ed un V strato anch'esso popolato di numerose cellule piramidali di piccole dimensioni. Il VI strato abbastanza omogeneo in prossimità del bordo con l'area 45A, è chiaramente sublaminato in corrispondenza della parte dell'area confinata all'interno del PS; tranne che per questo differente grado di sublaminazione le caratteristiche dell'area si mantengono costanti lungo tutta la sua estensione.

L'area 46 ha evidenziato un grado di mielinizzazione relativamente basso (Fig. 9, C e D), nettamente inferiore rispetto a quello dell'adiacente area 45A, fasci di fibre densi ma molto sottili e due bande di Baillarger evidenti ma poco marcate (Fig. 10, E e E1).

L'immunoreattività all'SMI-32, in quest'area, è risultata considerevolmente più bassa rispetto a quella osservata nelle adiacenti aree 45A (Fig. 11, C, C1, D e D1 e 13B) ed 8r (Fig. 12, A e B); il III strato ha evidenziato un quantitativo di neuropilo relativamente ridotto e cellule piramidali rade e di piccole dimensioni; anche il V strato sebbene abbia evidenziato una facilmente riconoscibile banda di neuropilo è anch'esso risultato molto povero di cellule marcate (Fig. 14E). L'analisi quantitativa ha confermato le osservazioni qualitative: nel III strato la densità delle cellule immunopositive è risultata infatti significativamente inferiore rispetto a quella di tutte le altre aree studiate ( $p < 0.001$ ), tranne che per l'area 45B; nel V strato la popolazione di cellule marcate ha mostrato una densità significativamente inferiore rispetto a quella di tutte le aree studiate ( $p < 0.01$ ).

#### *Area 12*

Ventralmente l'area 45A confina con una regione che sia dal punto di vista architettonico che per localizzazione anatomica sembra corrispondere al settore dell'area 12 (Fig. 3, D e D1) definito da Carmichael e Price (1994) come area 12l. L'area 12l si estende ventralmente fino alla riflessione orbitale e rostralmente fino all'IPD e ha evidenziato, analogamente all'adiacente area 45A, un incremento delle dimensioni cellulari dalle porzioni più superficiali a quelle più profonde del III strato; il III strato dell'area 12l pur presentando caratteristiche simili è stato comunque facilmente

distinguibile da quello dell'adiacente area 45A in quanto contraddistinto dalla presenza di cellule piramidali di dimensioni relativamente ridotte (Fig. 6C e 15D). Ulteriori caratteristiche citoarchitettoniche caratterizzanti questo settore dell'area 12 sono inoltre: un relativamente profondo I strato, un sottile benchè evidente II strato, un IV strato ben definito e densamente popolato di granuli ed un V strato chiaramente sublaminato con sparse piramidi di grosse dimensioni soprattutto nelle porzioni più profonde, strato Vb (Fig. 8F).

Mieloarchitettonicamente l'area 12l pur presentando caratteristiche simili all'area 45A, quali la presenza di fitti e sottili fasci di fibre verticali e due evidenti bande di Baillarger, se ne è distinta per un minor grado di mielinizzazione (Fig. 10, F e F1).

Nelle sezioni processate per la visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 (Fig. 11, D e D1, 13H e 14F) il III strato è risultato caratterizzato, principalmente nelle sue porzioni più profonde, da sparse ma intensamente marcate cellule piramidali di piccole dimensioni e da un contenuto di neuropilo relativamente basso e limitato esclusivamente alla metà inferiore dello strato. Le dimensioni ridotte ed il numero limitato delle cellule piramidali nel III strato ed un quantitativo relativamente basso di neuropilo nel V strato hanno rappresentato ulteriori parametri di distinzione dell'area 12l rispetto all'adiacente area 45A.

Rostralmente l'area 45A (Fig. 3, E e E1) confina con un altro settore dell'area 12 che sembra corrispondere all'area 12r di Carmichael e Price (1994). Questo settore si è contraddistinto citoarchitettonicamente dall'area 45A per un III strato denso ed omogeneamente popolato di piramidi di piccole dimensioni; in particolare la scomparsa del gradiente delle dimensioni cellulari caratterizzante il III strato dell'area 45A ha costituito il principale criterio architettonico che ci ha permesso di delimitare il bordo tra le due aree. Le sezioni processate per la visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 hanno evidenziato numerose cellule piramidali intensamente marcate e localizzate pressochè esclusivamente nella metà inferiore del III strato ed un contenuto di neuropilo relativamente ridotto e localizzato sia negli strati supragranulari che infragranulari (Fig. 11, pannello D1).

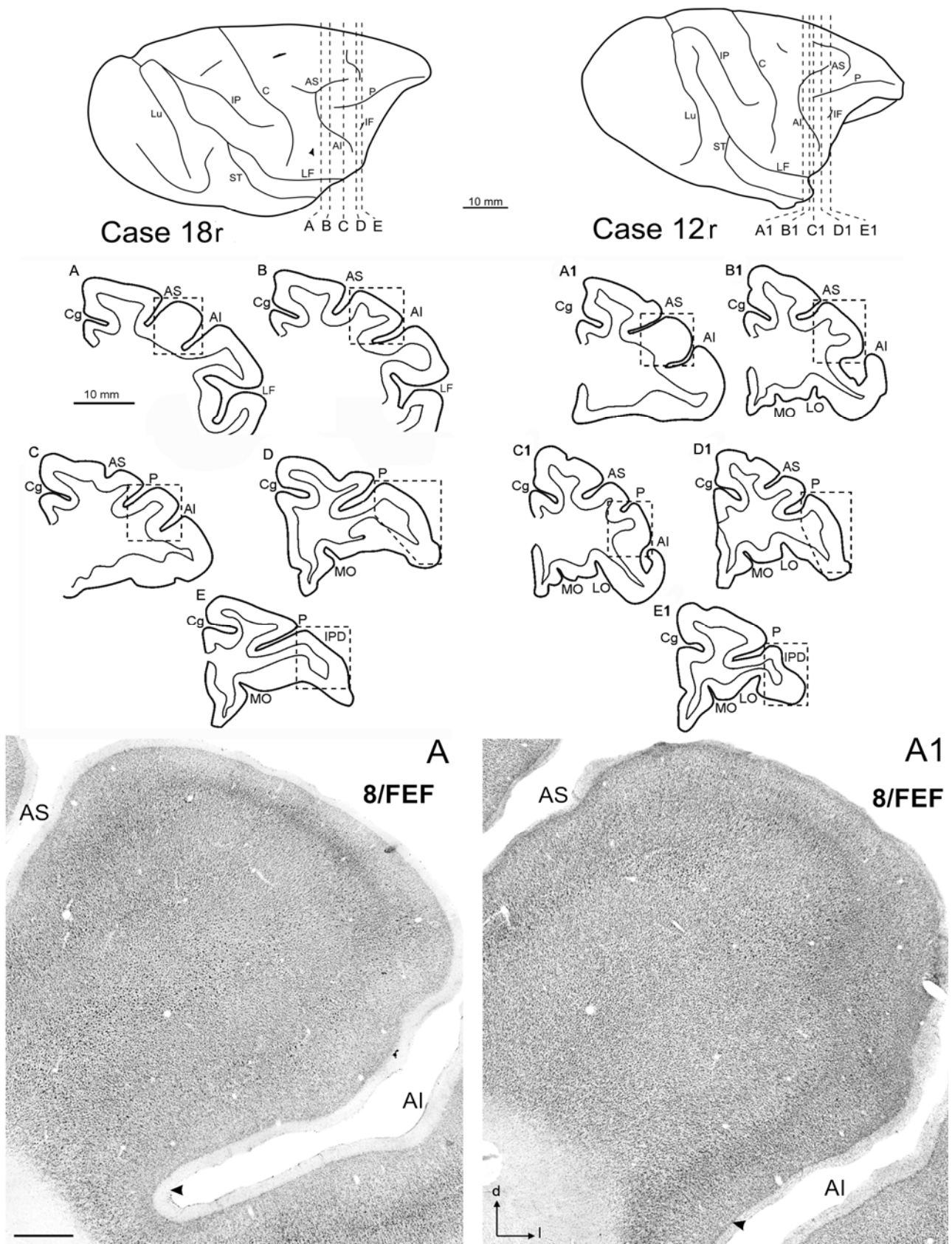


Figura 3

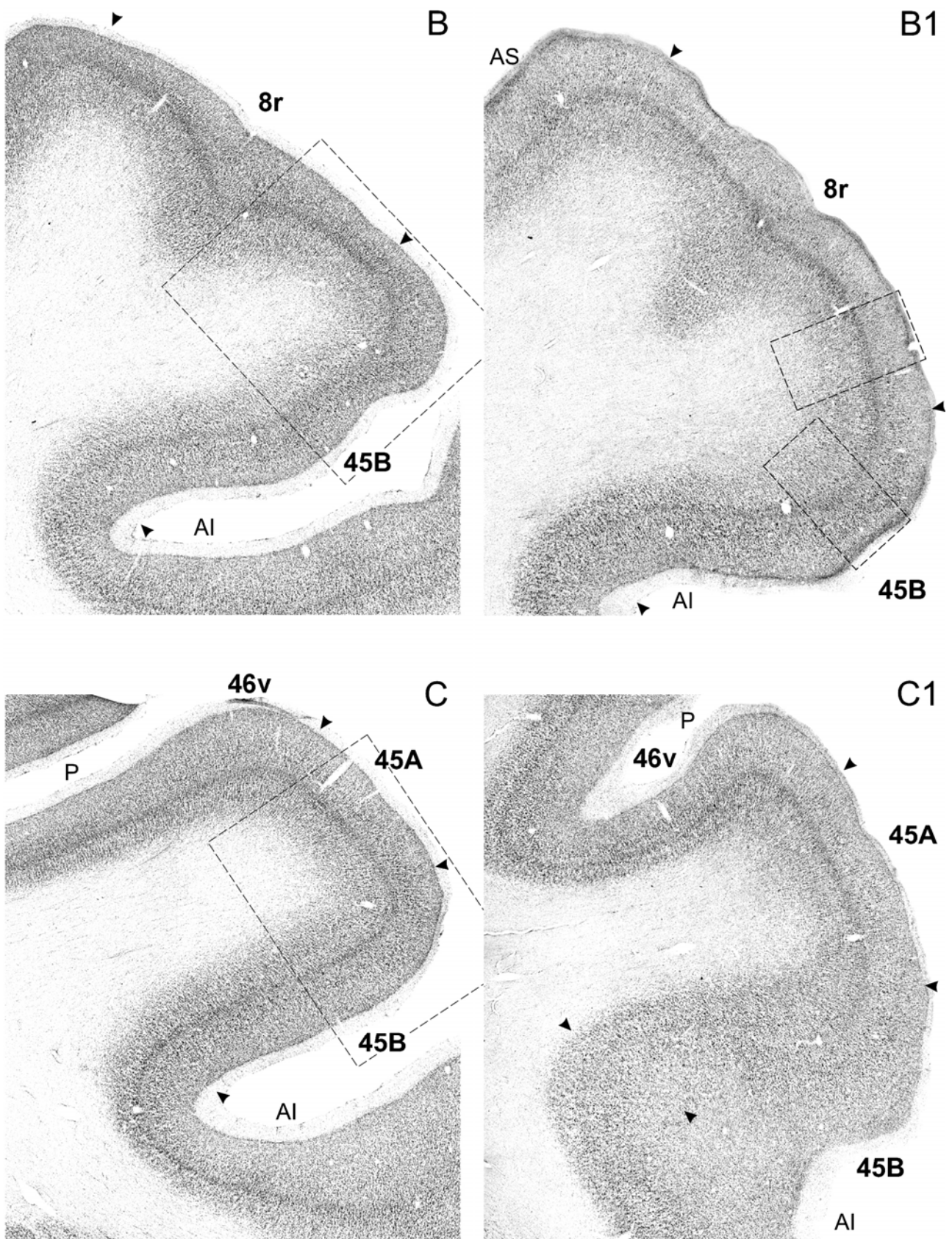
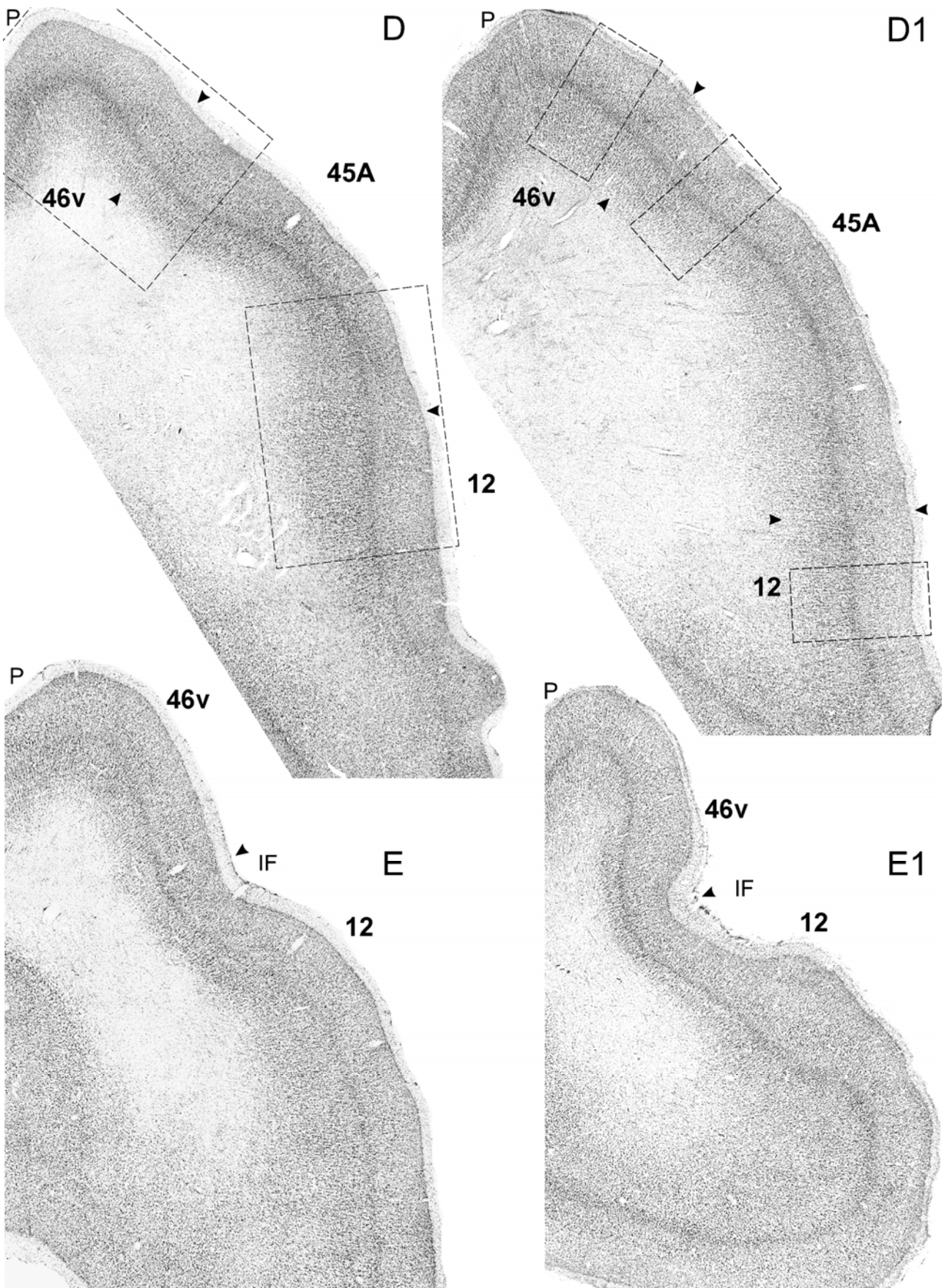


Figura 3



**Figura 3**

**Figura 3.** Citoarchitettura della parte caudale della VLPF. **A-E:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni coronali collocate in ordine caudo-rostrale, trattate con la colorazione di Nissl e provenienti dal caso 18r. **A1-E1:** Immagini fotografiche di sezioni coronali trattate con la colorazione di Nissl provenienti dal caso 12r e prese ad un livello antero-posteriore analogo a quello delle sezioni dei pannelli A-E. In tutte le immagini fotografiche le frecce indicano i bordi tra le aree architettoniche. Scala = 1 mm in A (applicata a tutte le immagini fotografiche). I livelli a cui sono prese le sezioni coronali corrispondono alle linee tratteggiate sui disegni bidimensionali degli emisferi. Le linee tratteggiate sui disegni delle sezioni coronali indicano la posizione da cui sono state prese le immagini fotografiche, le linee tratteggiate sulle immagini fotografiche dei pannelli B, C e D indicano la localizzazione da cui sono stati presi gli ingrandimenti delle immagini fotografiche della figura 15. Le linee tratteggiate nei pannelli B1 e D1 indicano la posizione da cui sono state tratte le immagini fotografiche ad alto ingrandimento della figura 8. C = solco centrale; Cg = solco cingolato; IP = solco intraparietale; l = laterale; LF = solco laterale; LO = solco laterale orbitale; Lu = solco lunato; MO = solco orbitale mediale; ST = solco temporale superiore. Altre abbreviazioni come nelle figure 1 e 2.

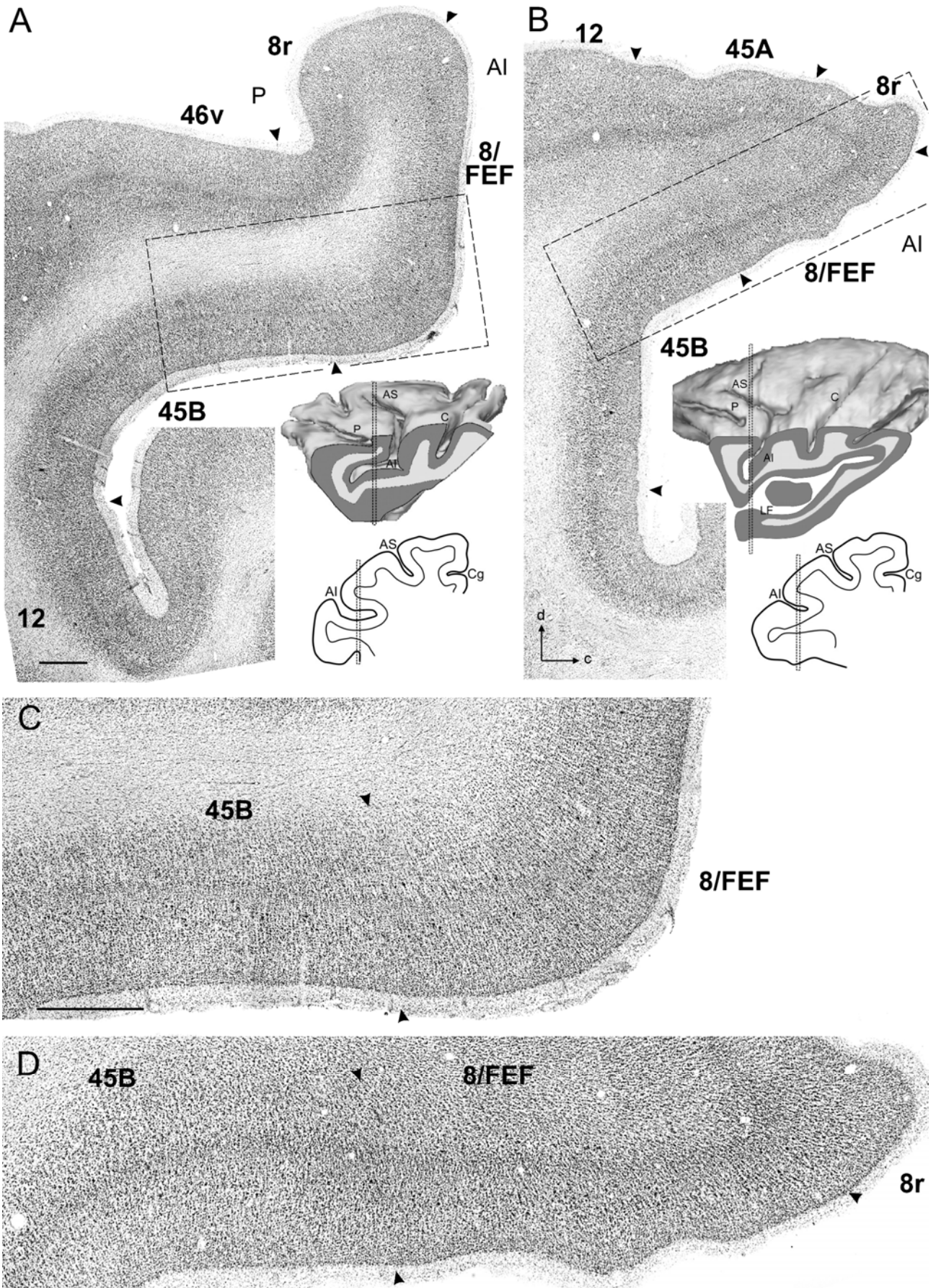
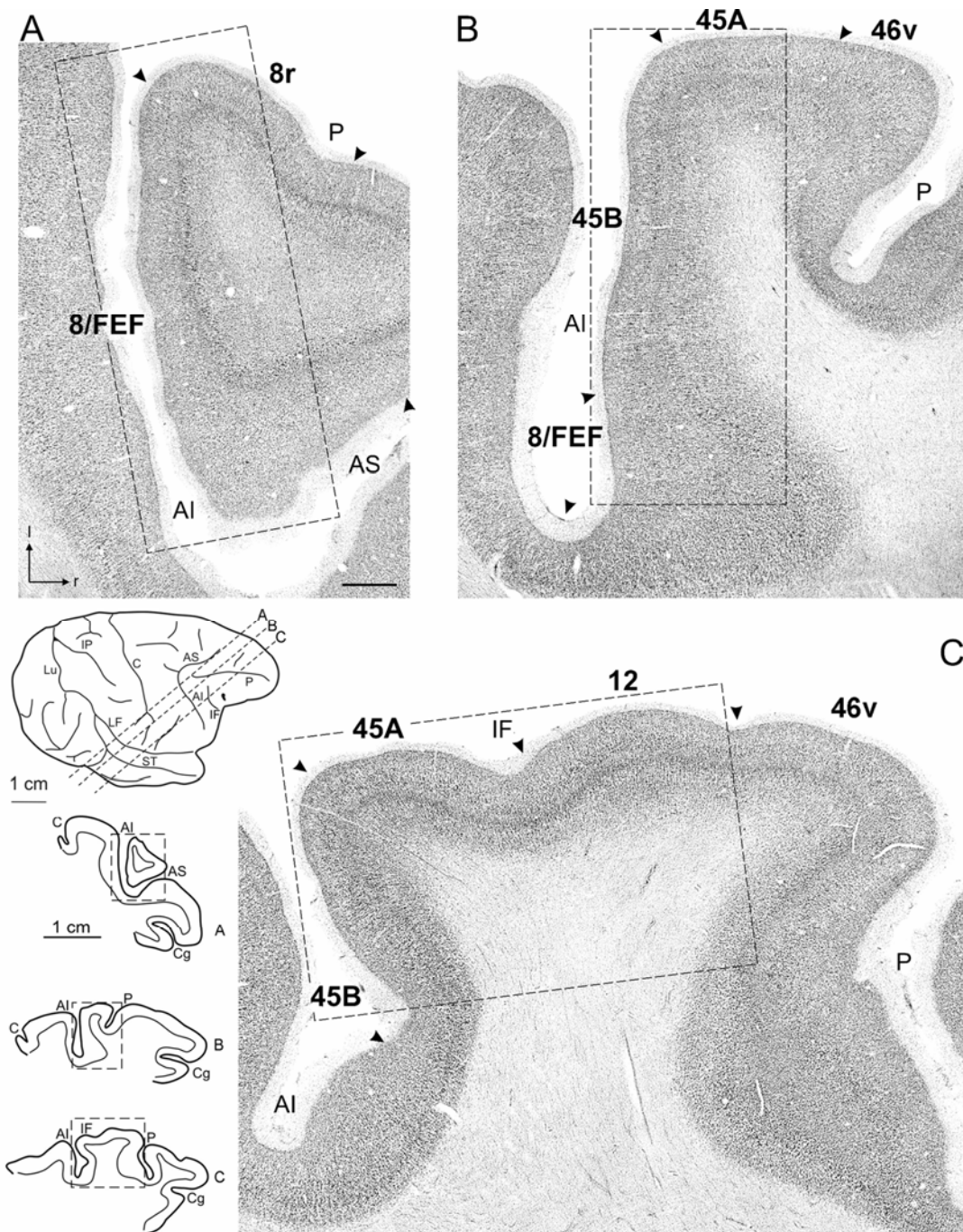


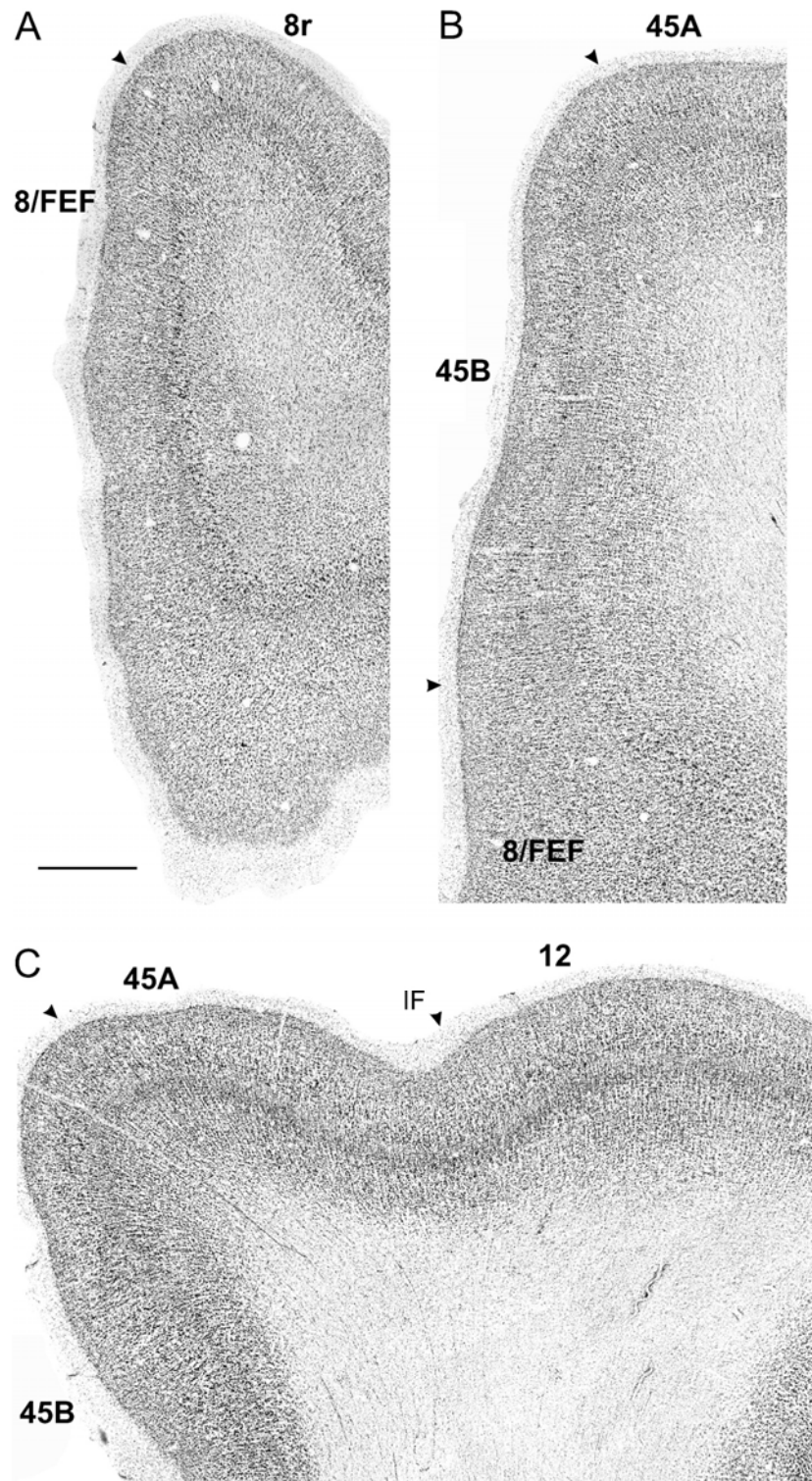
Figura 4

**Figura 4.** Citoarchitettura della VLPF caudale. **A:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni parasagittali trattate con la colorazione di Nissl provenienti dal Caso M41. **B:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni parasagittali trattate con la colorazione di Nissl provenienti dal Caso PR20 e presentate come emisfero sinistro. Scala = 1 mm in A (applicata anche a B). L'orientamento della sezione in B è uguale a quello in A. In ambedue i pannelli A e B, una ricostruzione 3D dell'emisfero mostra il livello a cui è stata presa la sezione mentre il disegno della sezione coronale ottenuto dalla dissezione di ciascuna ricostruzione 3D mostra il livello antero-posteriore (AP) del bordo tra l'area 8/FEF e l'area 45B. Il rettangolo tratteggiato sulla ricostruzione 3D indica il livello a cui è stata attuata la dissezione coronale. Il rettangolo tratteggiato sulle sezioni coronali indica il livello medio-laterale da cui è stata presa l'immagine fotografica della sezione parasagittale.

**C:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della regione di transizione tra le aree architettoniche 8/FEF e 45B prese dalla sezione parasagittale mostrata in A. **D:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della regione di transizione tra le aree 8/FEF e 45B prese dalla sezione parasagittale mostrata in B. La posizione a cui sono state prese le immagini fotografiche dei pannelli **C** e **D** sono indicate da rettangoli tratteggiati in A e B. Scala= 1 mm in C (applicata anche a D). c = caudale; Altre abbreviazioni come nelle figure 1 e 3.



**Figura 5.** Citoarchitettura della VLPF caudale. A-C: Immagini fotografiche basso ingrandimento di sezioni perpendicolari all'IAS trattate con la colorazione di Nissl, collocate in ordine dorso-ventrale e provenienti dal caso PR 17. Scala = 1 mm in A (applicata anche ad A-C). L'orientamento delle sezioni in A è applicato anche a i pannelli B e C. I livelli dorso-ventrali da cui sono state tratte le immagini fotografiche sono indicati dalle linee tratteggiate sui disegni delle visioni dorsolaterali degli emisferi. I rettangoli tratteggiate sui disegni delle sezioni indicano le posizioni da cui sono state prese le immagini fotografiche. I rettangoli tratteggiate indicati su ciascuna immagine fotografica indicano la posizione da cui sono state tratte le immagini ad alto ingrandimento della figura 6. Altre abbreviazioni come nelle figure 1-3.



**Figura 6.** Citoarchitettura della VLPF caudale. Immagini fotografiche ad alto ingrandimento delle aree 8/FEF e 8r (A), 45B (B) e 45A e 12 (C). La parte della corteccia da cui sono state tratte le immagini fotografiche è indicata da rettangoli tratteggiati sulle immagini fotografiche della figura 5. Le frecce indicano i punti di transizione tra diverse le diverse aree architettoniche. Scala = 1 mm in A (applicata anche A-C). Altre abbreviazioni come nelle figure 1-3.

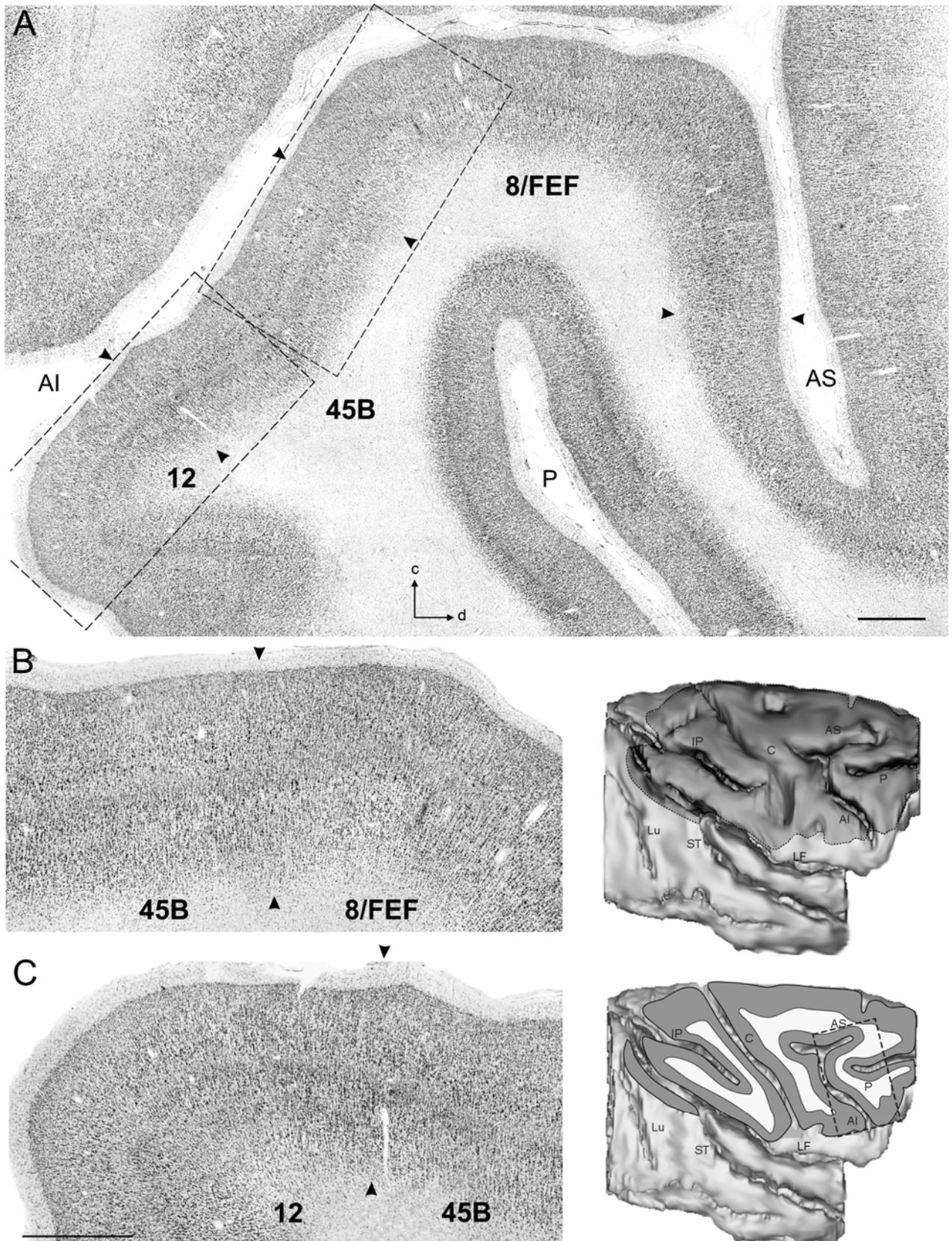
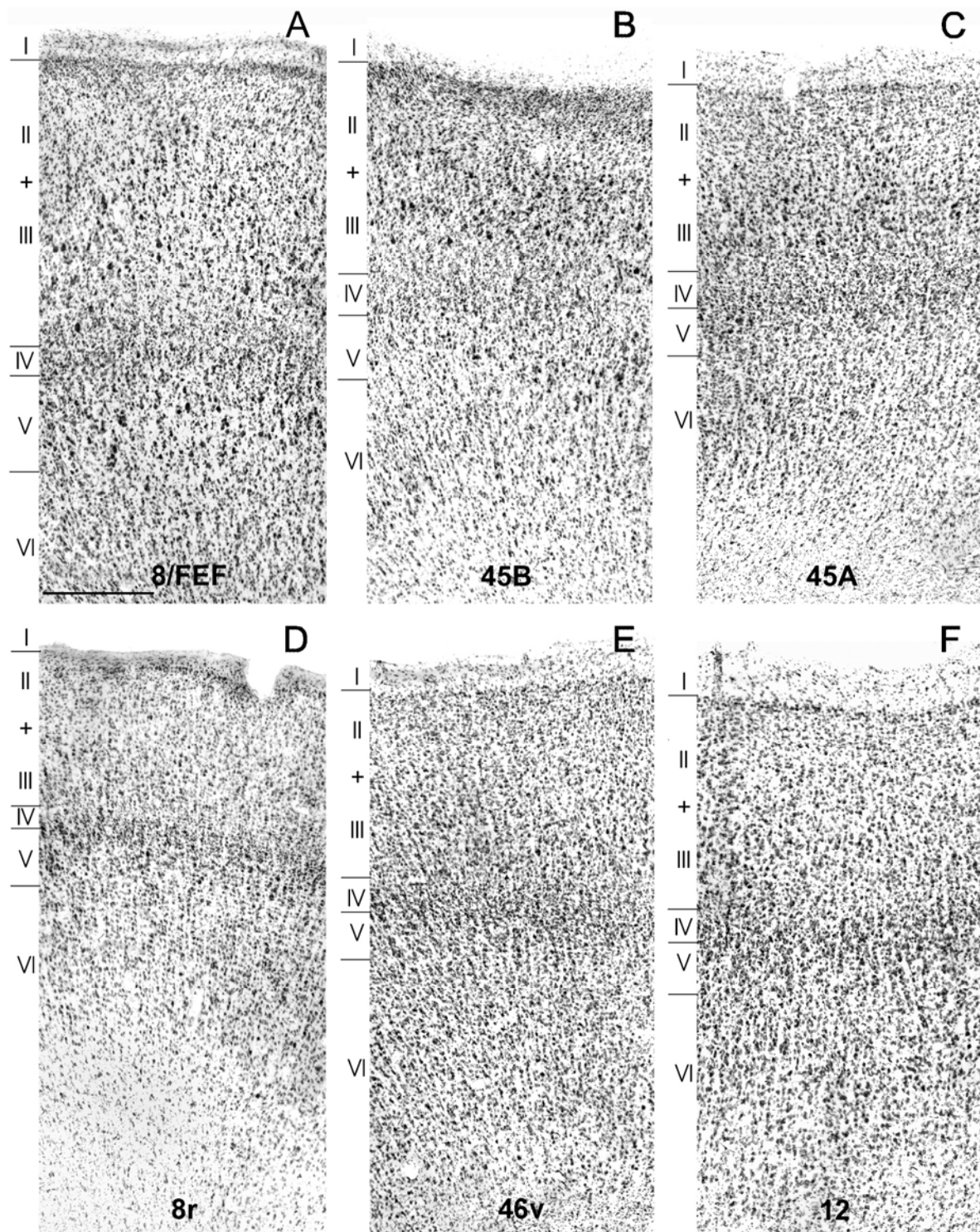
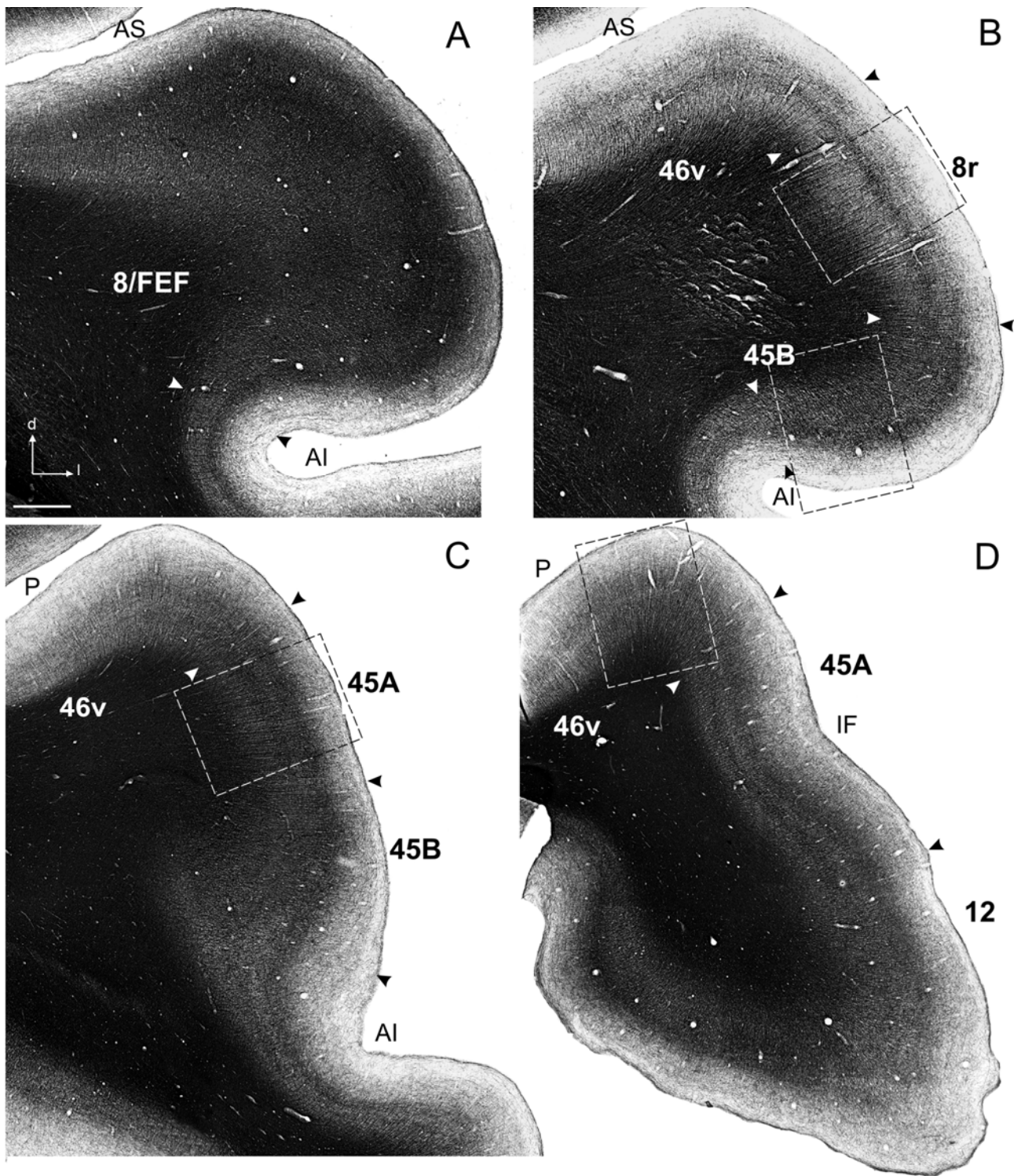


Figura 7

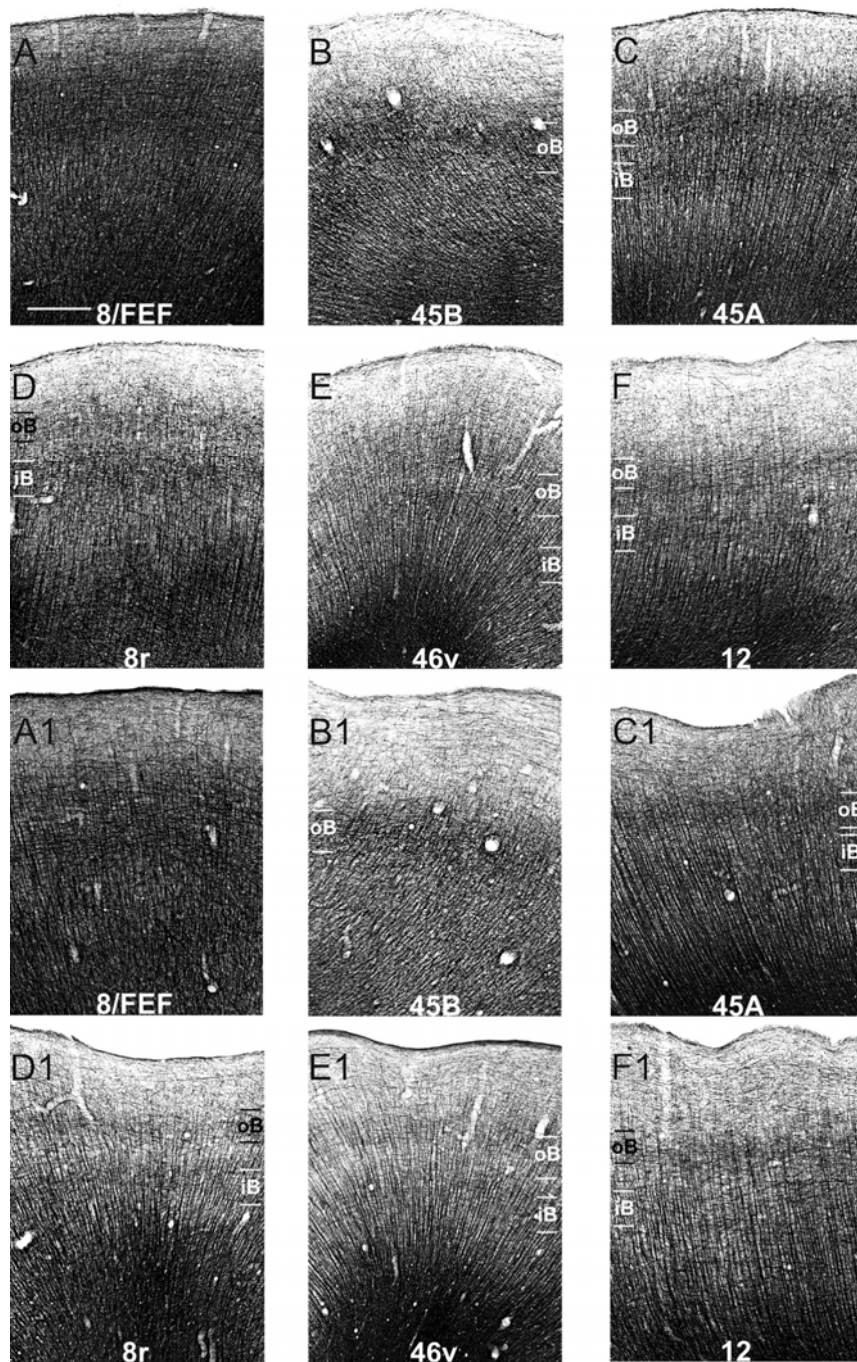
**Figura 7.** Citoarchitettura della VLPF caudale. **A:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni tangenziali al IAS trattate con la colorazione di Nissl e provenienti dal Caso PR18. La ricostruzione 3D nella parte superiore mostra, in grigio, la parte del cervello dissezionata allo scopo di esporre la superficie corticale mostrata nella ricostruzione 3D della parte inferiore della figura e corrispondente alla sezione tangenziale fotografata. Il rettangolo tratteggiato nella ricostruzione 3D rappresenta il livello a cui è stata presa la sezione fotografata. Scala = 1 mm. **B:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della regione di transizione tra le aree 8/FEF e 45B. **C:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della regione di transizione tra le aree 45A e 12. Le porzioni corticali da cui sono state tratte le immagini fotografiche dei pannelli B e C è indicata da rettangoli tratteggiati sulle immagine fotografica del pannello A. Scala = 1 mm in C (applicata anche a B). Altre abbreviazioni come nelle figure 1-3.



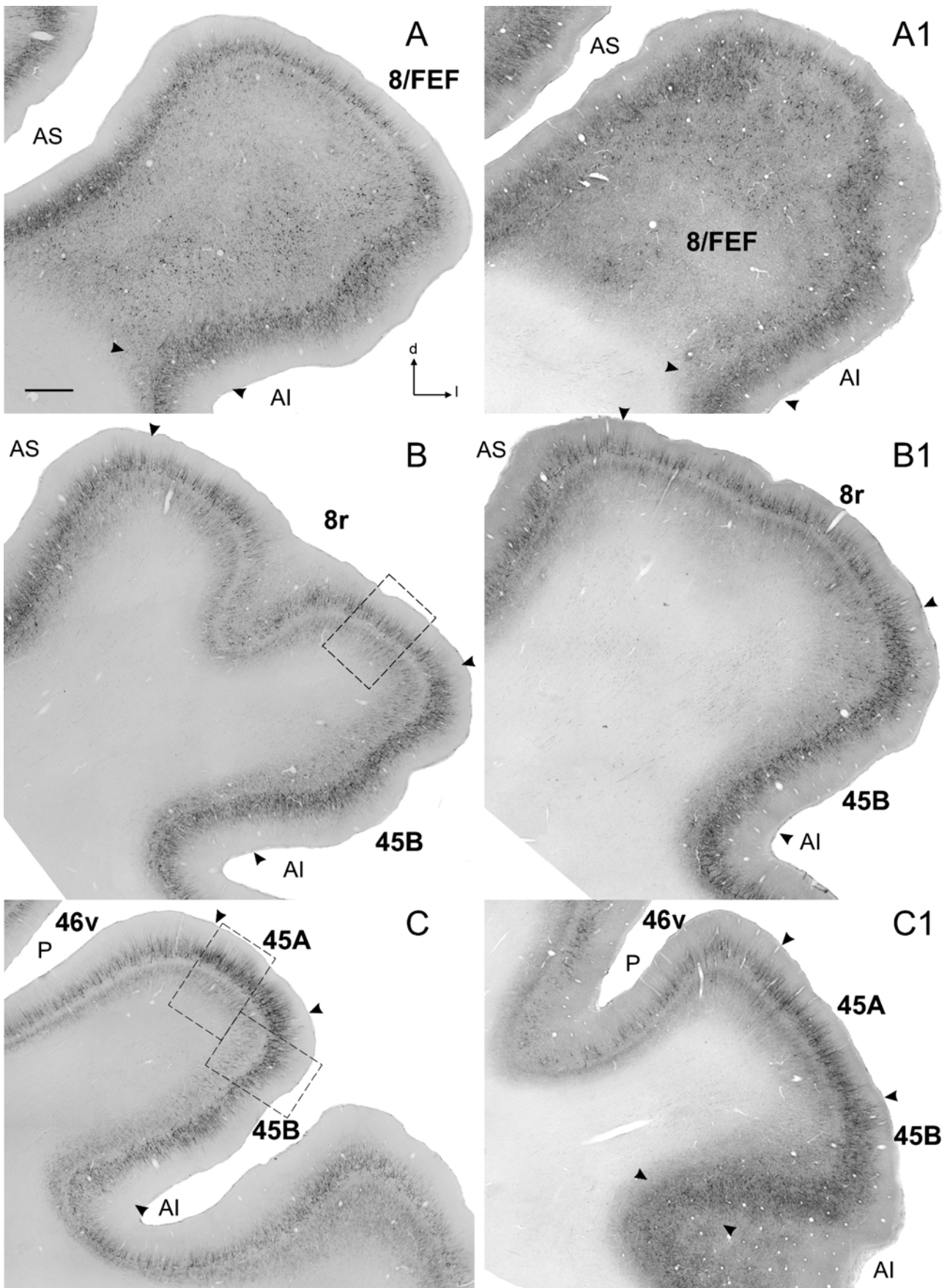
**Figura 8.** Citoarchitettura della VLPF caudale. A-F: Immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi architetturici rappresentativi delle aree 8/FEF (A), 45B (B), 45A (C), 8r (D), 46v (E) e 12 (F), prese dal Caso 12r. Le porzioni corticali da cui sono state tratte le immagini fotografiche, tranne quella in A, sono indicate da rettangoli tratteggiati sulle immagini fotografiche presentate nella figura 2 (pannelli B1-D1). L'immagine fotografica dell'area 8/FEF è stata presa da una sezione localizzata 600  $\mu\text{m}$  più rostralmente rispetto a quella della Figura 2A1. Scala = 500  $\mu\text{m}$  in A (applicata anche ai pannelli A-F). Altre abbreviazioni come nelle figure 1-3.



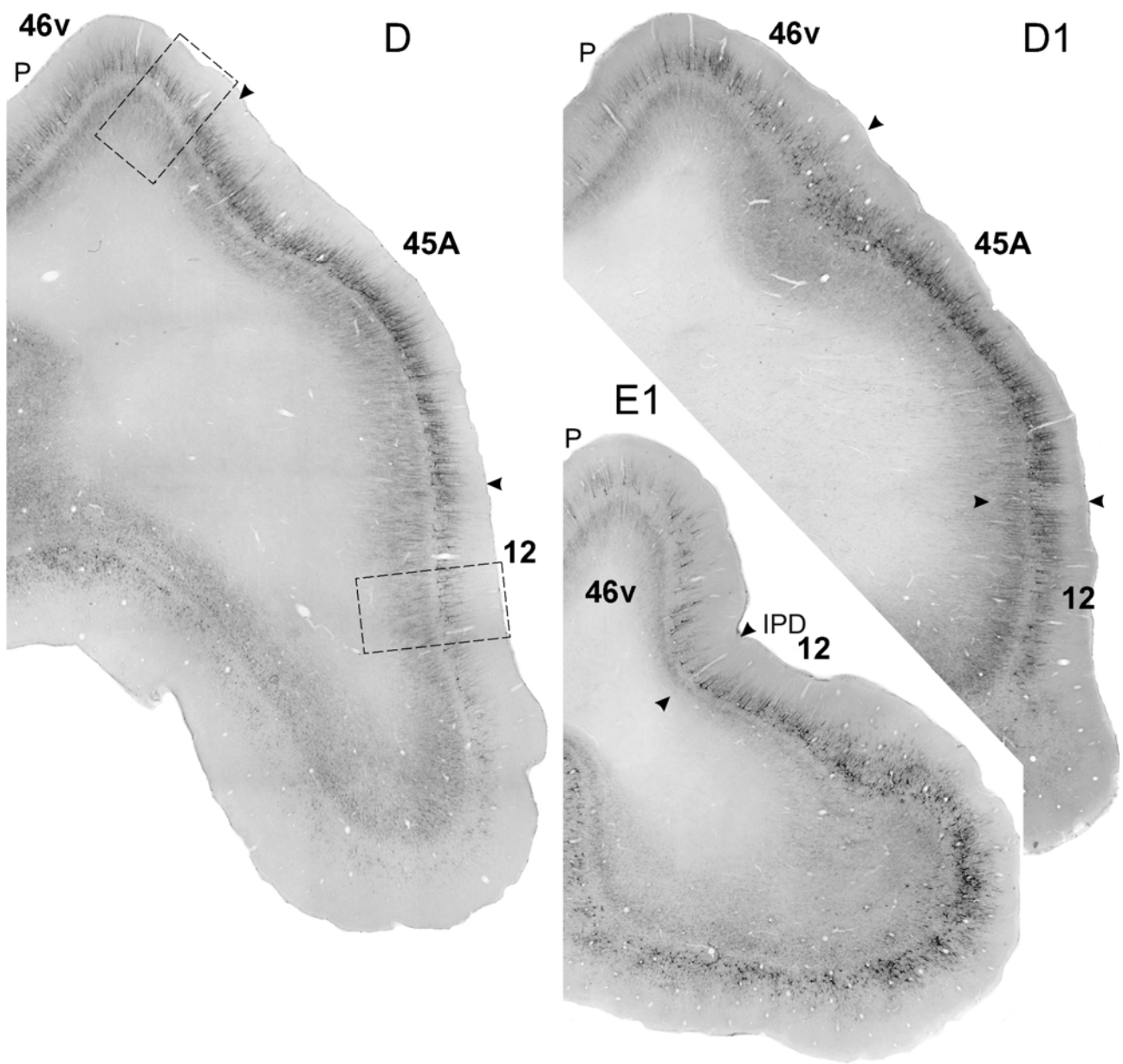
**Figura 9.** Mieloarchitettonica della VLPF caudale. **A-D:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni coronali, collocate in ordine caudo-rostrale, trattate con la metodica di Gallyas, provenienti dal Caso 29r e prese a livelli di AP corrispondenti alle sezioni coronali del Caso 12r mostrate in figura 2, nei pannelli A1-D1. Le frecce sulle immagini fotografiche indicano la posizione dei bordi citoarchitettonici riportati da sezioni adiacenti trattate con la colorazione di Nissl. I rettangoli tratteggiati indicano le porzioni della corteccia da cui sono state tratte le immagini fotografiche della figura 10, pannelli B-E. Scala = 1 mm in A (applicata anche ad A-D). L'orientamento della sezione in A è applicato anche alle sezioni A-D.



**Figura 10.** Mieloarchitettonica della VLPF caudale. A-F: Immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi architetonici rappresentativi delle aree 8/FEF (A), 45B (B), 45A (C), 8r (D), 46v (E) e 12 (F), prese dal Caso 29r. Le porzioni corticali da cui sono state tratte le immagini fotografiche sono indicate da rettangoli tratteggiati sulle immagini fotografiche della figura 9 (pannelli B-D). Le porzioni corticali mostrate in A ed in F sono prese da sezioni localizzate in prossimità di quelle presentate nella Figura 9, rispettivamente nei pannelli A e D. A1-F1: Immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi architetonici rappresentativi delle aree 8/FEF (A1), 45B (B1), 45A (C1), 8r (D1), 46v (E1) and 12 (F1) prese dal Caso 38. iB: banda di Baillarger interna; oB: banda di Baillarger esterna. Scala = 500  $\mu$ m in A (applicata a tutte le immagini fotografiche).



**Figura 11**



**Figura 11.** Distribuzione delle cellule immunopositive all'SMI-32 nella VLPF caudale. **A-D:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni coronali trattate con la metodica di visualizzazione della sottopopolazione cellulare immunopositiva all'SMI-32, collocate in ordine caudo-rostrale e provenienti dal Caso 18r. La sezione in A è adiacente a quella della figura 3A. Le sezioni in B, C e D sono tratte da un livello AP simile a quelle mostrate nella figura 3, rispettivamente nei pannelli B, C e D. **A1-E1:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni coronali trattate con la metodica di visualizzazione della sottopopolazione cellulare immunopositiva all'SMI-32, collocate in ordine caudo-rostrale e provenienti dal Caso 12r. Le sezioni in A1 e B1 sono adiacenti a quelle della figura 3, pannelli A1 e B1. Le sezioni in C1, D1 e E1 sono tratte da un livello AP simile a quelle della figura 3, pannelli C1, D1 e E1. Non abbiamo reperito nessuna sezione coronale del Caso 18r ad un livello AP corrispondente alla sezione E1 del caso 12r. Le frecce sulle immagini fotografiche indicano la posizione dei bordi citoarchitettonici riportati da sezioni adiacenti trattate con la colorazione di Nissl. Scala bar = 1 mm in A (applicata a tutte le immagini fotografiche). L'orientamento della sezione in A è applicato a tutte le immagini fotografiche. I rettangoli tratteggiati, nelle sezioni B, C e D, indicano le porzioni della corteccia da cui sono state tratte le immagini fotografiche della figura 12, pannelli B-E. Abbreviazioni come nelle figure 1-3.

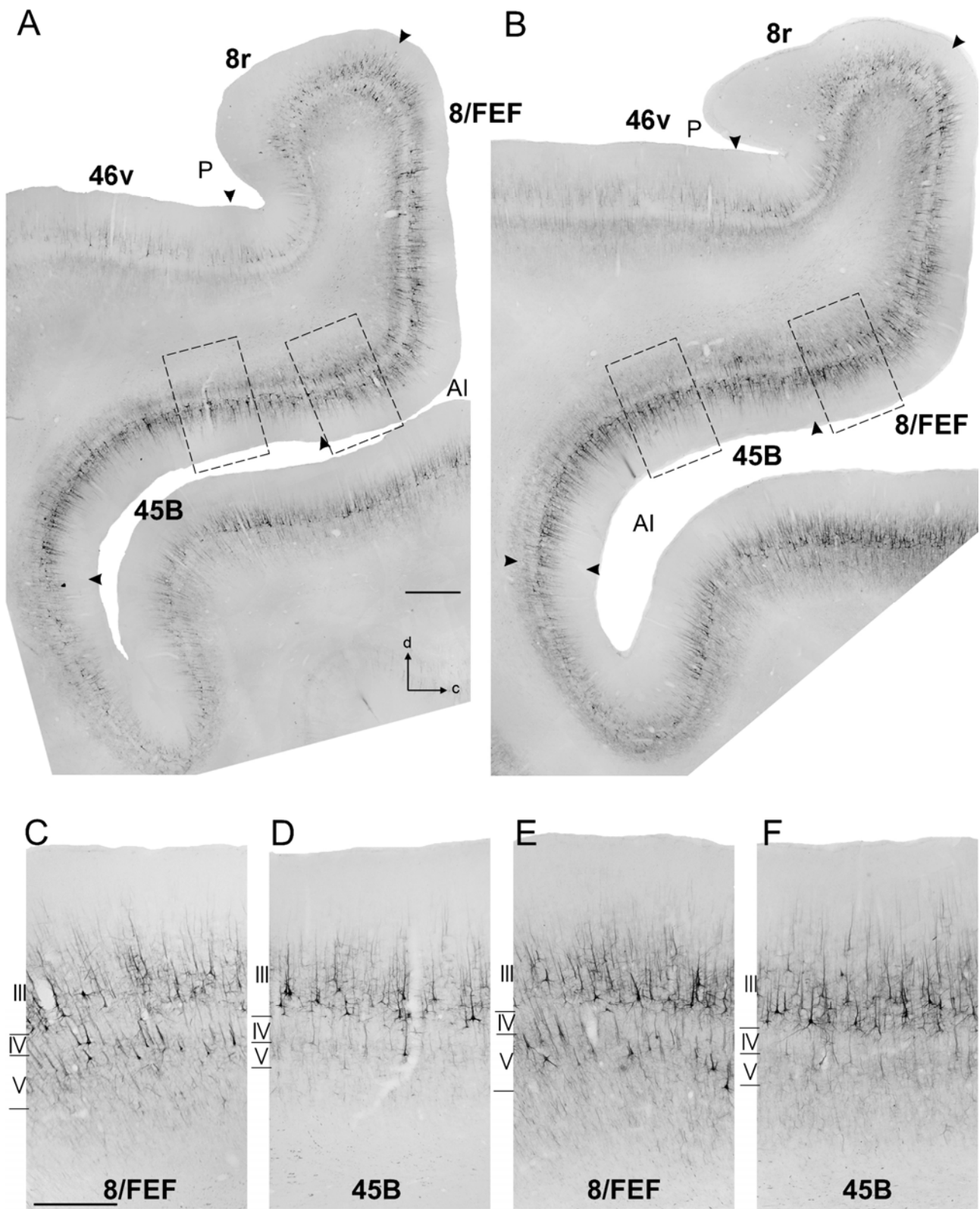


Figura 12

**Figura 12.** Distribuzione delle cellule immunopositive all'SMI-32 nella VLPF caudale. **A:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di una sezione parasagittale trattata con la metodica immunohistochimica di visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 presa dal Caso M4I ad un livello di AP situato in prossimità di quello delle sezioni mostrate nella figura 4A. **B:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di una sezione parasagittale trattata con la metodica immunohistochimica di visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 presa dal Caso M3 ad un livello leggermente più mediale rispetto a quello da cui è stata tratta la sezione del pannello A e mostrata come emisfero sinistro. Le frecce sulle immagini fotografiche indicano la posizione dei bordi citoarchitettonici riportati dalle adiacenti sezioni di Nissl. Scala bar = 1 mm in A (applicata anche a B). L'orientamento della sezione in A è applicato anche a B. I rettangoli tratteggiati nella sezione A indicano le porzioni della corteccia da cui sono state tratte le immagini fotografiche ad alto ingrandimento dei pannelli C e D. I rettangoli tratteggiati nella sezione B indicano le porzioni della corteccia da cui sono state tratte le immagini fotografiche ad alto ingrandimento dei pannelli E ed F. **C e D:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della regione di transizione tra le aree 8/FEF (**C**) e 45B (**D**) prese dalla sezione parasagittale mostrata in A. **E e F:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della regione di transizione tra le aree 8/FEF (**E**) e 45B (**F**) prese dalla sezione parasagittale mostrata in B. Scala = 500 µm in C (applicata anche a C-F). Abbreviazioni come nelle figure 1 e 2.

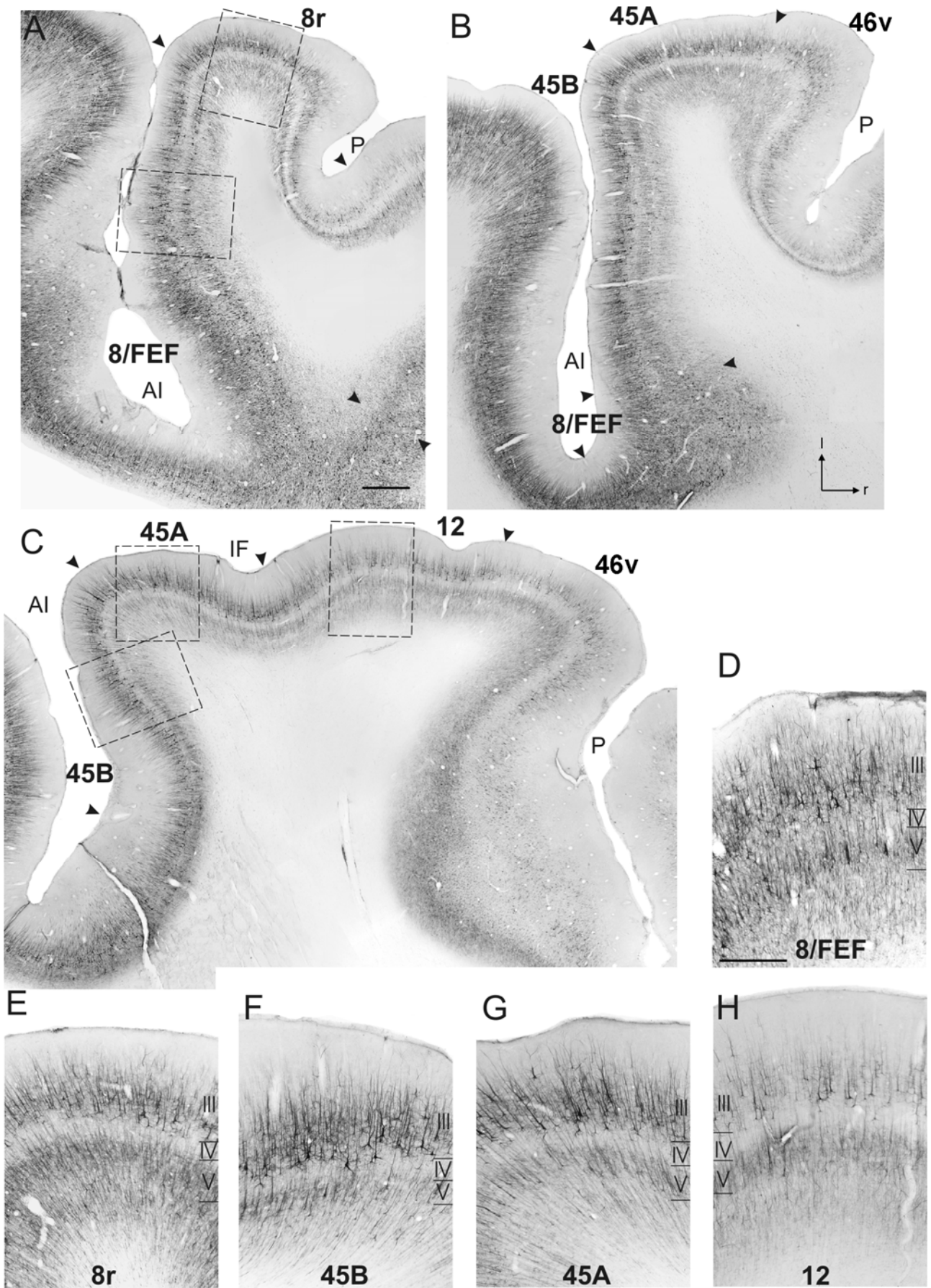
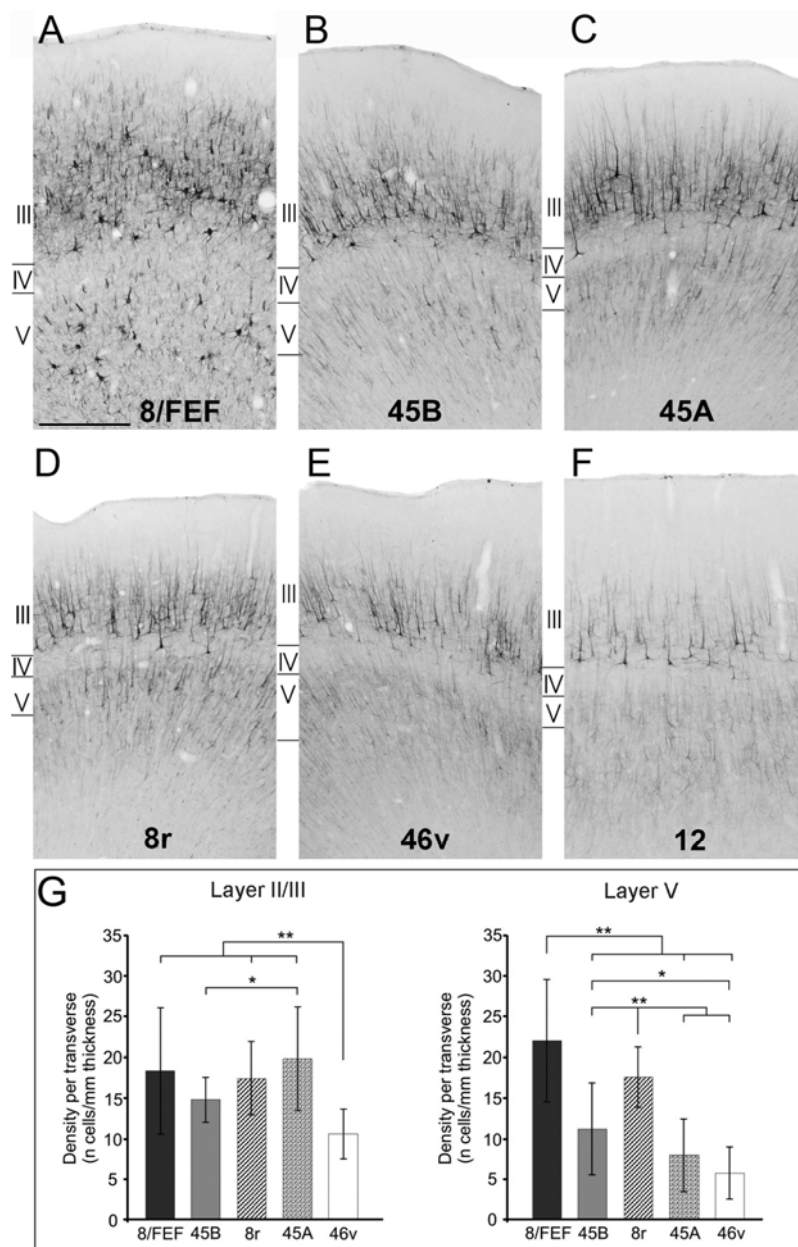
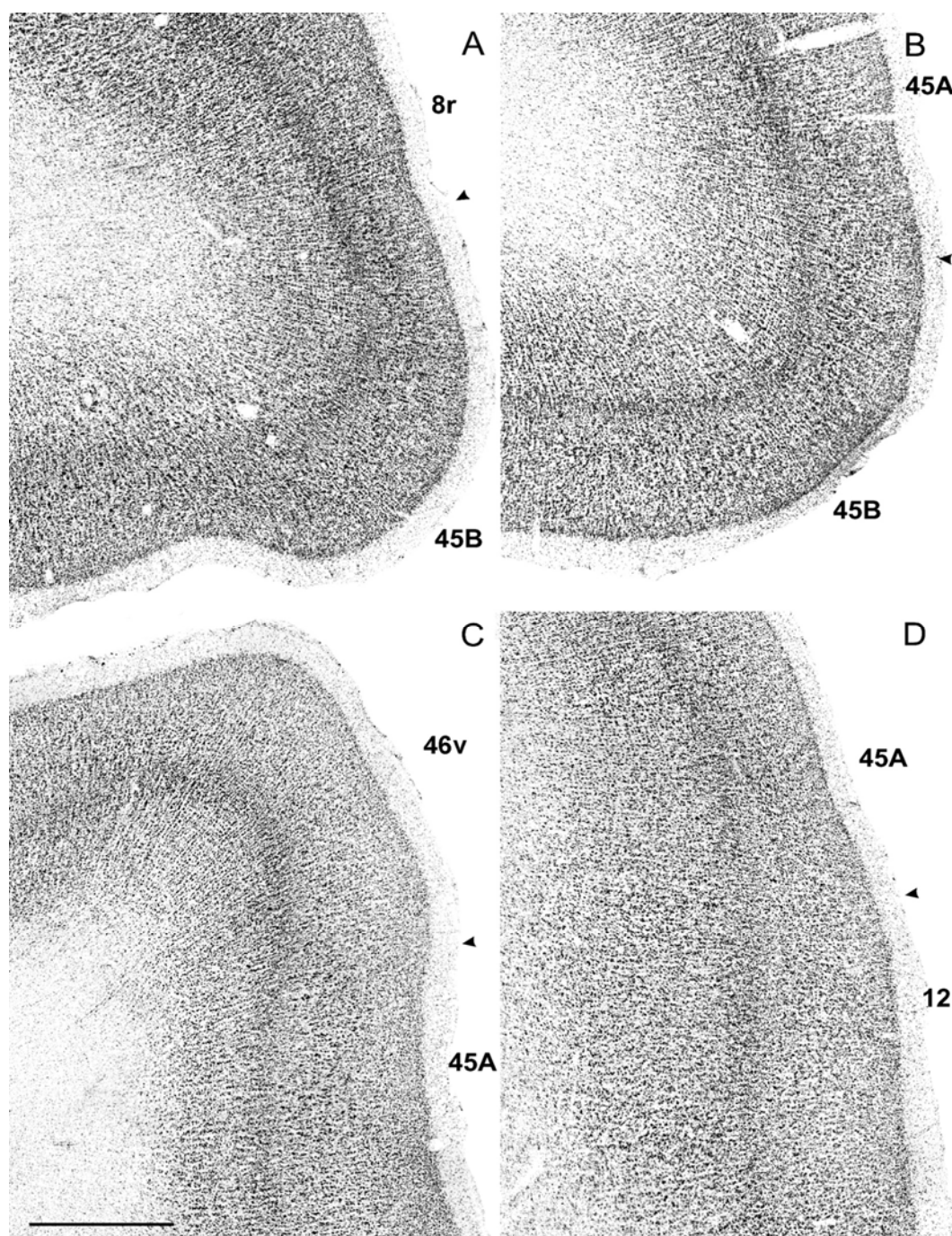


Figura 13

**Figura 13.** Distribuzione delle cellule immunopositive all'SMI-32 nella VLPF caudale. **A-C:** Immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni perpendicolari all'IAS trattate con la metodica immunohistochimica di visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 prese dal Caso PR17 a livelli di AP adiacenti alle sezioni mostrate nella figura 5. Le frecce sulle immagini fotografiche indicano la posizione dei bordi citoarchitettonici riportati dalle adiacenti sezioni di Nissl. Scala = 1 mm in A (applicata anche A-C). I rettangoli tratteggiati nelle sezioni A e C indicano le porzioni della corteccia da cui sono state tratte le immagini fotografiche ad alto ingrandimento dei pannelli D-H. **D-H:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi rappresentativi delle aree 8/FEF (**D**), 8r (**E**), 45B (**F**), 45A (**G**) e 12 (**H**) prese dalle sezioni mostrate in A-C. Scala = 500  $\mu$ m in D (applicata anche in D-H). Abbreviazioni come nelle figure 1-3.



**Figura 14.** Distribuzione delle cellule immunopositive all'SMI-32 nella VLPF caudale. **A-F:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento di sezioni trattate con la metodica immunohistochimica di visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 di campi rappresentativi delle aree 8/FEF (A), 45B (B), 45A (C), 8r (D), 46v (E) e 12 (F) provenienti dal Caso 18r. Le porzioni corticali da cui sono state tratte le immagini fotografiche, tranne quella in A, sono indicate da rettangoli tratteggiati sulle immagini fotografiche della figura 11 (pannelli B-D). Scala = 500  $\mu$ m in A (applicata anche a A-F). G: Valori medi ( $\pm$  S.D.) della densità delle cellule piramidali immunopositive all'SMI-32 nel II/III (a sinistra) e V (a destra) strato nelle aree 8/FEF, 45B, 8r, 45A e 46v ottenuti dall'analisi di tre Casi (PR17, C18r e MEF16l). I valori medi sono riferiti a 24 sezioni di spessore di 250  $\mu$ m per ciascun area. Gli asterischi doppi e singoli indicano livelli di significatività rispettivamente pari a  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ .



**Figura 15.** Citoarchitettura delle regioni di transizione delle aree della VLPF caudale. **A:** Immagine fotografica ad alto ingrandimento di un campo rappresentativo di un settore di transizione tra le aree 45B ed 8r, preso dalla sezione mostrata in figura 3B. **B:** Immagine fotografica ad alto ingrandimento di un campo rappresentativo di un settore di transizione tra le aree 45B e 45A, preso dalla sezione mostrata in figura 3C. **C:** Immagine fotografica ad alto ingrandimento di un campo rappresentativo di in settore di transizione tra le aree 45A e 46v, preso dalla sezione mostrata in figura 3D. **D:** Immagine fotografica ad alto ingrandimento di un campo rappresentativo di un settore di transizione tra le aree 45A e 12, preso dalla sezione mostrata in figura 3D. Scala = 1 mm in A (applicata anche A-D).

*Analisi qualitativa*

Le graduali differenze di densità delle cellule immunopositive alla calbindina osservate in tutte le aree studiate non ci hanno permesso di evidenziare nessun chiaro bordo architettonico tra le aree della VLPF caudale; nel contempo l'esistenza di una differente immunoreattività lungo l'asse rostro-caudale della VLPF ci ha però consentito di delimitare quantomeno 2 differenti macroregioni: una, localizzata caudalmente, e comprendente l'area 8/FEF, l'area 45B e l'area 8r ed una, situata rostralmente, costituita dall'area 45A e dall'area 46v.

Nelle aree 8/FEF, 45B ed 8r (Fig. 16, A, B e C) le cellule non piramidali immunopositive alla calbindina sono localizzate principalmente nel II strato e nelle porzioni superficiali del III strato; queste cellule immunopositive sono molto più rade nelle restanti parti del III strato, soprattutto nell'area 8/FEF, sono in numero esiguo nel IV strato e tendono a diminuire ulteriormente nel V e nel VI strato. Il neuropilo immunopositivo, in queste aree caudali, è poco evidente in quasi tutti gli strati ma forma due bande facilmente distinguibili in corrispondenza delle porzioni superficiali del III strato e nel V strato.

L'area 45A e l'area 46v, che costituiscono la macroregione più rostrale della VLPF caudale, sono invece caratterizzate da un contenuto di cellule non piramidali immunopositive alla calbindina relativamente elevato (Figs. 16, D e E); in queste aree rostrali infatti le cellule immunopositive pur essendo maggiormente concentrate, analogamente alle aree caudali, nel II strato e nelle porzioni più superficiali del III strato, sono infatti relativamente numerose attraverso l'intera estensione del III strato, dove è presente anche un quantitativo di neuropilo abbastanza elevato; ambedue le aree sono distinguibili dalle aree più caudali anche per una densità di cellule immunopositive e di neuropilo qualitativamente superiore in corrispondenza del V strato. Un pattern analogo a quello dell'area 45A e dell'area 46v è stato osservato anche nelle porzioni più rostrali dell'area 46 e nel settore dell'area 12 corrispondente all'area 12r di Carmichael e Price; l'area 12l è distinguibile invece da tutte le altre aree della VLPF caudale per un pattern molto simile a quello osservabile nell'adiacente corteccia orbitofrontale che è caratterizzata da un quantitativo molto elevato sia di cellule immunopositive che di neuropilo.

In tutte le aree studiate è stato inoltre osservato un esiguo numero di cellule piramidali immunopositive, queste cellule, tutte poco marcate, sono state riscontrate in numero relativamente elevato esclusivamente nell'area 45A.

## *Analisi quantitativa*

L'analisi quantitativa della numerosità delle cellule immunopositive alla calbindina ha confermato le osservazioni qualitative e la conseguente suddivisione della VLPF caudale in due distinti settori chemoarchitettonici.

L'ANOVA a due vie per misure ripetute condotta sulla totalità delle cellule immunopositive alla calbindina ha evidenziato come significativi sia l'effetto principale relativo alla particolare tipologia cellulare [F(1;17)=15627,  $p<0.001$ ] che quello relativo alla differente tipologia delle aree [F(4;68)=95.398,  $p<0.001$ ] ed anche un significativo effetto di interazione (tipologia cellulare x area) [F(4;68)=45.359,  $p<0.001$ ].

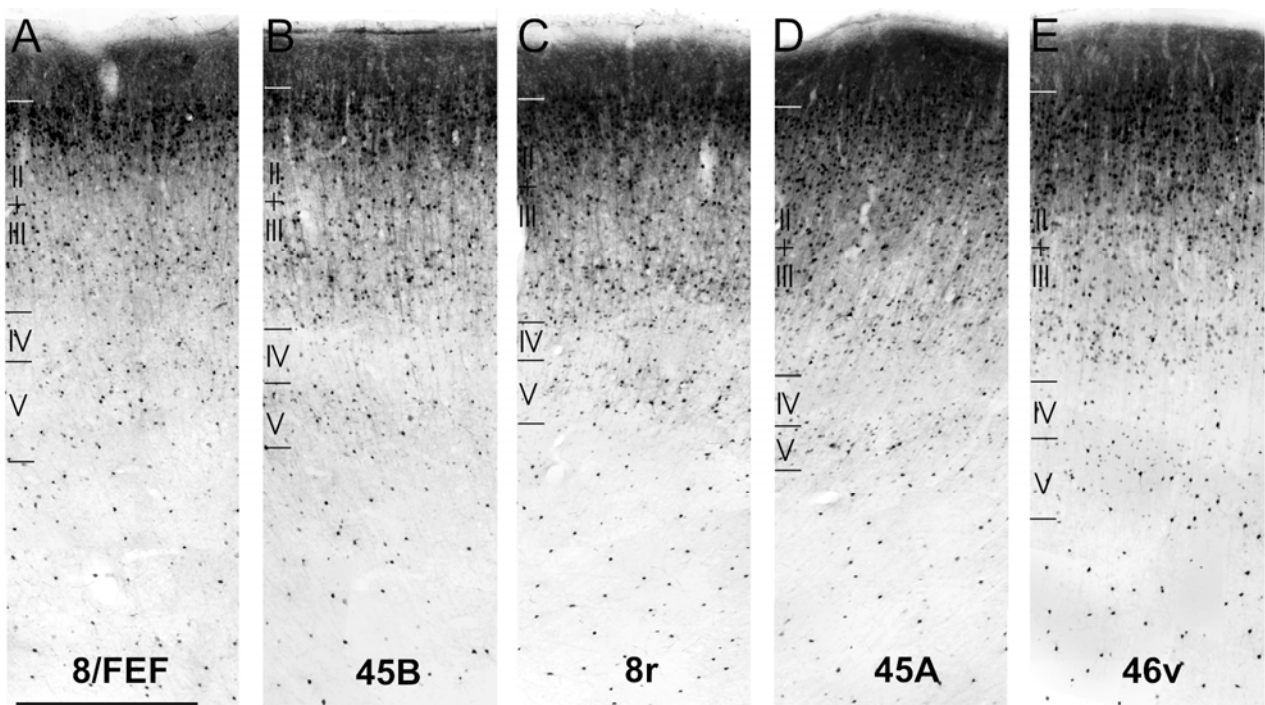
La successiva analisi post-hoc ha evidenziato (Fig. 17A) che, per quanto riguarda la distribuzione delle cellule immunopositive di tipo non piramidale, la densità cellulare nelle aree 45A e 46v è significativamente superiore (circa il 20%) rispetto a quella osservata nelle aree 8/FEF, 45B ed 8r ( $p<0.001$ ) ed inoltre che la densità cellulare nell'area 45B differisce significativamente anche da quella osservata nell'adiacente area 8r ( $p<0.05$ ); per quanto concerne invece la distribuzione delle cellule piramidali, l'analisi post-hoc ha mostrato (Fig. 17B) che la densità di queste cellule nell'area 45A, dove costituiscono circa il 10% dell'intera popolazione cellulare, è significativamente superiore rispetto a quella osservata nelle aree 8/FEF e 45B ( $p<0.001$ ) ed inoltre che nell'area 8/FEF la densità di questa tipologia cellulare è significativamente più bassa rispetto a quella osservata nelle aree 8r e 46v ( $p<0.001$ ).

L'ANOVA a due vie condotta sui valori di densità rappresentativi della distribuzione laminare delle cellule non piramidali calbindino positive nei differenti strati corticali di ogni singola area, ha dato come risultati significativi sia l'effetto principale relativo al tipo di area [F(4;68)=27.083,  $p<0.001$ ] che quello relativo al tipo di strato/sublamina [F(5;85)=475.63,  $p<0.001$ ] ed un significativo effetto di interazione (area x strato/sublamina) [F(20;340)=6.5724,  $p<0.001$ ].

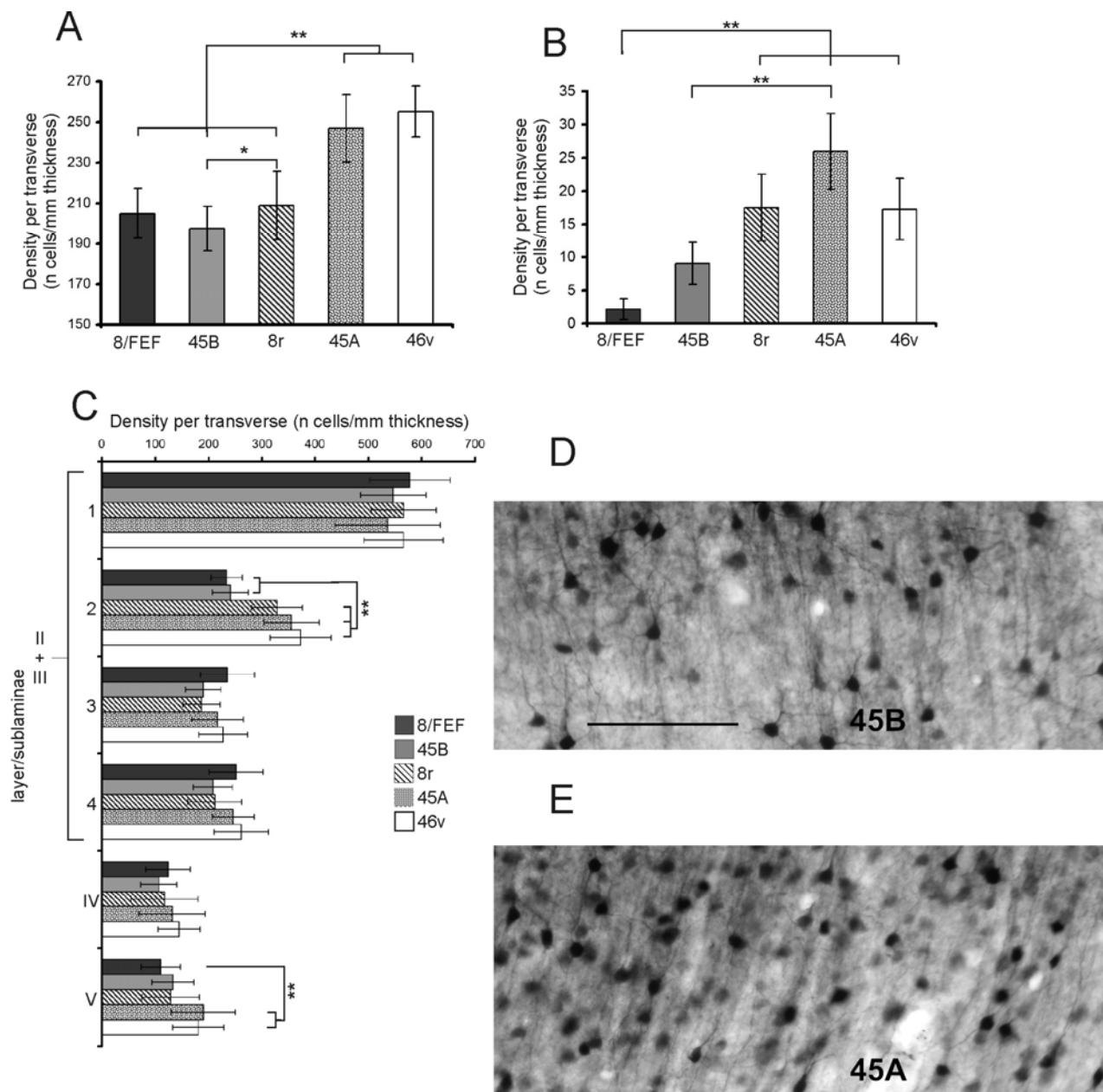
La successiva analisi post-hoc ha evidenziato differenze significative nella distribuzione cellulare all'interno dei vari strati esclusivamente in corrispondenza della seconda sublamina del II/III strato ed in corrispondenza del V strato (Fig. 17C). In particolare a livello della seconda sublamina del II/III strato la densità cellulare nelle aree 8r, 45A e 46v è risultata significativamente superiore rispetto a quella osservata nelle aree 8/FEF e 45B ( $p<0.001$ ). Campi rappresentativi (Fig 17, D e E), fotografati in corrispondenza della seconda sublamina del II/III strato delle aree 45B e 45A mostrano che questa differenza quantitativa è osservabile anche a livello qualitativo. A livello del V strato la densità cellulare nelle aree 45A e 46v è risultata inoltre significativamente superiore rispetto a quella osservata nell'area 8/FEF ( $p<0.001$  e  $p<0.01$ , rispettivamente).

I dati quantitativi hanno dunque confermato la suddivisione chemoarchitettonica osservata

qualitativamente ed inoltre indicano che le aree 8/FEF e 45B differiscono significativamente dalle aree 45A e 46v sia per quanto riguarda la distribuzione totale delle cellule non piramidali sia per quanto riguarda la loro distribuzione laminare in corrispondenza della seconda sublamina del II/III strato e che l'area 8r pur essendo simile all'area 8/FEF nei termini di densità cellulare totale differisce da quest'ultima e dall'area 45B nei termini di densità laminare in corrispondenza della seconda sublamina del II/III strato.



**Figura 16.** Distribuzione delle cellule immunopositive alla calbindina nella parte caudale della VLPF. **A-E:** Immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi rappresentativi delle aree 8/FEF (**A**), 45B (**B**), 8r (**C**), 45A (**D**) e 46v (**E**), provenienti dal Caso PR17. Scala = 500  $\mu$ m in A (applicata anche A-E).



**Figura 17.** Distribuzione delle cellule immunopositive alla calbindina nella VLPF caudale. Valori medi ( $\pm$  S.D.) della densità delle cellule non piramidali (**A**) e piramidali (**B**) immunopositive alla calbindina negli strati dal I al V e densità laminare delle cellule nonpiramidali (**C**) immunopositive alla calbindina nelle aree 8/FEF, 45B, 8r, 45A e 46v ottenuti dall'analisi di tre Casi (PR17, M31 e MEF161). I valori si riferiscono a 24 sezioni corticali di 250  $\mu$ m di spessore per ciascun area. L'analisi della distribuzione laminare della densità negli strati II e III è stata attuata dividendo i due strati, considerati come un unicum, in 4 sublaminae di egual spessore. **D** e **E**: Immagini fotografiche ad alto ingrandimento della seconda sublamina degli strati II/III delle aree 45B (**D**) e 45A (**E**). Scala = 100  $\mu$ m in **D**, applicata anche ad **E**. Gli asterischi doppi e singoli indicano i livelli di significatività, rispettivamente pari a  $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ .

La tabella 3 riassume le principali caratteristiche architettoniche della VLPF caudale descritte nel presente studio; caratteristiche morfologiche che possono essere osservate in tutte le differenti tipologie dei casi studiati indipendentemente dal tipo di taglio e delle specie utilizzate.

Per ottenere una stima della localizzazione delle aree studiate sono state create due ricostruzioni 3D della VLPF caudale partendo dall'analisi architettonica delle singole sezioni istologiche come descritto nei metodi. La posizione e l'estensione delle aree 8/FEF, 8r, 45B, 45A e del settore dell'area 12 plausibilmente corrispondente all'area 121 di Carmichael e Price sono mostrate in figura 18 in due ricostruzioni 3D dei casi 18r e 12r.

Per ciascun emisfero il lobo frontale è mostrato sia mediante una visione dorso-laterale che mediante una visione caudo-laterale in cui il banco anteriore dell'IAS è stato esposto mediante una dissezione della ricostruzione 3D in corrispondenza del fondo dell'aruato. Sia la localizzazione che l'estensione delle aree studiate si sono dimostrate simili e riproducibili anche nei restanti casi studiati.

Per ottenere un'ulteriore stima della variabilità interindividuale della posizione e dell'estensione delle aree studiate abbiamo inoltre realizzato, come descritto nei metodi, una mappa architettonica media ottenuta dalla sovrapposizione di 10 ricostruzioni 2D provenienti da 7 *Macaca nemestrina* e 2 *Macaca fascicularis* su una ricostruzione template del lobo frontale.

I pannelli da B1 a B4 nella parte inferiore della figura 18 mostrano, separatamente per ciascuna area, il grado di sovrapposizione di almeno 10 mappe architettoniche; il grado di sovrapposizione di ogni area è mostrato mediante una scala colori che va dal rosso (che rappresenta una sovrapposizione di almeno 9 mappe) al blu (che rappresenta una sovrapposizione di non più di 2 mappe).

Nel pannello B5 è mostrata contemporaneamente la superficie corticale occupata dalle aree 8/FEF, 8r, 45B e 45A, la superficie corticale di ciascuna area sovrapposta in nove o dieci mappe è mostrata in rosso, la superficie corticale sovrapposta in almeno sette mappe è mostrata in arancio. Questi dati indicano che indipendentemente dalla variabilità individuale la localizzazione e l'estensione delle aree studiate sono estremamente simili tra tutti i differenti casi e le specie studiate.

Presi nella loro globalità tutti questi dati descrivono in modo completamente riproducibile la localizzazione e l'estensione delle aree 8/FEF, 8r, 45B e 45A e le relazioni che ne intercorrono.

In particolare interessante è notare che: (i) in accordo con Stanton e coll. (Stanton et al. 1989) l'area 8/FEF è limitata alla corteccia prearcata ed alla cresta del solco arcuato; (ii) l'area 8r si estende per circa 9 mm in direzione dorso-ventrale ed in circa 2-3 mm in direzione rostro-caudale includendo sempre la punta posteriore del PS ed in numerosi casi occupando anche la parte più caudale del solco; (iii) il *core* dell'area 45B si estende per circa 4-5 mm lungo il banco anteriore dell'IAS senza

includerne la parte più ventrale; (iv) il *core* dell'area 45A si estende per circa 6 mm in direzione dorso-ventrale e circa 4 mm in direzione rostro-caudale fino alla parte caudale dell'IPD che, quando presente, rappresenta il principale punto di riferimento anatomico delimitante il bordo rostrale dell'area.

**Figura 18.** Localizzazione ed estensione delle aree della VLPF caudale. **A:** Ricostruzioni 3D del lobo frontale dei Casi 18r e 12r. In ciascun caso il lobo frontale viene mostrato sia mediante una visione dorso-laterale, (scala = 5 mm, per ambedue le ricostruzioni) che per mezzo di una visione caudo-laterale in cui il banco anteriore dell'IAS è stato esposto mediante dissezione lungo il fondo del solco arcuato. **B:** Mappa architettonica media delle aree 8/FEF (B1), 45B (B2), 8r (B3) e 45A (B4) ottenuta dalla sovrapposizione di 10 ricostruzioni bidimensionali provenienti da 7 *Macaca nemestrina* e 2 *Macaca fascicularis* su una ricostruzione template del lobo frontale. Il grado di sovrapposizione di ciascun area è mostrato mediante una scala colori che va dal rosso (che rappresenta una sovrapposizione di almeno 9 mappe) al blu (che rappresenta una sovrapposizione di non più di due mappe). Scala = 5 mm in B1 (applicata anche a B1-B4). Nel pannello B5 è mostrata una visione complessiva del settore della convessità occupato da almeno nove (rosso) o sette (arancio) mappe delle aree 8/FEF, 45B, 8r e 45A. Scala = 5 mm. Il rettangolo tratteggiato sul disegno del cervello indica il settore del lobo frontale mostrato nei pannelli B1-B5. Abbreviazioni come nelle figure 1 e 2.

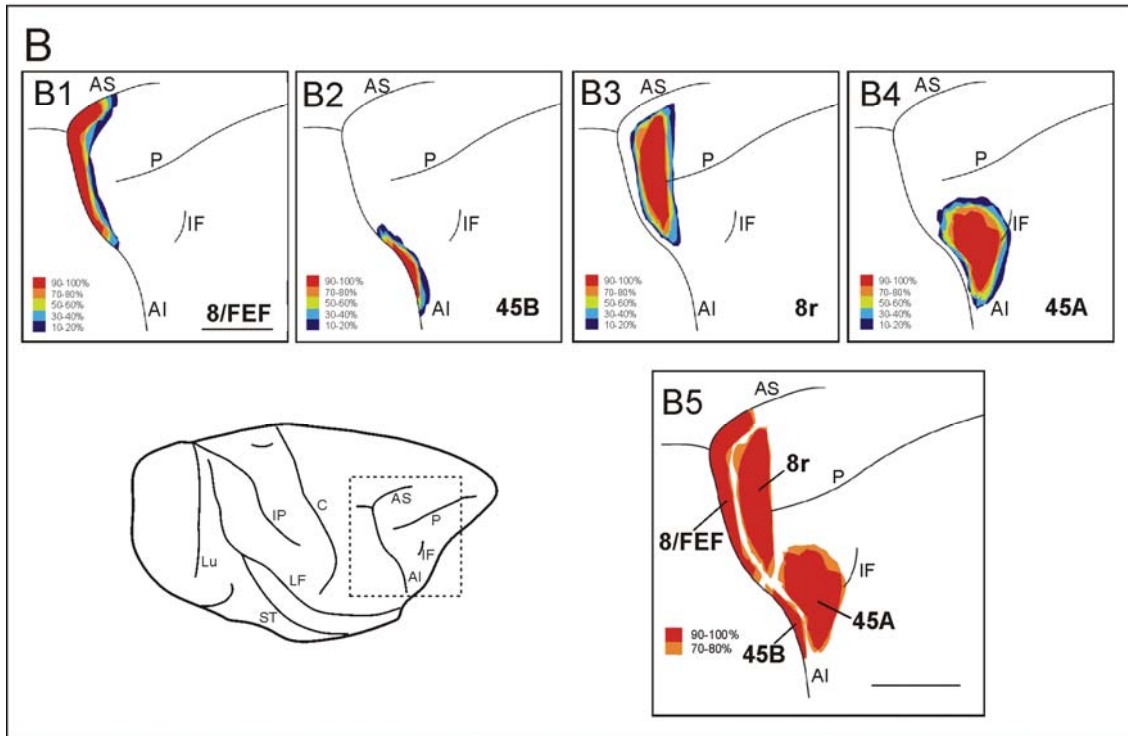
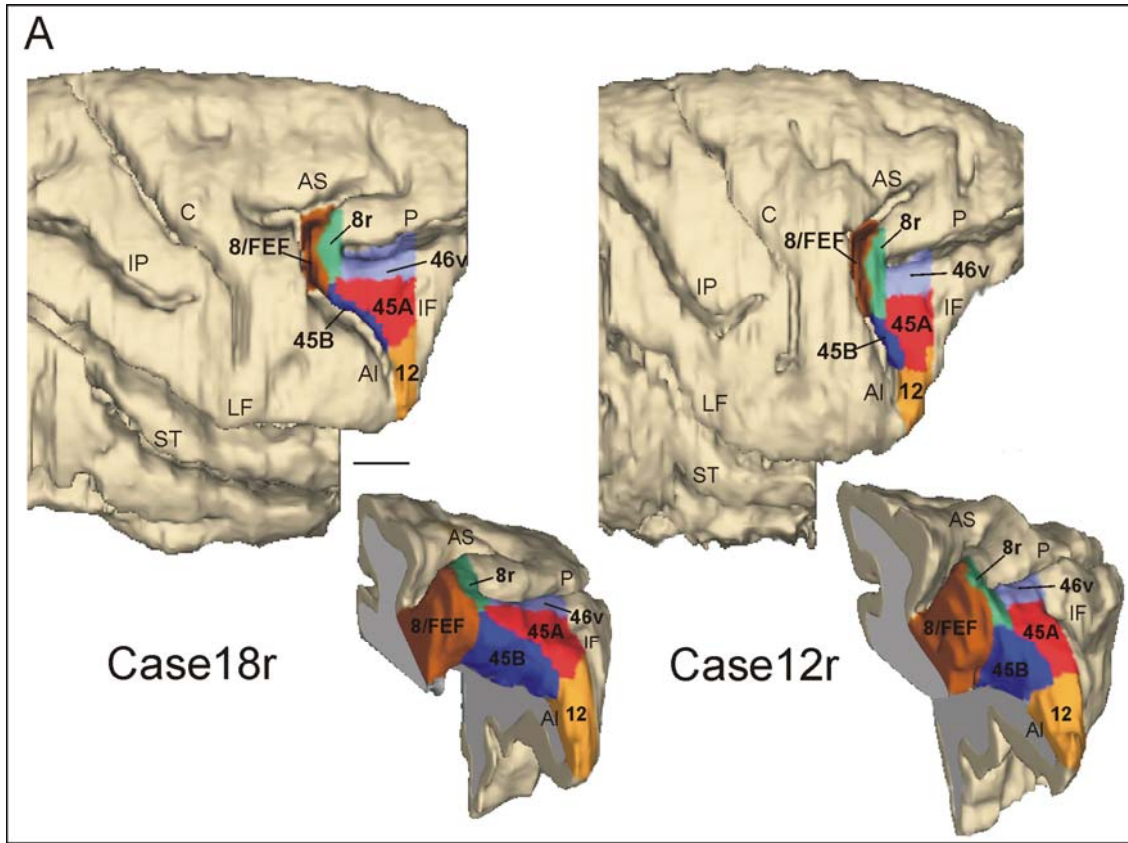


Figura 18.

**TABELLA 3.** Principali caratteristiche architettoniche delle aree della VLPF caudale

Area	Nissl	Mielina	SMI-32ir
8/FEF	Numerose cellule piramidali di medie dimensioni nel III strato *** Numerose e grosse cellule piramidali nel V strato.	Altamente mielinizzata. *** Densi plessi orizzontali.	III strato ricco in dendriti apicali e corpi cellulari *** V strato con grosse cellule piramidali. * Elevata densità di cellule immunopositive
45B	*** Grosse cellule piramidali nelle profondità del III strato ** V strato omogeneo con un numero relativamente ridotto di cellule piramidali.	Altamente mielinizzata. ** Scura banda di Baillarger esterna.	III strato ricco in dendriti apicali immunopositivi e corpi cellulari. ** Grosse cellule piramidali nel III strato piccole cellule piramidali nel V strato. * Bassa densità cellulare nel V strato.
8r	** Sottile ed omogeneo III strato. *** V strato evidente con numerose cellule piramidali piccole ma densamente impaccate.	**Moderatamente mielinizzato. ** Banda di Baillarger esterna più evidente di quella interna	** Relativamente ridotto quantitativo di dendriti apicali e cellule immunopositive nel III strato. Piccole cellule piramidali nel V strato. * Alta densità cellulare nel V strato.
45A	*** III strato densamente popolato di cellule piramidali di medie dimensioni. Relativamente denso strato V.	**Altamente mielinizzata. ** Due bande di Baillarger, una esterna ed una interna.	III strato ricco in dendriti apicali immunopositivi e corpi cellulari di medie dimensioni. *Densità cellulare nel III strato superiore a quella della 45B. * Bassa densità cellulare nel V strato.
46v	**Denso ed omogeneo III strato. Cellule densamente impacchettate nel IV e V strato.	** Poco mielinizzata. ** Ambedue le bande di Baillarger relativamente evidenti.	*** Basso contenuto di neuropilo nel III strato e bassa numerosità cellulare nel III e nel V strato. * Bassa densità cellulare nel III e nel V strato.
12	**Denso con un leggero gradiente delle dimensioni cellulari nelle parti più profonde. ** V strato chiaramente subllaminato.	**Moderatamente mielinizzata. Evidenti ambedue le bande di Baillarger.	** Piccole e rade cellule piramidali nelle porzioni profonde del III strato. ** Basso contenuto di dendriti apicali nel III strato.

\*\*\* Principali caratteristiche architettoniche dell'area

\*\* Caratteristiche che distinguono l'area dalle aree adiacenti

\* Caratteristiche basate sulle analisi quantitative.

## 3.2 Studio odologico

### *Siti di iniezioni*

Tutti i siti di iniezioni del presente lavoro, la maggior parte dei quali illustrati nelle figure 1-4, sono completamente localizzati all'interno della sostanza grigia corticale, nella quale si estendono attraverso tutti gli strati, con l'unica eccezione del caso 36l CTBg, il cui sito è limitato esclusivamente al III strato.

L'attribuzione dei siti di iniezione alle varie aree della VLPF caudale è stata attuata identificando architettonicamente ciascun area mediante i criteri morfologici definiti nella parte precedente del nostro studio.

Nell'area 45A, complessivamente le iniezioni attuate coprono quasi tutta la superficie corticale lungo la quale si estende l'area, con l'eccezione di una sottile striscia ventrale che confina con l'area 12l; in due casi, il caso 37r BDA (Fig. 1A) ed il Caso 39l FR (Fig. 1B), le iniezioni sono state attuate nella porzione medio-caudale dell'area, in un caso, il 37l FB (Fig. 1C), due iniezioni sono state effettuate rispettivamente, l'una nella porzione intermedia e l'altra nella parte più rostrale dell'area, infine in un caso, il Caso 36l CTBg, l'iniezione è stata limitata esclusivamente alla parte più rostrale dell'area (Fig. 1D). In figura 2, pannelli A1 e B1, sono presentate immagini fotografiche dei siti di iniezione, visualizzati mediante fluorescenza, dei Casi 37l FB e 36l CTBg; nei pannelli A2 e B2 sono presentate immagini fotografiche di sezioni adiacenti o poco più rostrali rispetto a quelle del sito di iniezione, trattate con la colorazione di Nissl, e che evidenziano, in ambedue i casi, la principale caratteristica citoarchitettonica dell'area 45A, ovvero la presenza di un evidente gradiente delle dimensioni cellulari lungo il III strato. Questo gradiente delle dimensioni cellulari chiaramente distingue l'area 45A dalla porzione caudale dell'adiacente area 12r (pannelli A3 e B3 della figura 2), dove invece il III strato è molto più omogeneo sia dal punto di vista delle dimensioni che della densità cellulare.

Nell'area 45B le iniezioni sono state effettuate a tutti i differenti livelli dorso-ventrali del banco anteriore del solco arcuato lungo i quali si estende l'area; in particolare l'iniezione del Caso 30r FB (Fig. 1F) è stata attuata nella parte più dorsale dell'area, le iniezioni del Caso 26l DY (Fig. 1G) e del Caso 36r BDA (Fig. 1E) sono state posizionate in corrispondenza del core dell'area ed infine l'iniezione del Caso 36l FB (Fig. 1D) è stata effettuata in prossimità del bordo ventrale dell'area. Nel Caso 30r, benchè il core dell'iniezione sia stato posizionato in corrispondenza dell'area 45B (Fig. 3A) parte del sito si è esteso dorsalmente ed invade, in piccola parte, anche la porzione ventrale dell'area 8/FEF; nella figura 3A1, che presenta un'immagine fotografica del sito del Caso 30r sono

comunque evidenti le principali caratteristiche architettoniche dell'area 45B, ovvero: a) la presenza di grosse cellule piramidali nelle porzioni più profonde del III strato, cellule piramidali che risaltano all'interno di una popolazione cellulare omogenea sia in grandezza che in densità; b) un V strato popolato solo da piccole piramidi e chiaramente non sublaminato. Queste caratteristiche architettoniche permettono di distinguere marcatamente l'area 45B dall'adiacente area 8/FEF, in cui pur essendo presenti cellule piramidali nelle profondità del III strato, in particolare nelle porzioni più ventrali dell'area, il V strato è chiaramente sublaminato e presenta grosse e numerose cellule piramidali nello strato Vb (Fig. 3A2). Nell'emisfero destro del Caso 36 in cui sono stati iniettati contemporaneamente BDA e FR, rispettivamente nell'area 45B ed 8/FEF, è possibile attuare un confronto, nelle zone corticali adiacenti al sito di iniezione, non solo della morfologia citoarchitettonica (Fig. 3, pannelli B,C, B1 e C1) ma anche della distribuzione delle cellule immunopositive all'SMI-32 (Fig. 3, pannello D e D1); in particolare le sezioni trattate per la visualizzazione dell'SMI-32 confermano che l'area 45B, come già descritto nel precedente studio architettonico, presenta grosse cellule piramidali nelle porzioni più profonde del III strato ed un V strato poco immunoreattivo (Fig. 3, pannello D), caratteristiche che la distinguono nettamente dall'area 8/FEF in cui sono invece evidenti soprattutto le grosse cellule piramidali del V strato (Fig. 3, pannello D1).

Nei Casi 36l DY (Fig 1D), 36r FR (Fig. 1E) e 37l CTBg (Fig. 1C) la localizzazione dei siti di iniezione nell'area 8/FEF è stata attuata anche mediante controllo fisiologico ovvero, come già descritto nei metodi, inducendo attraverso microstimolazione a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico; la localizzazione dell'area 8/FEF mediante controllo fisiologico parte dal presupposto che la nostra area 8/FEF rappresenta la controparte architettonica dei FEF; Analogamente ad altri studi (vedasi, Huerta e coll. 1987; Stanton e coll.1988; Schall e coll., 1995) nelle penetrazioni attuate in corrispondenza delle regioni più dorsali del banco anteriore dell'IAS i movimenti oculari sono stati facilmente evocati ripetibilmente in tutti i siti di stimolazione anche con correnti pari o inferiori ai 50  $\mu$ A; usando questi parametri e spostandosi ventralmente lungo il solco arcuato abbiamo invece osservato una diminuzione non solo dell'ampiezza delle saccadi evocate ma anche del numero di siti in cui i movimenti saccadici sono stati facilmente osservabili e ripetibili; in alcuni dei siti inizialmente non stimolabili è stato comunque possibile evocare saccadi, di ampiezza ridotta, aumentando la durata dei treni di stimolazione fino a 100 msec. Le successive analisi istologiche hanno evidenziato che tutte queste penetrazioni, rappresentate dai cerchi rossi in Fig. 1 pannelli C-E, sono state effettuate in corrispondenza dell'area architettonicamente definita come 8/FEF. Le stimolazioni attuate ancor più ventralmente, in corrispondenza dell'area 45B (vedasi la penetrazione osservabile nella Fig. 3B), non si sono invece dimostrate in grado di elicitarne movimenti oculari né aumentando la durata dei treni di stimolazione né aumentando

l'intensità di corrente utilizzata, fino ai 100 $\mu$ A. Queste osservazioni sono in perfetto accordo con gli studi di Stanton e coll. (1989) che delimitano il settore dove è possibile indurre efficacemente movimenti oculari di tipo saccadico in corrispondenza del settore del banco dell'arcuato dove sono presenti grosse cellule piramidali nel V strato. In definitiva nei Casi 36l DY, 36r FR e 37l CTBg, le iniezioni sono state effettuate in corrispondenza dei siti in cui con stimolazioni a bassa soglia era possibile indurre movimenti oculari di tipo saccadico (vedasi Fig. 4B), siti inoltre completamente delimitati nella porzione ventrale dell'area architetticamente definita come 8/FEF (vedasi Fig. 4, B1 e B2), dove sono abbiamo osservato grosse cellule piramidali anche nelle sezioni processate per la visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32. Nel caso 35r, l'iniezione di FR è stata invece posizionata più dorsalmente ad un livello medio-laterale corrispondente alla punta posteriore del PS.

Nelle aree 8r, 46 e 12r le iniezioni sono state effettuate in prossimità del bordo con il quale queste aree confinano rispettivamente con l'area 45B e l'area 45A. Nell'area 8r i traccianti sono stati iniettati sia nella porzione più ventrale (Caso 37l CTBr, Fig. 1C) che in posizione leggermente più mediale (Caso 39r FB).

Nell'area 46 le iniezioni (Caso 26l CTBg, Fig. 1G e Caso 23l FB) sono state posizionate esclusivamente nella porzione ventrale e caudale dell'area, che è chemoarchitetticamente differente dalla parte rostrale, vedasi lo studio architettico, e potrebbe corrispondere, almeno in parte, con l'area denominata 9/46 da Petrides e Pandya (1994; 2002; vedasi Fig. 1 dello studio architettico). Nell'area 12r le iniezioni sono state effettuate esclusivamente in corrispondenza della parte più caudale dell'area ovvero nella porzione confinante con l'area 45A.

In generale i pattern di marcatura delle diverse aree della VLPF caudale sono estremamente riproducibili sia tra casi differenti che tra animali diversi; anche l'analisi quantitativa mostra percentuali di cellule marcate estremamente riproducibili da caso a caso. Le iniezioni di traccianti retro-anterogradi (FR) o prevalentemente anterogradi (BDA) nelle aree 45A, 45B ed 8/FEF evidenziano inoltre che le connessioni di queste aree possono essere considerate reciproche.

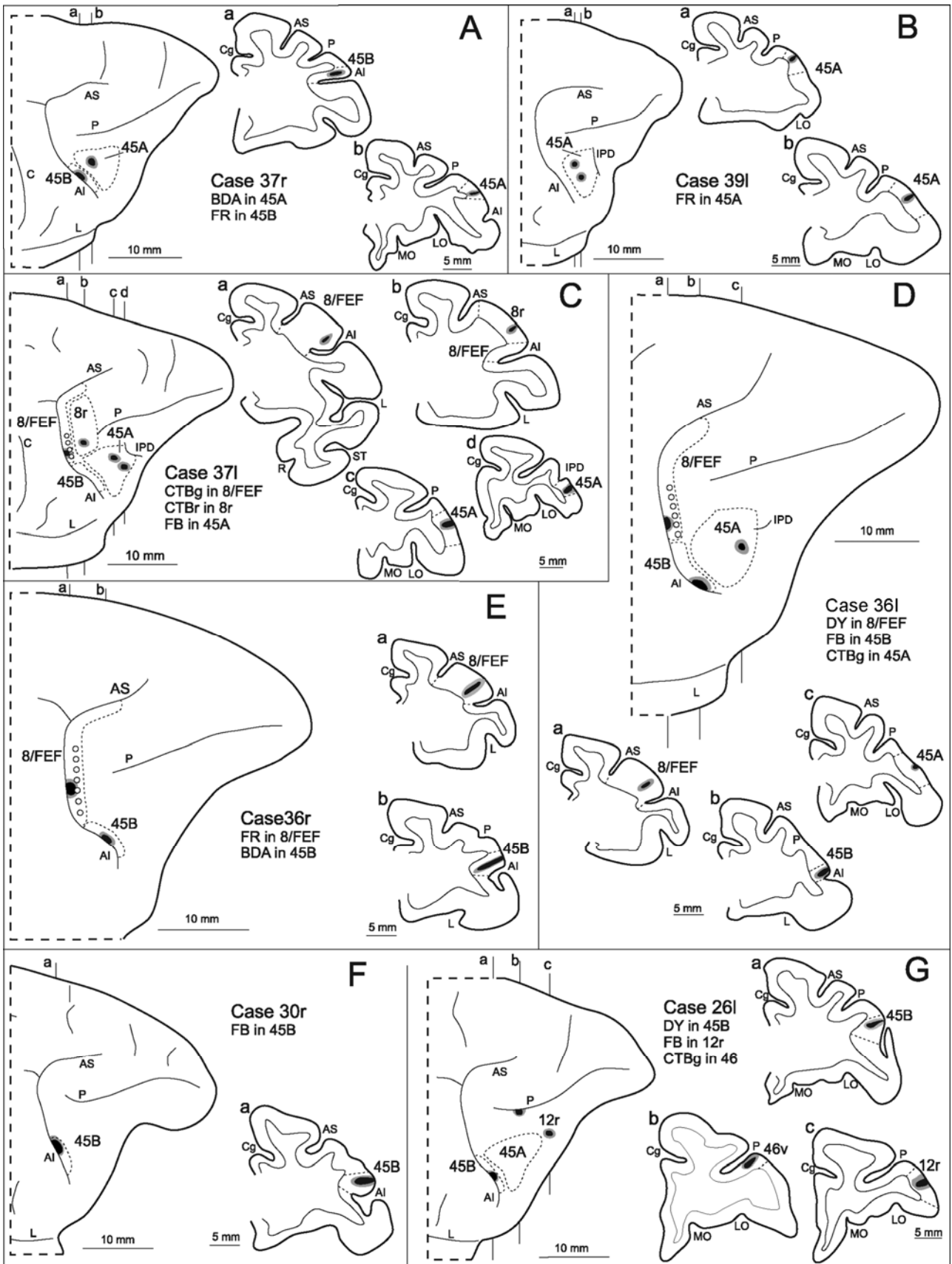
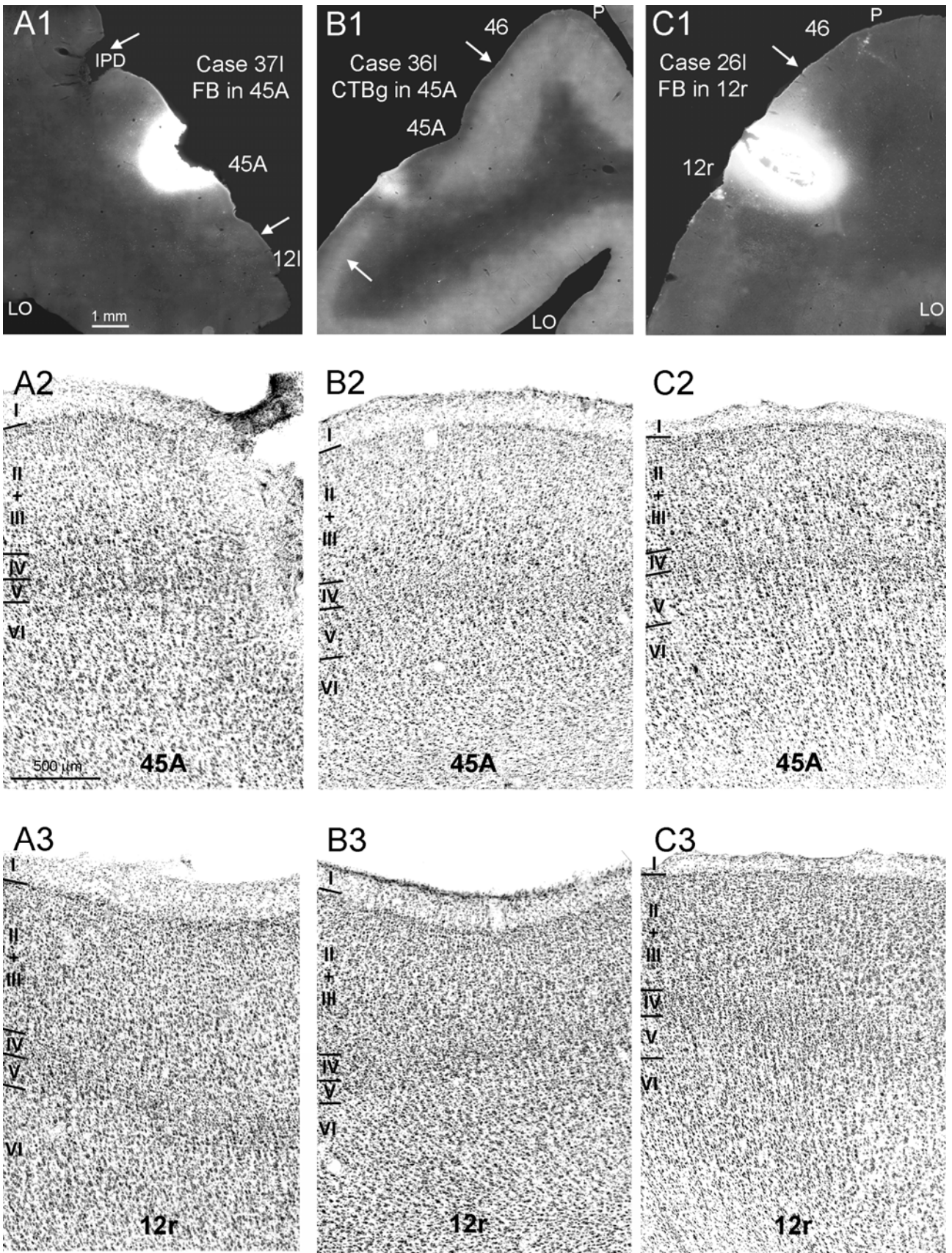


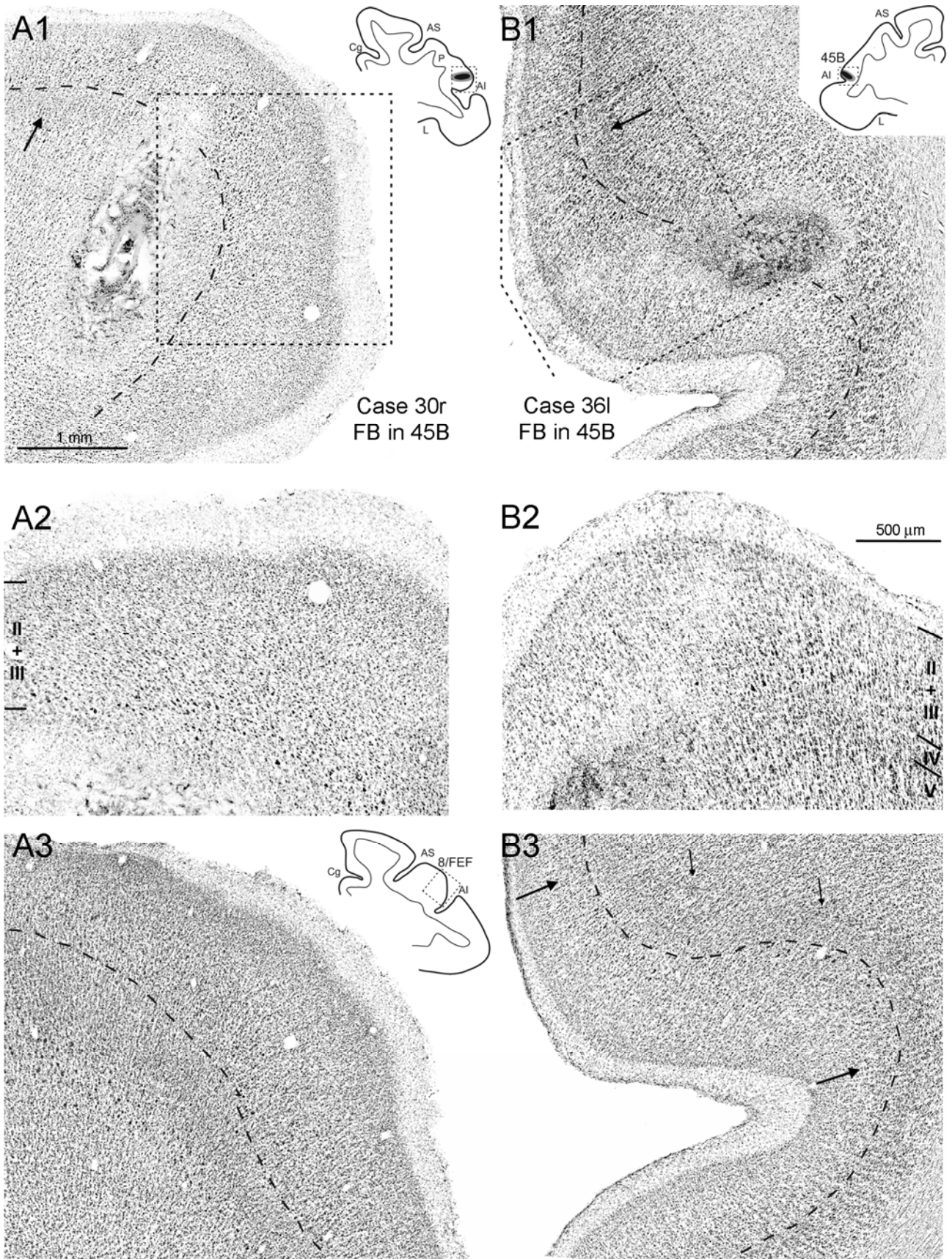
Figura 1



**Figura 2**

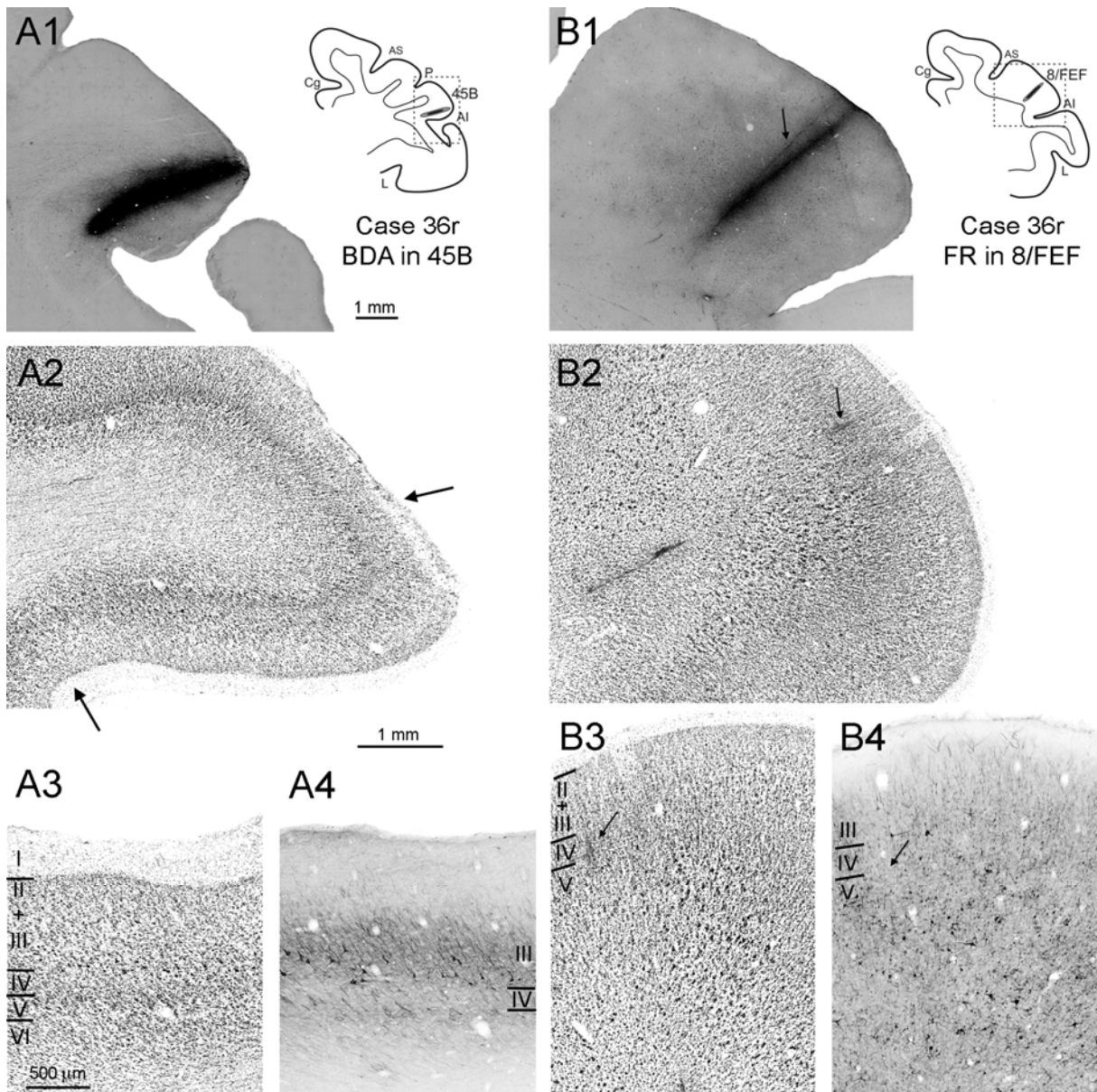
**Figura 1.** Localizzazione anatomica dei siti di iniezione. Ciascun sito di iniezione è mostrato su disegni bidimensionali rappresentanti visioni dorso-laterali degli emisferi iniettati ed in disegni di sezioni coronali in cui il core dell'iniezione è mostrato in nero e l'alone in grigio. Le linee tratteggiate su ciascun disegno bidimensionale degli emisferi e su ogni sezione coronale delimitano i bordi citoarchitettonici delle aree iniettate. I cerchi vuoti disegnati sulla convessità prearcuata dei Casi 37l (C), 36l (D) e 36r (E) rappresentano i punti delle penetrazioni degli elettrodi in corrispondenza dei quali con stimoli a bassa soglia, intensità di corrente  $<50 \mu\text{A}$ , è possibile evocare movimenti oculari di tipo saccadico. Per favorire il confronto tutte le ricostruzioni in questa figura e nelle successive sono rappresentate come emisferi destri. AI = solco arcuato inferiore; AS = solco arcuato superiore; C = solco centrale; Cg = solco cingolato; IPD = fossetta prefrontale inferiore; L = solco laterale; LO = solco laterale orbitale; MO = solco mediale orbitale; P = solco principale; R = solco rinale; ST = solco temporale superiore.

**Figura 2.** Parte superiore: immagini fotografiche a basso ingrandimento dei siti di iniezione delle aree 45A (A1, Caso 37l FB e B1, Caso 36l CTBg) e 12r (C1, Caso 26l FB); le frecce indicano i bordi architettonici delle aree iniettate. Parte intermedia: immagini fotografiche di campi citoarchitettonici rappresentativi, provenienti dai Casi 37l (A2), 36l (B2) e 26l (C2), dell'area 45A; le immagini fotografiche dei pannelli A2 e B2 provengono da sezioni trattate con la colorazione di Nissl adiacenti rispetto a quelle presentate nei pannelli A1 e B1. Parte bassa: immagini fotografiche di campi citoarchitettonici rappresentativi, provenienti dai Casi 37l (A3), 36l (B3) e 26l (C3), dell'area 12r; l'immagine fotografica mostrata nel pannello C3 proviene da una sezione trattata con la colorazione di Nissl adiacente rispetto a quella presentante il sito mostrata nel pannello C1. La scala in A1, è applicata anche a B1 e C1; La scala in A2, è applicata anche a B2, B3, C2 e C3. Abbreviazioni come in Figura 1.



**Figura 3**

**Figura 3.** Pannelli **A1** e **B1**: immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni rappresentative trattate con la colorazione di Nissl e presentanti siti di iniezione nell'area 45B (il sito presentato nel pannello A1 proviene dal Caso 30r FB; quello in B1 dal Caso 36l FB); le linee tratteggiate sui disegni delle sezioni coronali indicano la localizzazione anatomica da cui sono state tratte le immagini fotografiche. In ciascuna immagine fotografica le linee tratteggiate indicano il bordo tra il III ed il IV strato ed i bordi architettonici rispettivamente dell'area 45B con l'area 8r (A1) e con l'area 45A (B1); i rettangoli tratteggiate nelle immagini fotografiche dei pannelli A1 e B1 indicano la porzione corticale da cui sono state tratte le immagini fotografiche ad alto ingrandimento mostrate nei pannelli A2 e B2. **A3**: immagine fotografica a basso ingrandimento di una sezione trattata con la colorazione di Nissl di un campo rappresentativo dell'area 8/FEF proveniente dal Caso 30r; i rettangoli tratteggiate sul disegno della sezione indicano la porzione corticale da cui è stata tratta l'immagine fotografica. **B3**: immagine fotografica a basso ingrandimento di una sezione trattata con la colorazione di Nissl di un campo rappresentativo dell'area 45B tratta dal Caso 36l e localizzata ad un livello antero-posteriore (AP) situato 900 $\mu$ m più caudale rispetto a quello del pannello B1; le frecce di dimensione maggiore indicano la posizione dei bordi architettonici dell'area 45B; le frecce di dimensione minore indicano le tracce delle penetrazioni degli elettrodi, localizzate principalmente nel V strato, in cui stimolazioni a bassa soglia non si sono dimostrate efficaci nell'indurre movimenti oculari saccadici. La scala in A1 è applicata anche a B1, A3 e C3; La scala in B2, è applicata anche ad A2 e B2. Abbreviazioni come in Figura 1.



**Figura 4.** Pannelli **A1** e **B1**: immagini fotografiche a basso ingrandimento dei siti di iniezione di BDA (A1) e di FR (B1), localizzati rispettivamente nelle aree 45B ed 8/FEF del Caso 36r; i rettangoli tratteggiati nei disegni delle sezioni coronali indicano il settore corticale dal quale sono tratte le immagini fotografiche. Pannelli **A2** e **B2**: immagini fotografiche a basso ingrandimento di sezioni trattate con la colorazione di Nissl adiacenti a quelle dei pannelli A1 e B1; le frecce nel pannello A2 indicano il bordo dell'area 45B. Pannelli **A3** e **B3**: immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi rappresentativi delle aree 45B ed 8/FEF delle sezioni trattate con la colorazione di Nissl mostrate nei pannelli A2 e B2. Pannelli A4 e B4: immagini fotografiche ad alto ingrandimento di campi rappresentativi delle aree 45B ed 8/FEF provenienti da sezioni trattate per la visualizzazione delle cellule immunopositive all'SMI-32 adiacenti rispetto a quelle mostrate in A3 e B3. Le frecce nei pannelli B1-B4 indicano le tracce delle penetrazioni degli elettrodi in cui con stimolazioni a bassa soglia, intensità di corrente  $<50\mu\text{A}$ , è stato possibile indurre movimenti oculari saccadici. Scala in A1, applicata anche a B1; scala in A2, applicata anche a B2; scala in A3 applicata anche a A4, B3 e B4. Abbreviazioni come in Figura 1.

La figura 3 mostra la distribuzione della marcatura retrograda osservata nelle ricostruzioni tridimensionali dei Casi 37l FB e 36l CTBg. Nelle figure 4 e 5 sono presentati disegni di sezioni coronali che mostrano, rispettivamente, la distribuzione di marcatura retrograda del Caso 37l FB e la distribuzione dei terminali marcati del Caso 37r BDA. Nel Caso 39r FR, che non è presentato in nessuna figura, è stata osservata una distribuzione sia di cellule che di terminali marcati estremamente simile e riproducibile rispetto a quella degli altri casi. La percentuale delle cellule marcate osservata nei Casi 36l CTBg e 37l FB è mostrata in Tabella 4.

Nella VLPF (Fig. 3), densa marcatura intrinseca si estendeva globalmente attraverso tutta l'area; questa marcatura si estende inoltre caudalmente nell'area 45B (Fig. 4, sezione f; Fig 5, sezioni e, f), ventralmente nell'area 12l (Fig. 4, sezione e) e rostralmente nella parte più caudale dell'area 12r (Fig. 4, sezione d; Fig. 5, sezioni c, d). Molto limitata è stata invece la marcatura osservata nella parte ventrocaudale dell'area 46. Relativamente densa marcatura è stata osservata, in tutti i casi, in corrispondenza della porzione caudale della DLPF; in particolare questa marcatura si estendeva dalla parte più caudale dell'area 9 all'adiacente area 8B (Fig. 4, sezione d, e; Fig. 5, sezione d) ed a diversi livelli rostro-caudali della porzione dorsale dell'area 46 (Fig. 4, sezioni b, c e d; Fig. 5, sezioni b, c e d). La marcatura nell'area 46 si estendeva anche nella parte più ventro-rostrale dell'area, tranne nel Caso 36l CTBg. Forti connessioni, in tutti i casi, sono state osservate in corrispondenza dell'area 10 del polo frontale (Fig. 4, sezione a; Fig. 5, sezione a). Relativamente densa marcatura è stata osservata nell'area 8/FEF (Fig. 4, sezione h, i ;Fig. 5, sezione g) e nell'area 8r (Fig. 4, sezione f, g; Fig. 5, sezione f); nei Casi 37l FB e 36l CTBg la marcatura in queste due aree era però limitata esclusivamente alle porzioni più dorsali di ambedue questi settori corticali. Infine, a livello orbitofrontale, dense connessioni sono state osservate nell'area 12o (Fig. 4, sezione e; Fig 5, sezioni d, e).

Due altri settori frontali erano considerevolmente marcati in tutti i casi studiati; uno corrisponde ai campi oculari supplementari (SEF; Schlag e Schlag-Rey 1987) della premotoria dorsale (F7-SEF in Luppino e coll. 2003; Fig. 4, sezioni f, g; Fig. 5, sezioni e, f), l'altro era localizzato in corrispondenza del fondo del solco arcuato in un settore recentemente definito come area 44 (Petrides e Pandya 2002; Belmalih e coll. 2008) (Fig. 4, sezioni f, g, h; Fig 5, sezioni f, g). Infine sebbene in numero esiguo alcune cellule sono state osservate anche in corrispondenza dell'area F5.

La distribuzione laminare della marcatura retrograda ed anterograda in tutto il lobo frontale, tranne per quanto riguarda la marcatura orbitale, ha evidenziato un pattern in cui le cellule marcate sono equamente distribuite negli strati supragranulari ed infragranulari e nel quale i terminali decorrono lungo tutti gli strati corticali, in modo colonnare; in virtù di queste caratteristiche tutte queste

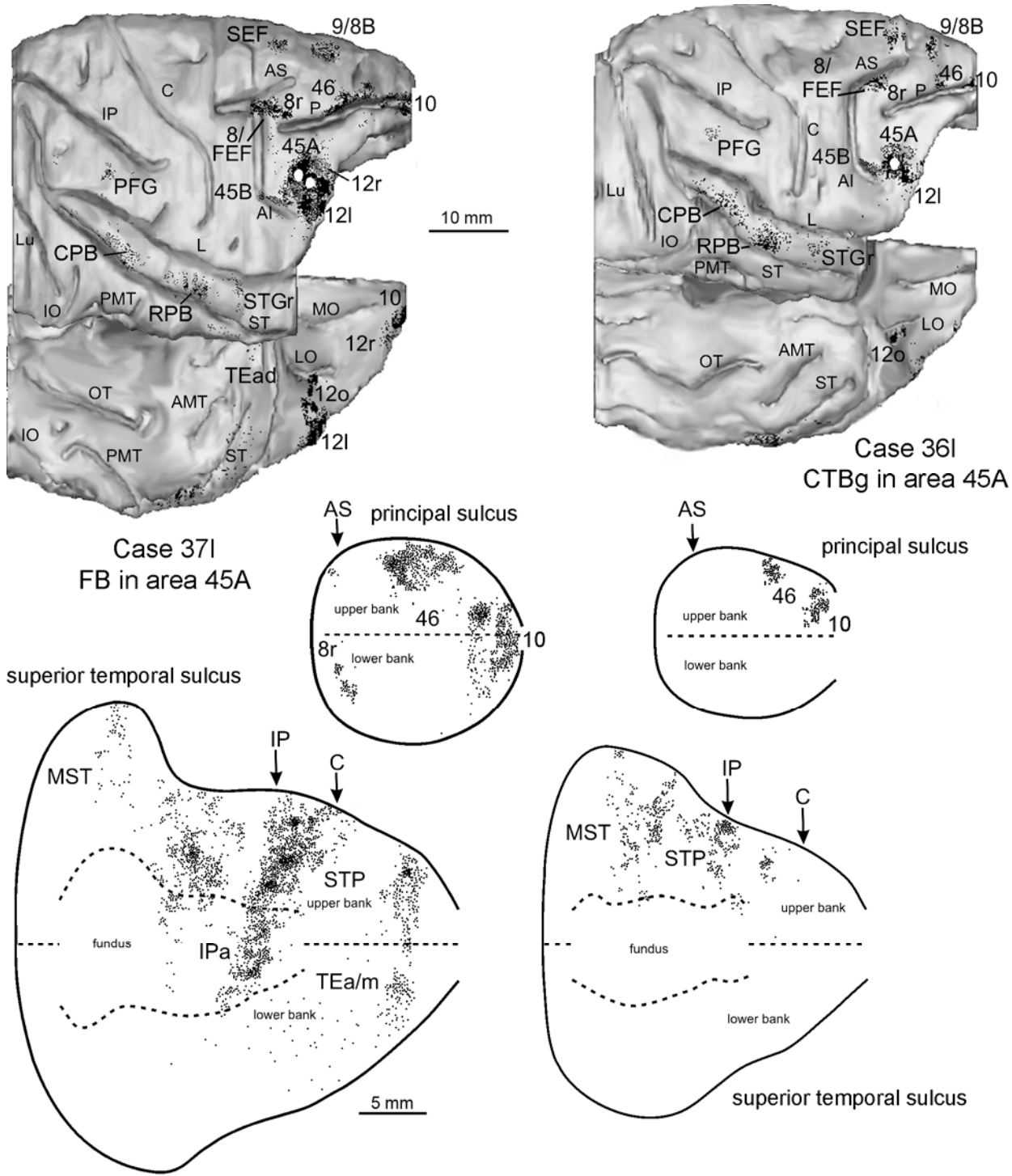
connessioni sono state classificate secondo il modello di Van Essen come “laterali”. Differentemente da tutte le connessioni frontali nell'area 12o della corteccia orbitale sia le cellule che i terminali marcati sono stati localizzati esclusivamente negli strati IV, V e VI.

Al di fuori del lobo frontale l'unica regione che ha evidenziato significative connessioni con l'area 45A è la corteccia temporale (Fig. 3), dove è localizzata circa il 24% della totalità della marcatura osservata; questa marcatura temporale è pressochè esclusivamente confinata in corrispondenza dell'STG; due in particolare sono stati i settori dell'STG maggiormente marcati: le regioni rostrali (RPB) e caudali (CPB) del parabelt (Fig. 6, sezioni k, l, n ;Fig. 7 sezioni i, j, m) della corteccia acustica (Kaas e Hackett 2000; Saleem e coll. 2008) e la parte medio rostrale del banco dell'STS, l'area fisiologicamente definita come STP, dove la marcatura tendeva a formare due distinti aggregati, uno più caudale ed uno più rostrale (Fig. 6, sezioni n, o; Fig. 7 sezioni l, m, n). Relativamente limitata marcatura è stata osservata anche nella parte più rostrale del giro temporale superiore (STGr; Kaas e Hackett 2000; Saleem e coll. 2008). Ulteriore marcatura, seppur meno ricca rispetto a quella osservata nelle regioni dell'STG, è stata riscontrata anche in corrispondenza delle aree acustiche del belt laterale (RTL) (Fig. 4, sezione j) e mediale (RTM e RM) (Fig. 4, sezioni k, l; Fig. 5, sezioni i, 6B). In tutti i casi, tranne il Caso 36l CTBg, ulteriore marcatura è stata osservata anche in corrispondenza della regione del fondo dell'STS corrispondente all'area IPa (Figs. 4, sezione m; Fig. 5, sezioni i, l, m), e benchè limitatamente anche in varie suddivisioni della corteccia inferotemporale, ad un livello antero-posteriore corrispondente a TE. L'assenza di marcatura nel Caso 36l CTBg, in corrispondenza della parte rostrale dell'area STP, nell'area IPa e nelle aree della corteccia inferotemporale potrebbe o riflettere l'esistenza di una topografia rostro-caudale all'interno dell'area, l'iniezione del Caso 36r è infatti l'iniezione più rostrale, o risentire della posizione superficiale del sito di iniezione, che comprende infatti esclusivamente il III strato.

In tutte le aree temporali la distribuzione della marcatura retrograda appare bilaminata mentre i terminali hanno mostrato invece due differenti tipologie di distribuzione: in corrispondenza dell'STG si distribuivano prevalentemente nel IV strato e nelle porzioni profonde del III, distribuzione simile a quella definita a “feedforward” secondo il modello di Felleman e Van Essen, nella porzione rostrale di TEa/m ed in IPa la marcatura tendeva invece a localizzarsi maggiormente negli strati più superficiali, soprattutto nell'area TEa/m dove anche i primi strati sono fortemente marcati.

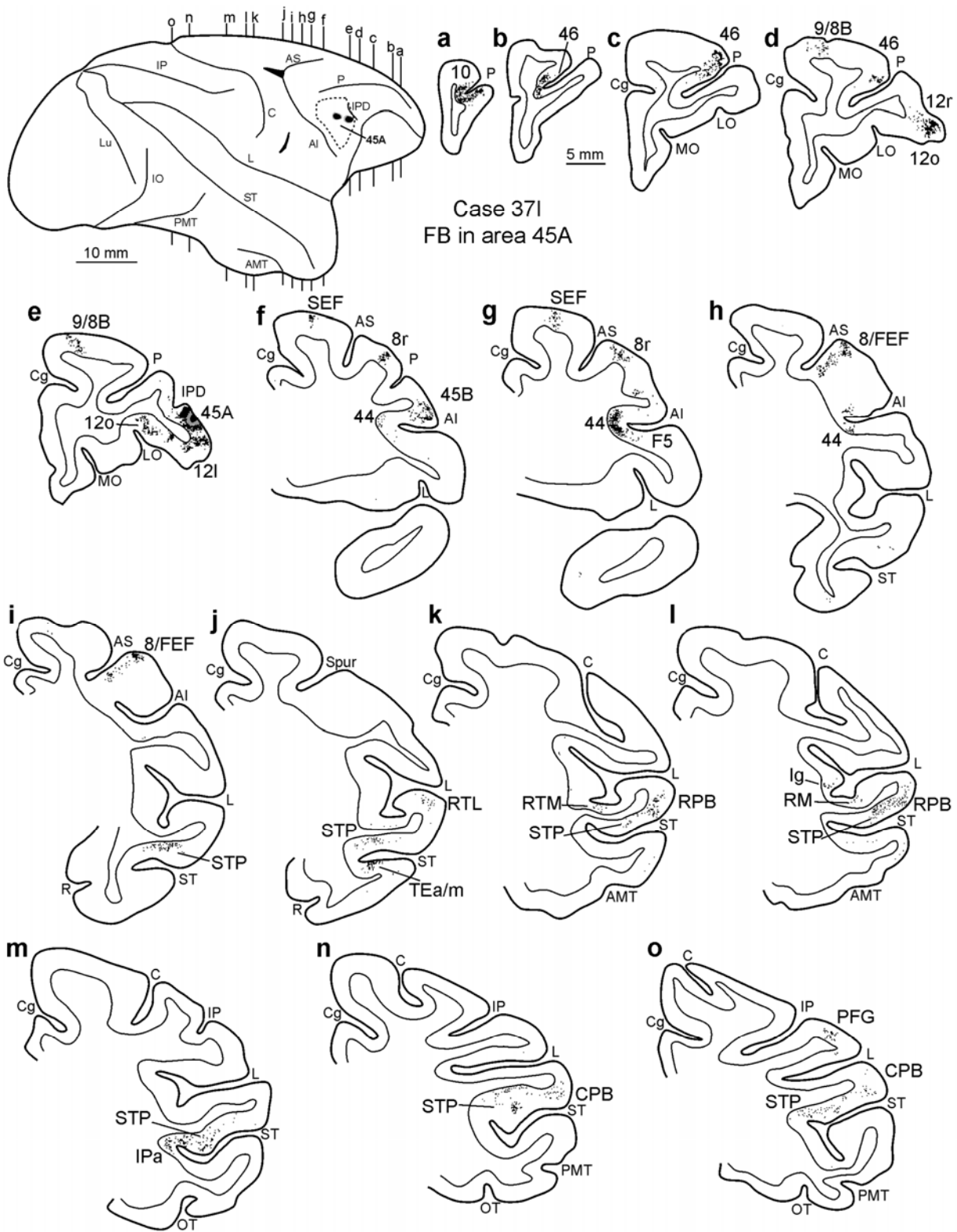
A livello della corteccia parietale in tutti i casi, sebbene relativamente limitata, è stata osservata marcatura nell'area PFG della convessità del lobulo parietale inferiore (Fig. 5; Fig. 6 sezione o; Fig. 7 sezione n).

Eccetto per alcune sparse cellule nell'insula e nella parte rostrale della corteccia cingolata non abbiamo osservato connessioni provenienti da nessun'altra regione corticale.

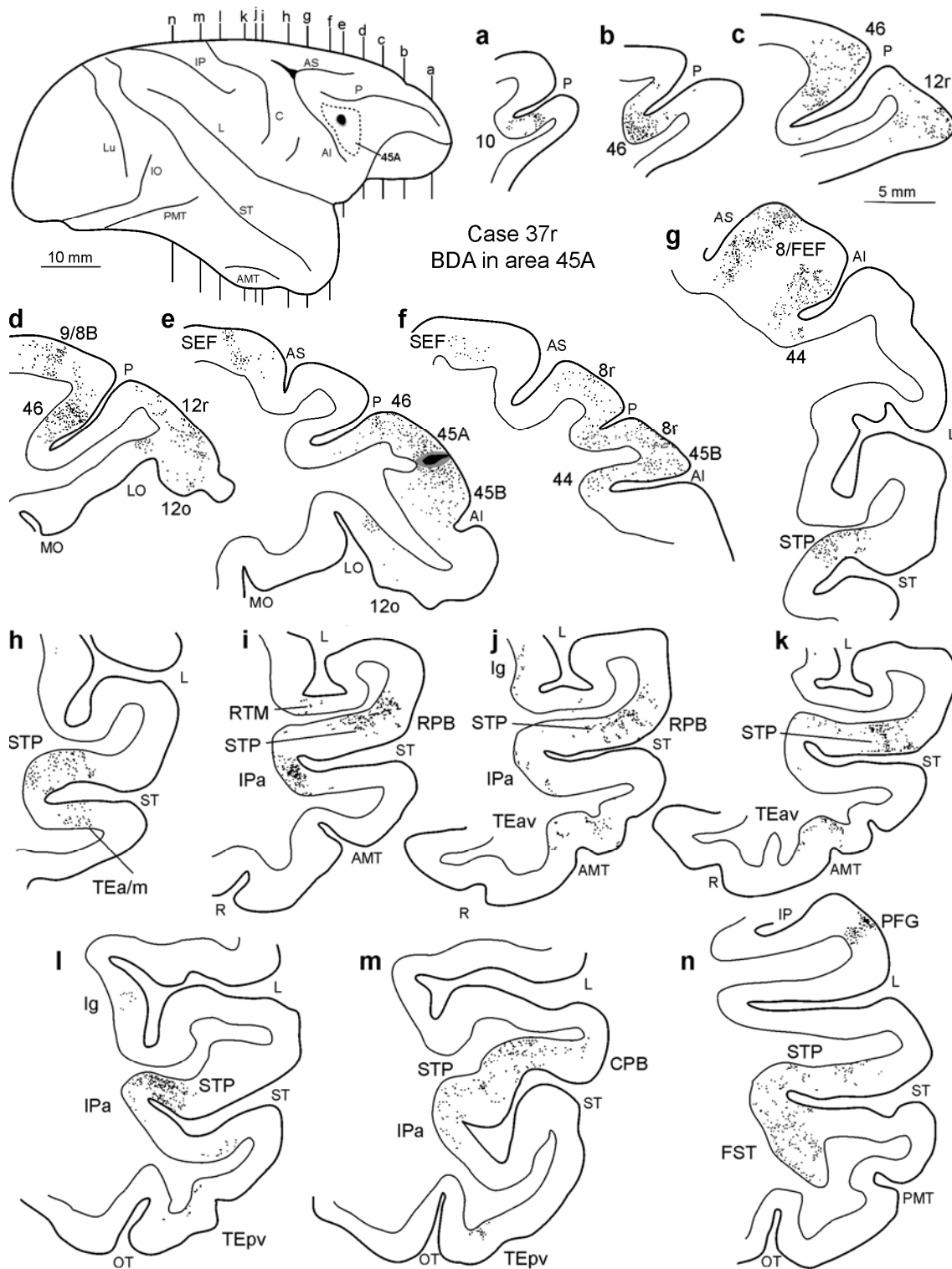


**Figura 5**

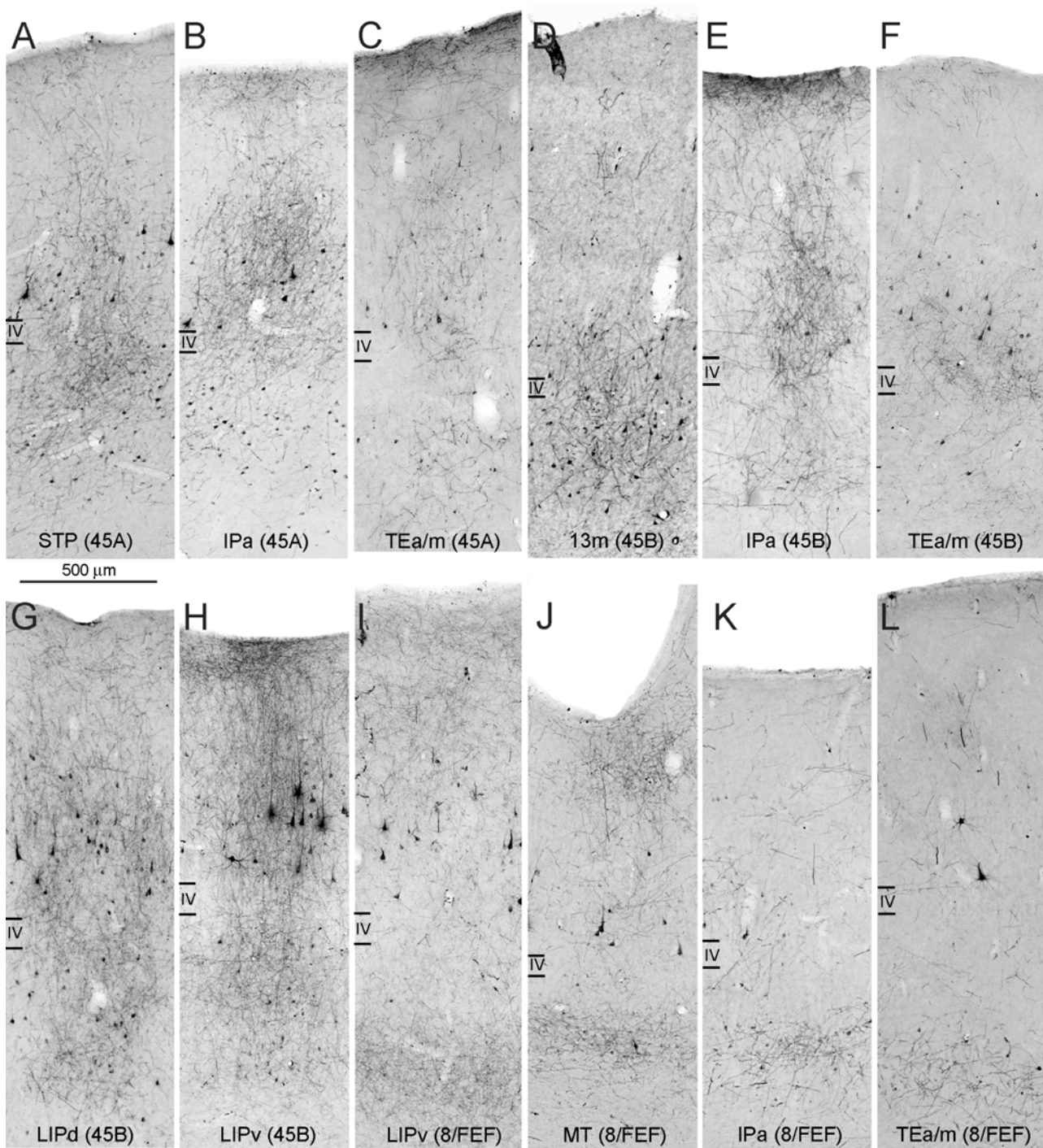
**Figura 5.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezioni nell'area 45A nei Casi 371 (FB) e 361 (CTBg), mostrata mediante visioni dorsolaterali ed dal basso di ricostruzioni 3D degli emisferi iniettati (parte superiore) e mediante ricostruzioni bidimensionali del PS e del STS (parte inferiore). Ciascun punto corrisponde ad un neurone marcato. Ogni ricostruzione bidimensionale del PS è stata allineata in corrispondenza del fondo. Le linee tratteggiate corrispondono al fondo mentre le linee continue corrispondono alle labbra del solco. Le frecce indicano il livello più rostrale dell'AS. Ciascuna ricostruzione bidimensionale del STS è allineata in corrispondenza del fondo. Le linee tratteggiate corrispondono e sono localizzate sul fondo e sulle labbra del fondo mentre le linee continue corrispondono alle labbra del solco. Le frecce indicano il livello più rostrale dell'IPS (IP) e del CS (C). La localizzazione anatomica di ciascun sito di iniezione è visualizzata in bianco in corrispondenza delle visioni dorsolaterali di ciascun emisfero. AMT =; IO = solco occipitale inferiore; Lu = solco lunato; OT = solco occipito temporale; PMT = solco temporale posteriore mediale. Altre abbreviazioni come in Figura 1.



**Figura 6.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata nel Caso 371 FB, mostrata mediante disegni di sezioni coronali rappresentative. Le sezioni sono presentate in ordine rostro-caudale (a-o). Il disegno bidimensionale dell'emisfero iniettato nella parte in alto ed a destra della figura mostra: mediante linee continue, i livelli da cui sono state tratte le sezioni coronali, mediante linee tratteggiate, i bordi dell'area 45A, ed infine la localizzazione dei siti di iniezione, il cui core è visualizzato in nero e il cui alone in grigio. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



**Figura 7.** Distribuzione della marcatura anterograda osservata nel Caso 37r BDA, mostrata mediante disegni di sezioni coronali rappresentative. Le sezioni sono presentate in ordine rostro-caudale (a-n). La densità dei punti è proporzionale alla densità dei terminali osservati. Il disegno bidimensionale dell'emisfero iniettato nella parte a destra ed in alto della figura mostra: i livelli da cui sono state tratte le sezioni coronali, rappresentati da linee continue, i bordi dell'area 45A, rappresentati da linee tratteggiate, e la localizzazione dei siti di iniezione, visualizzati in nero, per il core, ed in grigio, per l'alone. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



**Figura 8.** Immagini fotografiche rappresentative di marcatura retrograda ed anterograde osservata a seguito di iniezioni nell'area 45A (A-C), 45B (D-H) ed 8/FEF (I-L). In ciascuna immagine fotografica è indicata l'area in corrispondenza della quale è osservata la marcatura ed, in parentesi, l'area iniettata. Le immagini dei pannelli A-C sono state tratte dal Caso 39l FR, quelle in D ed in F-H dal Caso 37r FR, quella in E dal Caso 36r BDA e quella in I-L dal Caso 36r FR. La scala è applicata a tutte le immagini.

## *Connessioni dell'area 45B*

I risultati osservati a seguito di iniezioni nell'area 45B sono congruenti in tutti i casi e gli animali iniettati, le uniche differenze, plausibilmente additabili ad uno spandimento del sito di iniezione nell'adiacente area 8/FEF sono state riscontrate nel Caso 30r FB.

La distribuzione della marcatura retrograda di tre casi, 26l DY, 30r FB e 36l FB, è presentata nelle figure 9-11; nella figura 12 sono visualizzati contemporaneamente la distribuzione di marcatura anterograda di BDA e di FR del Caso 36r, in cui i due differenti traccianti sono stati iniettati rispettivamente nell'area 45B e nella parte ventrale dell'area 8/FEF (la marcatura di BDA è visualizzata in blu mentre quella di FR è visualizzata in rosso). Benchè non sia presentato in nessuna figura la distribuzione della marcatura osservata nel Caso 37r FR è simile a quella di tutti gli altri casi studiati. Globalmente tutti questi dati hanno evidenziato un quadro di connessioni dell'area 45B nettamente distinto e segregato rispetto a quello dell'area 45A.

La distribuzione percentuale delle cellule marcate osservate nei casi 26l, 30r e 36l è presentata in tabella 4.

Nella corteccia prefrontale (Fig. 9-10) forti connessioni sono state osservate nell'area 45A, nell'area 12l e nella parte caudale dell'area 12r (Fig. 8 sezioni c, d, e; Fig. 9 sezione b); anche le connessioni osservate nelle aree 8r ed 8/FEF sono molto robuste, queste connessioni inoltre erano quantitativamente maggiori rispetto a quelle osservate a seguito di iniezioni nell'area 45A e ne differivano anche qualitativamente in quanto localizzate prevalentemente nella parte più ventrale di ambedue le aree (Fig. 11 sezione h; Fig. 12 sezione e). Ulteriori connessioni riscontrate nella parte caudale della VLPF sono state localizzate in corrispondenza sia del banco dorsale che di quello ventrale dell'area 46. Più rostralmente densa marcatura è stata osservata nel banco ventrale dell'area 46 (Fig. 11 sezione b) e nella parte rostrale dell'area 12r (Fig. 11 sezione a; Fig. 12 sezione a), ambedue settori privi di marcatura a seguito di iniezioni nell'area 45A. Nella DLPF l'unica area densamente marcata è stata l'area 8B (Fig. 11 sezione d; Fig. 12 sezione c). Nella corteccia orbitofrontale la marcatura era quantitativamente meno ricca ma più estesa, rispetto a quella osservata a seguito di iniezioni nell'area 45A, ed interessava oltre all'area 12o anche le aree 12m, 13m e benchè con maggiore variabilità l'area 11 (Fig. 10 sezioni c-e; Fig. 11 sezioni b, c).

Al di fuori della corteccia prefrontale l'unica rilevante marcatura osservata nel lobo frontale era localizzata nei SEF (Fig. 8 sezione e; Fig. 9 sezioni d, e) mentre limitate sono le connessioni osservate nell'adiacente area 44.

In tutto il lobo frontale la marcatura anterograda era di tipo colonnare mentre la retrograda era bilaminata, l'unica eccezione era rappresentata dalla marcatura osservata nelle cortecce orbitofrontali in cui sia i terminali che i neuroni marcati erano localizzati prevalentemente negli

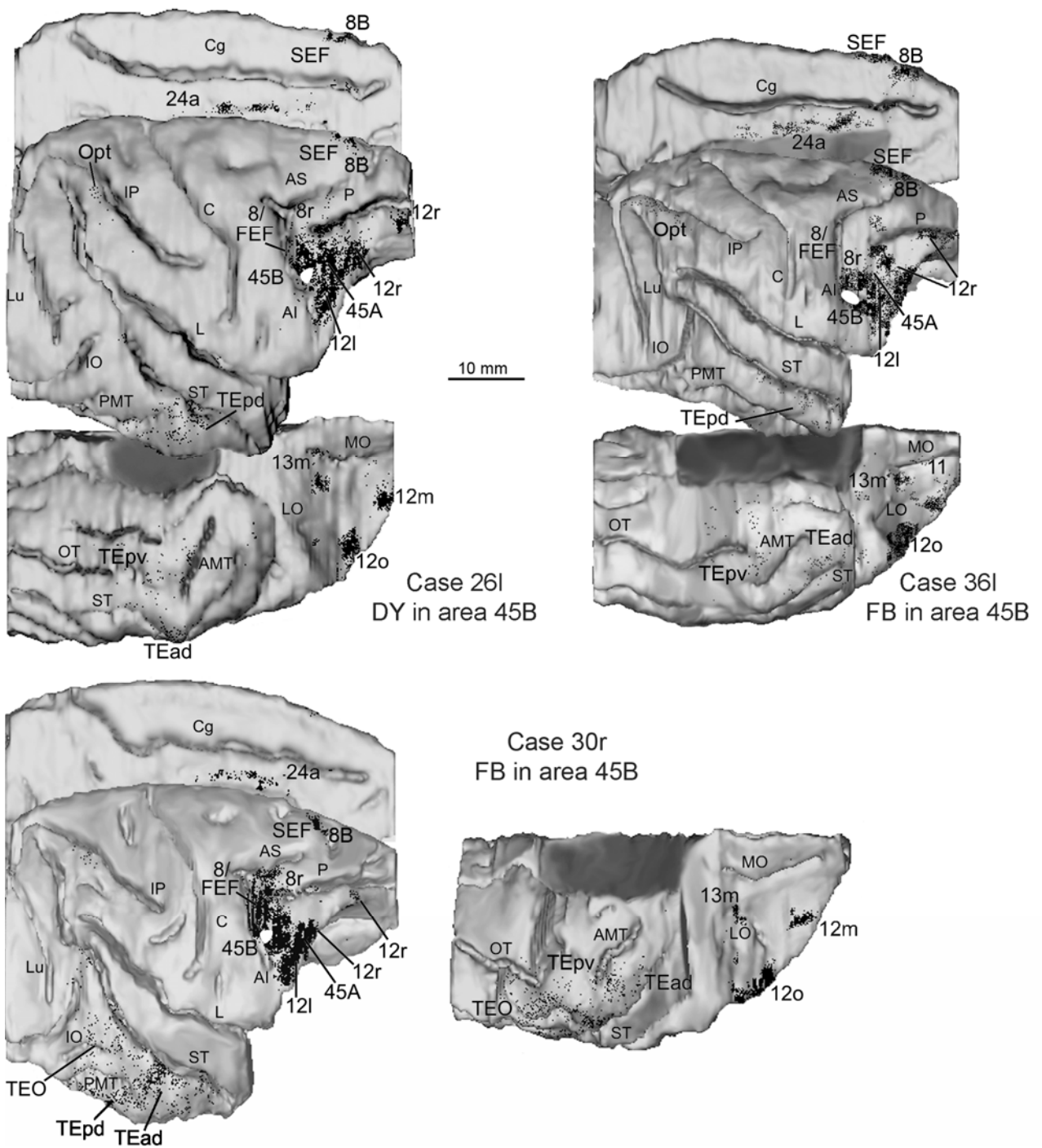
strati profondi (Fig. 8 pannello D).

Al di fuori della corteccia prefrontale le principali connessioni dell'area 45B sono state osservate nella corteccia temporale (Figure 9, 10 e 12); queste proiezioni oltre ad essere quantitativamente ridotte rispetto a quelle dell'adiacente area 45A (costituiscono infatti solo circa il 6% delle proiezioni totali) se ne distinguevano in quanto completamente confinate nelle regioni della convessità della corteccia inferotemporale ed in corrispondenza delle regioni del fondo e del banco ventrale dell'STS; la marcatura osservata nel banco dell'STS era localizzata ad un livello antero-posteriore intermedio (Fig. 11, sezioni j, k; Fig. 12 sezioni g, h) e si estendeva dall'area TEa/m all'adiacente area IPa (Fig. 11 sezioni k, l; Fig. 12 sezioni g, h); relativamente ridotta era invece la marcatura riscontrata nelle parti più rostrali dell'STS. La marcatura osservata nelle regioni della convessità della corteccia inferotemporale era localizzata soprattutto in corrispondenza dell'area TEpd (Fig. 11 sezioni j, k, l; Fig. 12 sezioni g, h); nel caso 30r la marcatura si estendeva anche più caudalmente in corrispondenza di TEO. Nei casi 36r BDA e 37r FR relativamente limitate connessioni sono state osservate anche in corrispondenza della corteccia entorinale. Completamente assente, differentemente dall'area 45A per la quale questa connessione è una delle preponderanti, era la marcatura nell'STG.

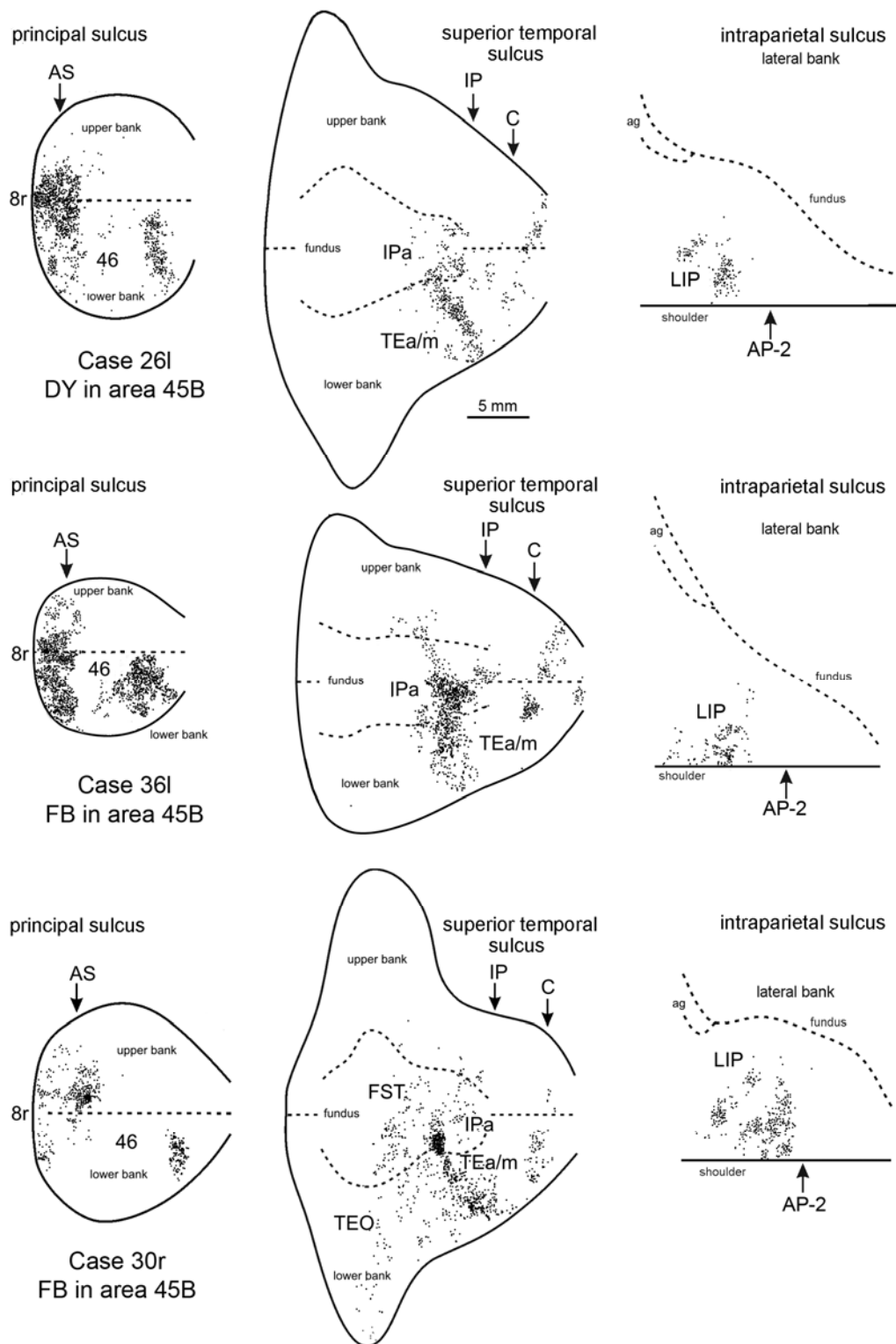
In IPa ed in TEa/m le cellule marcate presentavano un caratteristico pattern bilaminare mentre i terminali marcati due diverse distribuzioni: a) in TEa/m erano localizzati soprattutto in corrispondenza del IV strato e nelle porzioni più profonde del III (Fig. 8 pannello X) b) in IPa tendevano ad assumere una distribuzione colonnare pur presentando un decremento di marcatura nel IV strato.

Sebbene relativamente limitata, ulteriore marcatura è stata osservata anche nella corteccia parietale dove si estendeva dalla porzione dorsale dell'area LIP (LIPd di Blatt, 1990) all'adiacente area Opt. Nell'area LIP la distribuzione dei neuroni marcati era di tipo bilaminare mentre la distribuzione dei terminali tendeva ad assumere un tipico pattern colonnare. Nel caso 37r FR dove taluni terminali si estendevano anche in porzioni più ventrali dell'area LIP la distribuzione delle fibre tendeva a divenire simile ad una distribuzione a "feedback", in cui tutti gli strati erano marcati tranne il IV.

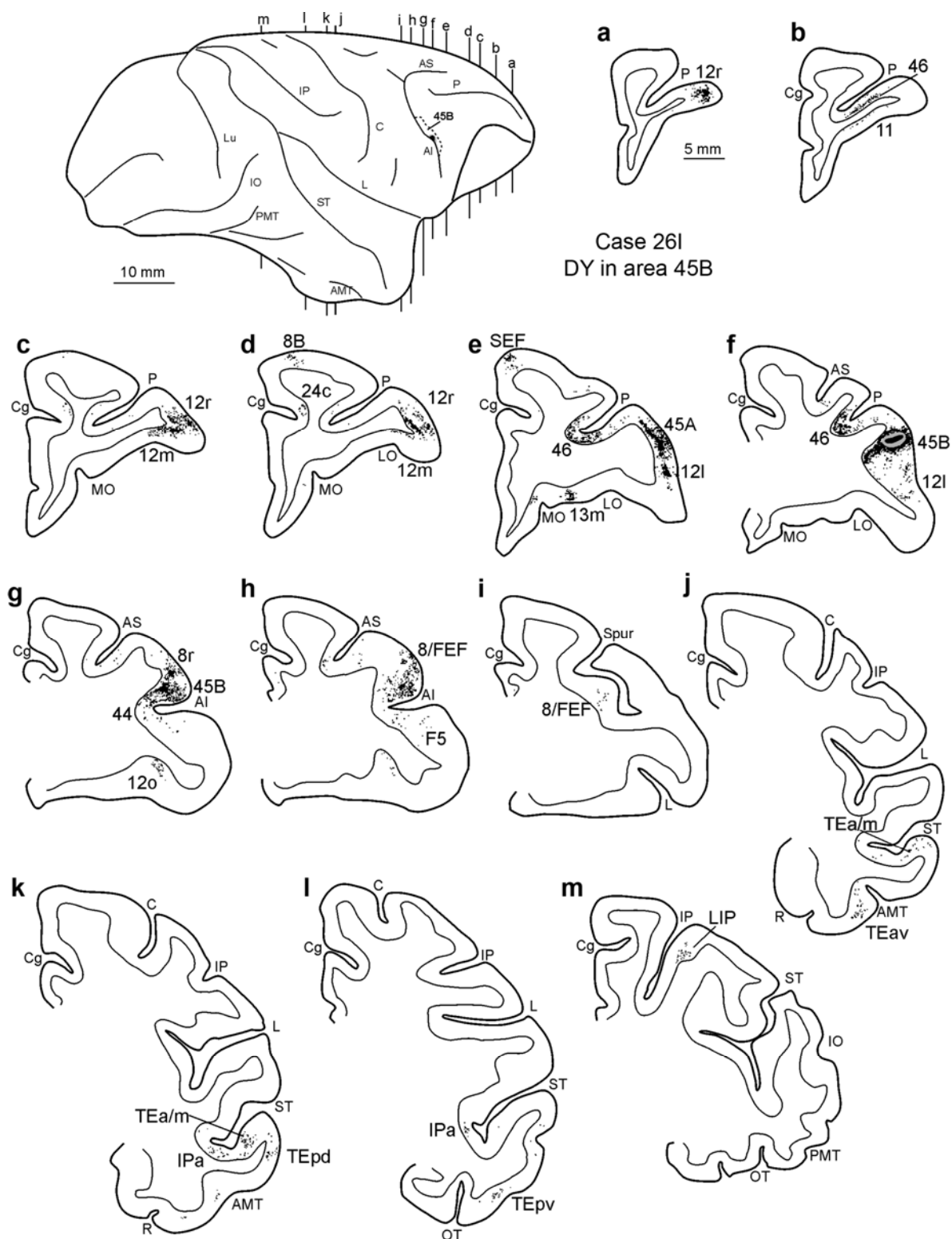
Infine relativamente dense proiezioni sono state osservate nella corteccia cingolata soprattutto nelle aree rostrali 24a e 24c.



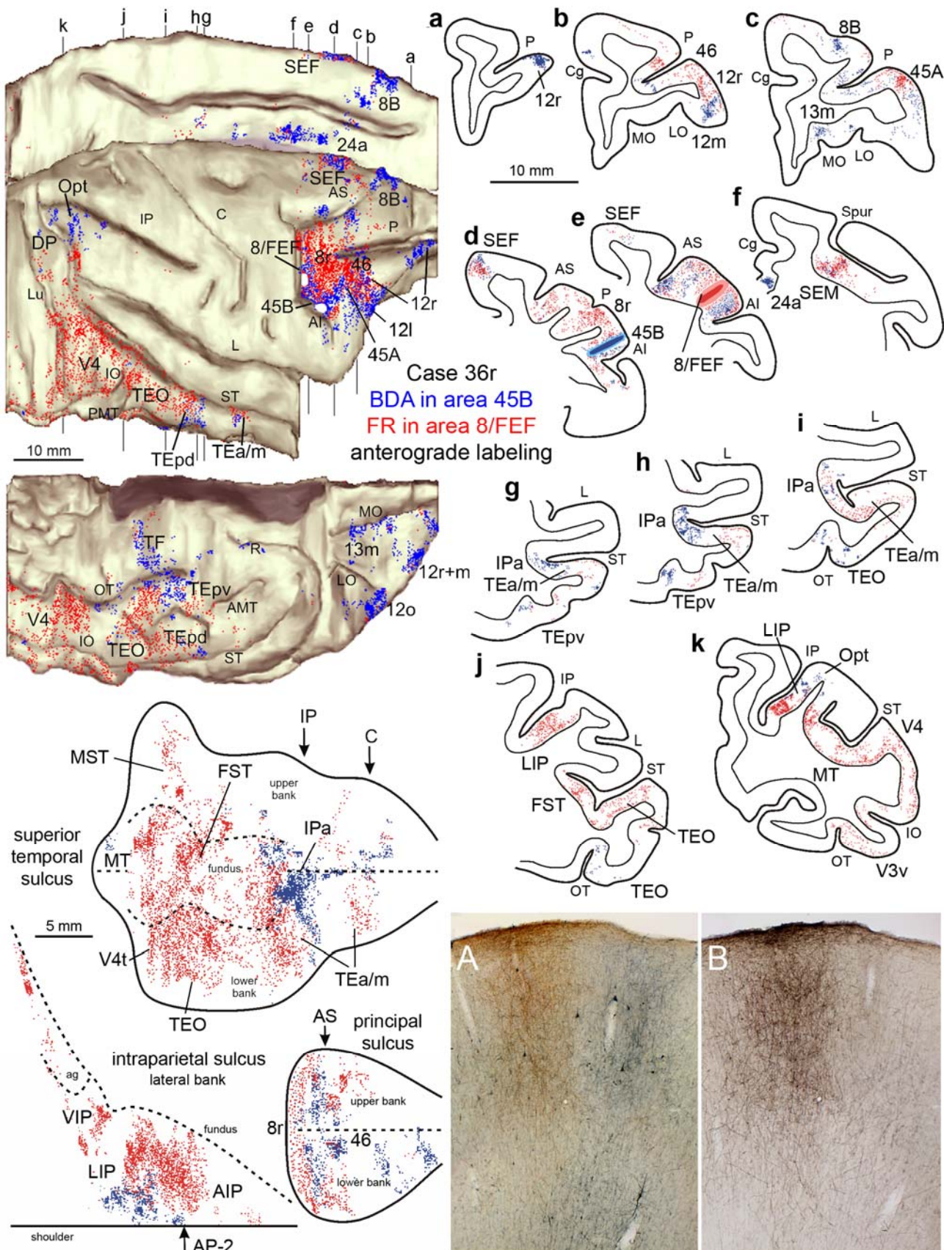
**Figura 9.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezioni nell'area 45B nei Casi 26l DY, 36l FB e 30r FB, mostrata mediante visioni dorsolaterali, mediali e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



**Figura 10.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezioni nell'area 45B nei Casi 26l DY, 36l FB e 30r FB, mostrata mediante ricostruzioni bidimensionali del PS, del STS e del banco laterale dell'IPS. Ciascuna ricostruzione bidimensionale del banco laterale dell'IPS è allineata in modo tale che il labbro laterale del banco corrisponde alla linea continua ed il fondo alla linea tratteggiata. Le frecce indicano un livello di AP pari a -2 e che coincide con il bordo funzionale dell'area AIP con l'area LIP (Borra et al., 2008). ag = giro annettente. Altre abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



**Figura 11.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata nel Caso 26l DY, mostrata in disegni di sezioni coronali rappresentative. Le sezioni sono mostrate in ordine rostro-caudale (a-m). Il disegno bidimensionale dell'emisfero iniettato nella parte a destra ed in alto della figura mostra i livelli da cui sono state tratte le sezioni coronali, rappresentati da linee continue, i bordi dell'area 45B, rappresentati da linee tratteggiate, e la localizzazione dei siti di iniezione, visualizzati in nero, per il core, ed in grigio, per l'alone. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



**Figura 12**

**Figura 12.** Distribuzione della marcatura anterograda osservata nelle aree 45B (iniezione di BDA, puntini blu) e nella parte ventrale dell'area 8/FEF (iniezione di FR, puntini rossi) del Caso 36r, mostrata mediante visioni dorsolaterali, mediali e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato (parte superiore), mediante ricostruzioni bidimensionali del PS, del STS e dell'IPS (parte inferiore) ed in disegni di sezioni coronali rappresentative mostrate in ordine rostro-caudale (a-k). I livelli a cui sono state tratte le sezioni sono mostrate sulle visioni dorsolaterali e mediali delle ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato. Abbreviazioni come nelle Figure 1, 5, 7 e 10. Nella parte bassa ed a destra della figura sono mostrate immagini fotografiche dei SEF: nel pannello A è mostrato un campo rappresentativo di marcatura di BDA (visualizzata marrone) e di FR (visualizzata in blu) trattate con il protocollo che permette la contemporanea visualizzazione di ambedue i traccianti; nel pannello B è mostrato il medesimo campo in cui è visualizzata esclusivamente la BDA con il protocollo standard.

I risultati dei casi 36l DY, 36r FR e 37l CTBg sono completamente riproducibili rispetto agli studi già presenti in letteratura nei quali è stata iniettata la parte ventrale dei FEF dove con stimoli a bassa soglia è possibile indurre movimenti oculari saccadici di ridotta ampiezza (sFEF vedi per esempio Bruce e coll. 1985; per la stimolazione fisiologica vedasi Huerta e coll. 1987; Stanton e coll. 1993; Schall e coll. 1995; Stanton e coll. 1995). Questi dati si sono rivelati utili per distinguere la parte ventrale dell'area 8/FEF, che presenta caratteristiche architettoniche e fisiologiche distinte rispetto all'adiacente area 45B, anche dal punto di vista odologico; in particolare il confronto delle connessioni tra le due aree è presentato nel già citato Caso 36r in cui sono visualizzate contemporaneamente le proiezioni di ambedue le aree. Nelle figure 13 e 14 è presentata la distribuzione di marcatura retrograda di due casi rappresentativi, il caso 36r FR ed il caso 37l CTBg; analogo è il pattern di marcatura osservato nel caso 36l DY di cui pertanto non presentiamo nessuna figura. La percentuale di marcatura stimata in ciascuna area connessa con l'area 8/FEF dei casi 36r FR e 37l CTBg è presentata in tabella 4.

Nella corteccia prefrontale la distribuzione di cellule e di terminali marcati era molto più limitata rispetto a quella osservata a seguito di iniezioni nell'adiacente area 45B, in particolare se il 90% delle cellule marcate a seguito di iniezioni in corrispondenza di quest'area era circoscritto a questo settore corticale solo il 50% di quelle osservate a seguito di iniezioni nell'area 8/FEF era localizzato in corrispondenza della corteccia prefrontale; le uniche aree di questo settore fortemente connesse con l'area 8/FEF erano le adiacenti aree 8r e la stessa 45B (Fig. 12 sezione d; Fig. 14 sezioni d,e) mentre considerevolmente meno intensa era la marcatura presente nell'area 45A e nell'area 12r, dove inoltre cellule e terminali sono limitati esclusivamente alla parte caudale dell'area (Fig. sezioni b, c; Fig. 14 sezioni d, e). Eccetto per un numero esiguo di terminali osservati nel Caso 36r in corrispondenza dell'area 8B e dell'area 46 nessun'altra area della corteccia prefrontale presentava connessioni con l'area 8/FEF.

Ulteriori connessioni nel lobo frontale sono state osservate in corrispondenza dei SEF, nei quali la marcatura si sovrapponeva in gran parte a quella osservata a seguito di iniezioni nell'area 45B (Fig. 12 sezioni d, e; Fig.14 sezione e) ed in corrispondenza di un settore, situato caudalmente rispetto all'area 8/FEF stessa (Fig. 12 sezione f; Fig.14 sezione g), definito funzionalmente, i FEFsem, in cui è stata osservata la presenza di neuroni la cui attività è correlata all'esecuzione di movimenti oculari a lento inseguimento (FEFsem, Stanton e coll.2005).

Tutte le connessioni osservate nel lobo frontale hanno mostrato un quadro della distribuzione delle cellule e dei terminali marcati, rispettivamente, di tipo bilaminare e di tipo colonnare.

Forti connessioni sono state osservate in numerose aree del lobo temporale, sia nelle regioni del

banco dell'STS che in quelle della convessità (Fig. 12 e 13); nell'STS la marcatura si estendeva dal banco ventrale, dove è stata localizzata nell'area TEO e nella parte di TEa/m densamente connessa con la 45B (Fig. 12 sezioni g-j; Fig. 14 sezioni h-j), fino alle regioni del fondo, in IPa; pressochè assente era la marcatura nel banco dorsale, in corrispondenza dell'area STP. Più caudalmente abbiamo osservato sparsa marcatura anche nelle aree FST ed MT (Fig. 12 sezioni j,k ; Fig. 14 sezioni j, k); ancor più modesta è stata la marcatura osservata in MST. A livello della convessità della corteccia inferotemporale relativamente sparsa marcatura è stata osservata sia in corrispondenza di TEpd che più caudalmente in TEO (Fig. 12 sezioni g-i). In tutti i casi infine un'elevata percentuale di cellule marcate (circa l'11-12% delle cellule totali) sono state osservate in V4, V4t e più limitatamente anche in aree visive extrastriate come V3d, V3v, V3a e V2 (Fig. 12 sezione k; Fig. 14 sezioni l-n).

Tutte le connessioni del lobo temporale e di quello occipitale hanno evidenziato una distribuzione di marcatura tipicamente a “feedback”, in cui le cellule erano distribuite soprattutto negli strati supragranulari; i terminali marcati hanno mostrato due differenti tipi di pattern: in TEO, nelle aree caudali dell'STS e nelle aree visive extrastriate erano distribuiti soprattutto nel I e nel VI strato mentre nelle aree IPa, TEa/m e TE le fibre marcate erano localizzate prevalentemente nel VI strato. Questi pattern di marcatura differiscono notevolmente da quelli osservati a seguito di iniezioni nell'area 45B.

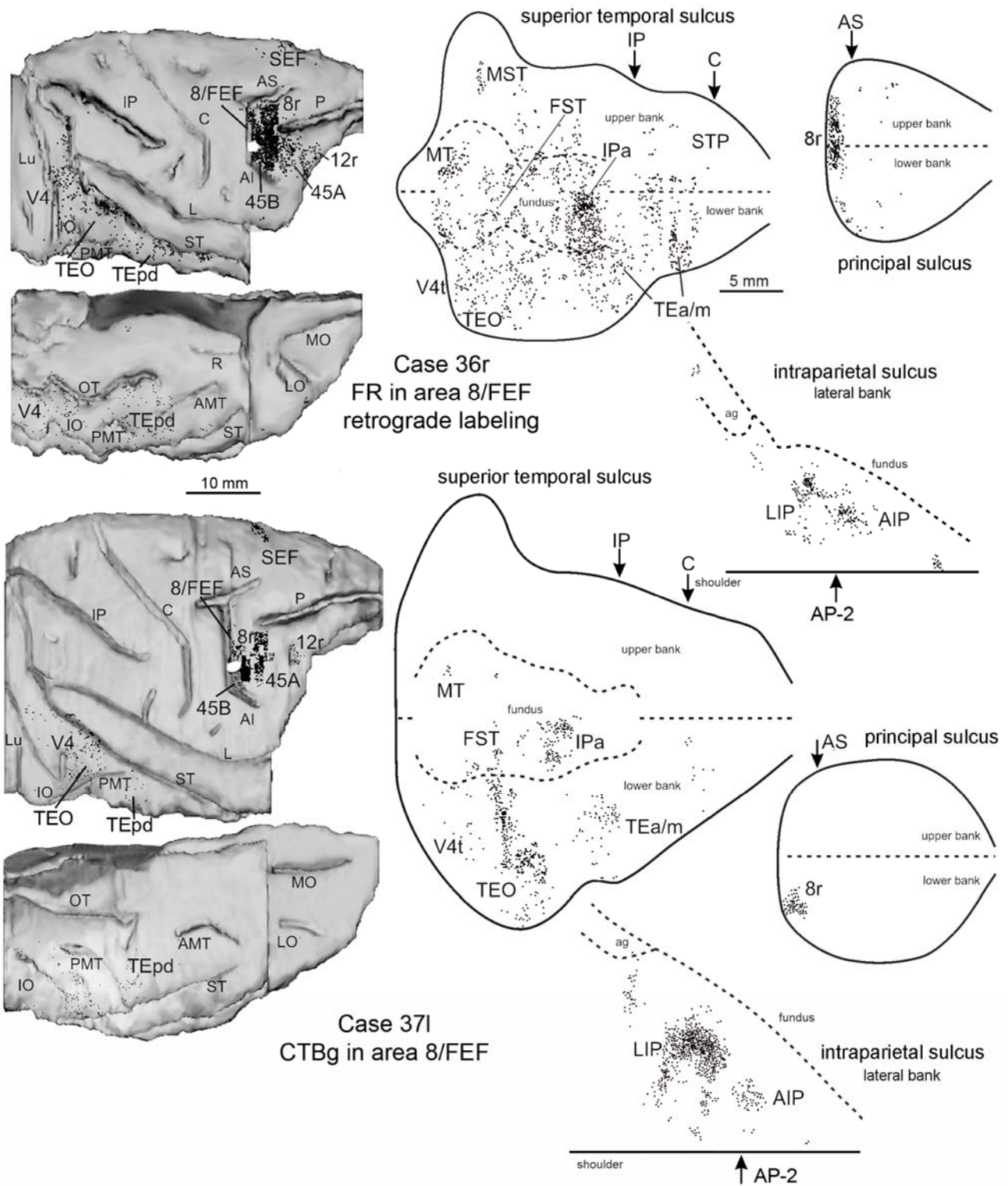
Nella corteccia parietale densa marcatura è stata osservata nelle aree intraparietali LIP (Fig. 12 sezioni j, k; Fig. 14 sezioni j, k) ed AIP (Fig. 11 sezione i; Fig. 12 sezione i). Nell'area LIP la marcatura tendeva a distribuirsi più ventralmente rispetto a quella osservata a seguito di iniezioni nell'area 45B (vedasi la ricostruzione bidimensionale del solco intraparietale della figura 12 in cui sono visualizzate contemporaneamente le proiezioni dell'area 8/FEF e dell'area 45B); la marcatura nell'area LIP sembrerebbe essere localizzata in corrispondenza della porzione ventrale dell'area definita funzionalmente da Blatt e coll. (1990), come LIPv. Sia in AIP che in LIP le cellule marcate erano distribuite prevalentemente negli strati supragranulari mentre i terminali marcati si distribuivano in tutti gli strati tranne il IV ed il V; sia cellule che terminali hanno evidenziato dunque una distribuzione a “feedback” secondo la classificazione di Felleman e Van Essen.

Infine esiguo è stato il numero di proiezioni e di cellule marcate osservato nelle aree cingolate 24a (Fig. 11 sezioneg) e 24c.

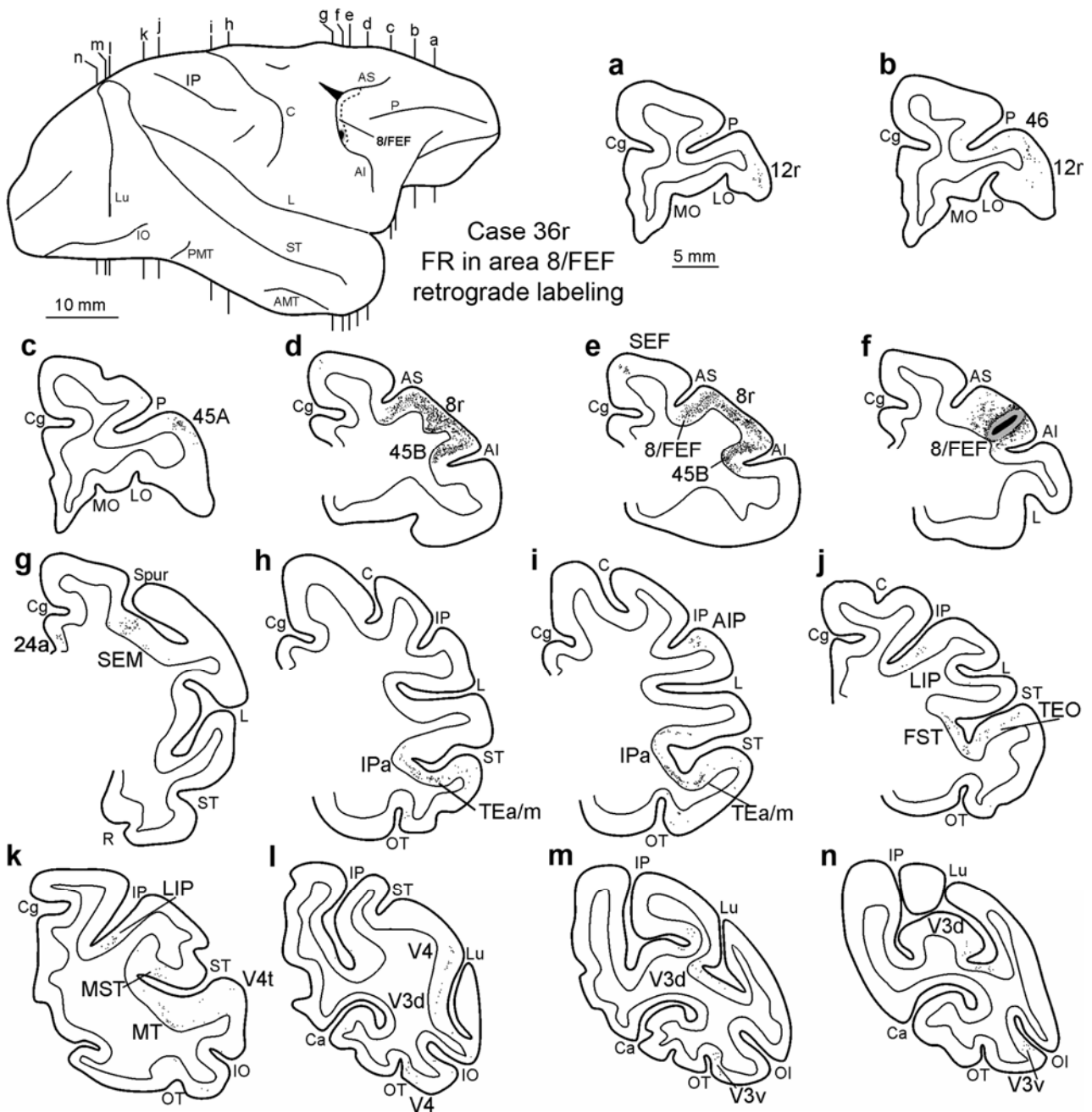
Un pattern di connessioni differente è stato osservato invece nel caso 35r FR (Fig. 15) in cui forti connessioni erano presenti non solo con le aree 8r, 45B e con i SEF ma anche con l'area 45A, con la parte caudale, con quella dorsale e rostrale dell'area 46 ed infine con l'area 8B. Tutte le connessioni frontali di questo caso hanno evidenziato un pattern colonnare per quanto riguarda la distribuzione dei terminali e bilaminato per quanto riguarda la distribuzione delle cellule marcate.

Le connessioni temporali hanno interessato in modo relativamente limitato sia le aree inferotemporali che l'area IPa, mentre forti sono state le connessioni osservate con le aree STP ed MST, con le aree del parabelt acustico caudale (CPB) e con Tpt; ulteriore marcatura è stata riscontrata anche nella parte mediale del belt acustico, MM. Moderate proiezioni sono state invece osservate nelle aree visive extrastriate V2, V3, V4 e V4t, in MT e nella parte dorsale del giro prelunato (area DP, Andersen e coll. 1990). Nella corteccia parietale la marcatura ha interessato ambedue le aree intraparietali AIP ed LIP, in particolare in LIP la marcatura occupava sia la parte dorsale che ventrale dell'area; medialmente ulteriore marcatura è stata osservata nell'area PGm dalla quale si estendeva fino alla corteccia cingolata posteriore, CGp; (Olson e coll. 1996). Nella corteccia cingolata densa marcatura è stata osservata anche nelle aree 24c, 24a e 23a.

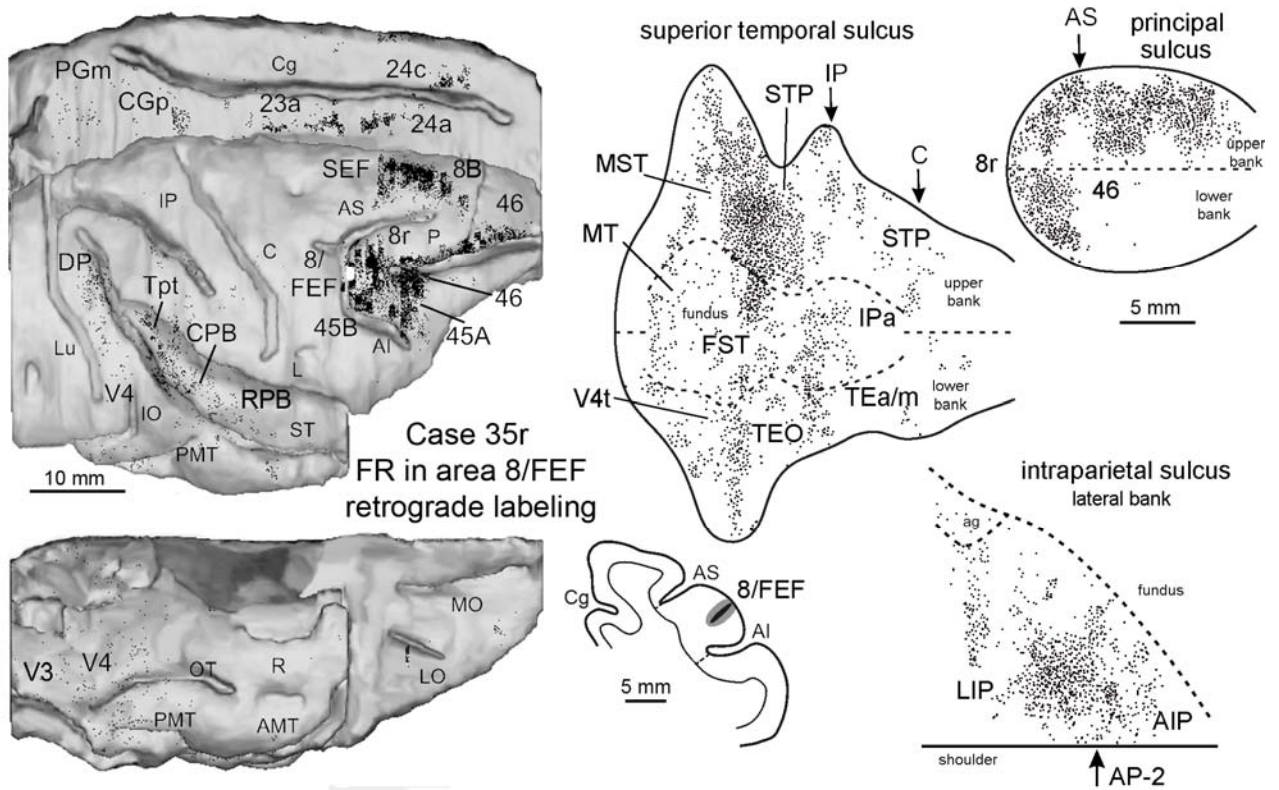
Il confronto della distribuzione della marcatura di questo caso con le connessioni osservate in altri studi in cui sono stati iniettati i FEF (Huerta e coll. 1987; Stanton et coll. 1993; Schall e coll. 1995; Stanton e coll. 1995) suggerisce che l'iniezione di questo caso abbia interessato non solo gli sFEF, dove sono rappresentati movimenti oculari saccadici di ampiezza ridotta, ma anche e soprattutto la porzione dorsale, IFEF, in cui sono rappresentati movimenti oculari saccadici di ampiezza elevata (Bruce et coll. 1985).



**Figura 13.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezioni nella parte ventrale dell'area 8/FEF nei Casi 36r FR e 371 CTBg mostrata in visioni dorsolaterali e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato (a sinistra) e mediante ricostruzioni bidimensionali del PS, del STS e dell'IPS (a destra). Abbreviazioni come nelle Figure 1, 5 e 10.



**Figura 14.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata nel Caso 36r FR, mostrata in disegni di sezioni coronali rappresentative. Le sezioni sono mostrate in ordine rostro-caudale (a-n). Il disegno bidimensionale dell'emisfero iniettato nella parte a destra ed in alto della figura mostra i livelli da cui sono state tratte le sezioni coronali, rappresentate da linee continue, i bordi dell'area 8/FEF, rappresentati da linee tratteggiate, e la localizzazione dei siti di iniezione, visualizzati in nero, per il core, ed in grigio, per l'alone. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



**Figura 15.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezione di FR in una porzione relativamente dorsale dell'area 8/FEF del Caso 35r mostrata in visione dorsolaterale, mediale e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato (a sinistra) e mediante ricostruzioni bidimensionali del PS, del STS e dell'IPS (a destra). Abbreviazioni come nelle Figure 1, 5 e 10.

### *Connessioni dell'area 8r*

La distribuzione della marcatura retrograda osservata nei casi 39r FB e 371 CTBg era abbastanza simile in ambedue i casi ed ha evidenziato che l'area 8r o quantomeno la sua porzione ventrale, ovvero la parte dell'area in cui sono state attuate le iniezioni, presenta un quadro di connessioni chiaramente distinguibile rispetto a quello delle adiacenti aree 8/FEF, 45B e 45A.

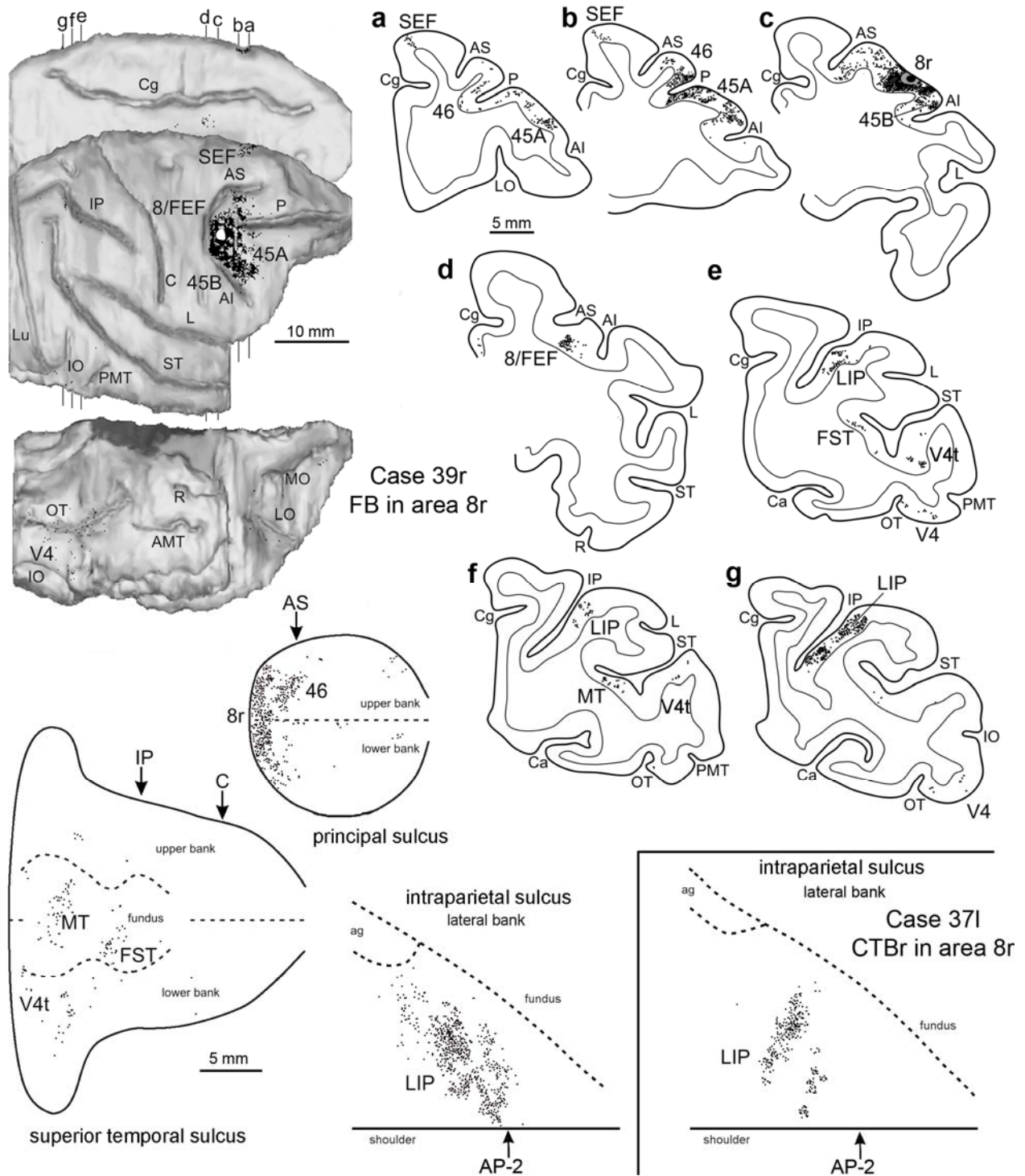
Nella figura 16 viene presentata oltre alla distribuzione della marcatura del caso 39r FB una ricostruzione bidimensionale del solco intraparietale del caso 371 CTBg, ricostruzione che può essere confrontata con quella corrispondente della figura 13 in cui è presentata la distribuzione della marcatura nello stesso solco intraparietale a seguito di iniezione di CTBr nell'area 8/FEF.

La percentuale di cellule marcate di ambedue i casi è presentata in tabella 4.

Nel lobo frontale le connessioni dell'area 8r erano molto simili a quelle dell'adiacente area 8/FEF, con la quale è inoltre fortemente connessa; in particolare cellule marcate erano presenti nelle aree 45B, 45A, nei SEF e nella parte caudale dell'area 46 (Fig. 16 sezioni a-d).

L'unica significativa connessione al di fuori del lobo frontale è stata osservata con l'area LIP, dove peraltro era presente il 5-7% delle cellule marcate, e nella quale la marcatura si distribuiva in modo tale da formare due distinti aggregati: uno localizzato dorsalmente e corrispondente alla parte dell'area che a sua volta è connessa con l'area 45B ed uno localizzato ventralmente e corrispondente alla parte dell'area connessa invece con l'area 8/FEF (Fig. 16 sezioni e-g).

Un numero esiguo di cellule marcate sono state osservate inoltre sia in aree visive relate al movimento come FST ed MT che in aree maggiormente implicate nella processazione di caratteristiche visive di tipo pittorico come V4 e V4t (Fig. 16 sezioni e-g).



**Figure 16.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezione di FB nell'area 8r del Caso 39r mostrata mediante visioni dorsolaterali, mediali e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato (parte superiore), mediante ricostruzioni bidimensionali del PS, del STS e dell'IPS (parte bassa ed a sinistra) ed in disegni di sezioni coronali rappresentative mostrate in ordine rostro-caudale (a-k; a destra). I livelli da cui sono state tratte le sezioni sono mostrate sulle visioni dorsolaterali e mediali delle ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato. Nella parte inferiore destra della figura è mostrata la distribuzione della marcatura retrograda osservata nel banco laterale dell'IPS del Caso 371 CTBr. Abbreviazioni come nelle Figure 1, 5 e 10.

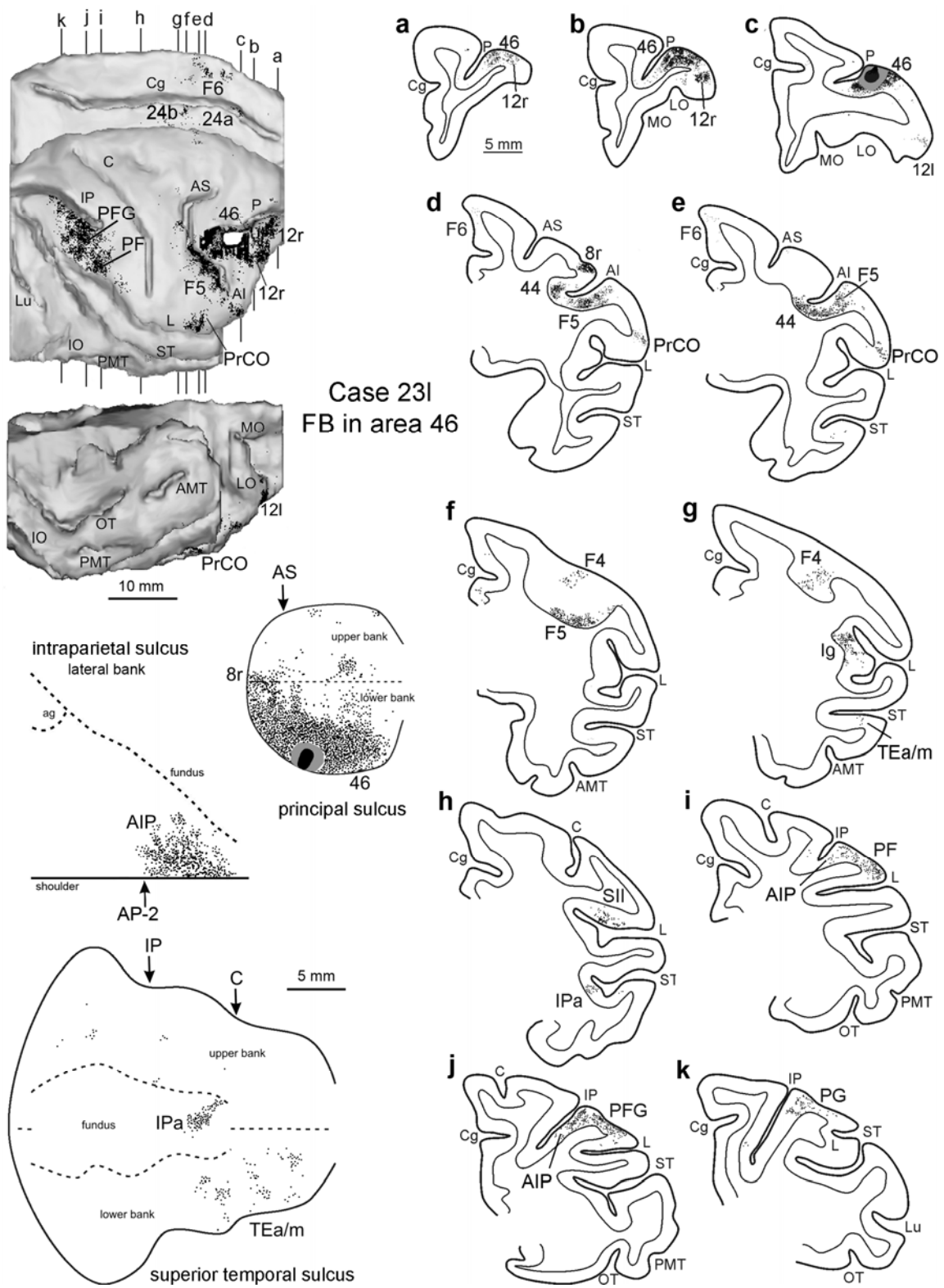
### *Connessioni della parte ventrocaudale dell'area 46*

I risultati delle iniezioni, dei due casi iniettati nella parte ventrocaudale dell'area 46, i casi 231 FB e 261 CTBg, sono congruenti tra loro per cui la descrizione delle proiezioni dell'area 46 sarà basata esclusivamente sul caso considerato maggiormente esemplificativo: il caso 231 FB (Fig. 17). La percentuale di cellule marcate di ambedue i casi è presentata in tabella 4.

Il quadro di connessioni evidenziato a seguito di queste iniezioni era sostanzialmente simile a quello osservato in studi precedenti (Barbas 1988; Petrides e Pandya 2002) e chiaramente distingue l'area 46 da tutte le altre aree della VLPF caudale.

Nella corteccia prefrontale la marcatura era quasi completamente localizzata nella VLPF ed in ambedue i casi si estendeva sia rostralmente che caudalmente rispetto al sito di iniezione, rostralmente decorreva lungo tutta la parte rostro-ventrale dell'area 46 ed attraverso la completa l'estensione dell'area 12r (Fig. 17 sezioni a, b), caudalmente si estendeva nell'area 8r (Fig. 17 sezione d); eccetto per un esiguo numero di cellule osservate nell'area 12l e nella parte dorsale dell'area 45A nessun'altra area della VLPF ha mostrato significative connessioni. Una percentuale molto alta di cellule marcate, circa il 31% del totale, era localizzata nelle cortecce disgranulari ed agranulari del lobo frontale; in particolare il numero maggiore di cellule è stato osservato nella parte rostrale e ventrale dell'area F5 e nell'adiacente area 44 (Fig. 17 sezioni d-g), ulteriore marcatura benchè molto più modesta è stata osservata anche nell'area F6 della premotoria mesiale (pre-SMA; Fig. 17, sezioni d, e). Se nel lobo temporale le cellule marcate erano in numero relativamente limitato e circoscritte alle aree TEa/m ed IPa (Fig. 17 sezioni g, h) la marcatura nel lobo parietale è invece molto ricca e, benchè con alcune differenze tra i due casi che potrebbero riflettere una differente topografia rostro-caudale di queste connessioni parieto-frontali, confinata completamente nella parte rostrale del lobulo parietale inferiore e dell'opercolo parietale. In particolare nel Caso 231 FB, dove l'iniezione è più caudale, le cellule marcate sono state osservate soprattutto nelle aree PF, PFG ed AIP ed in numero inferiore nell'area PG e nelle aree dell'opercolo parietale come SII e PV (Fig. 17 sezioni h-k); differentemente nel Caso 261 CTBg, dove l'iniezione è situata più rostralmente, il numero maggiore di cellule marcate è stato riscontrato nelle regioni di SII e PV, seguite dalle aree PFG ed AIP; la marcatura, in questo caso, diminuiva ulteriormente in PG ed era pressochè assente in PF. Densa marcatura in ambedue i casi è stata invece osservata nella parte agranulare dell'insula (Fig. 17, sezione g).

Questi risultati evidenziano pertanto che l'area 46 pur confinando con l'area 45A se ne distingue marcatamente dal punto di vista odologico e sottolineano inoltre che questa parte ventro-caudale dell'area è un target prefrontale preferenziale delle aree rostrali del lobulo parietale inferiore e dell'opercolo parietale.



**Figure 17.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezione di FB nella parte ventrocaudale dell'area 46 del Caso 231 mostrata in visione dorsolaterale, mediale e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato (parte superiore sinistra), mediante ricostruzioni bidimensionali del PS, del STS e dell'IPS (parte inferiore sinistra) ed in disegni di sezioni coronali rappresentative mostrate in ordine rostrocaudale (a-l; a destra). I livelli da cui sono state tratte le sezioni sono mostrate sulle visioni dorsolaterali e mediali delle ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato. Abbreviazioni come nelle Figure 1, 5 e 10.

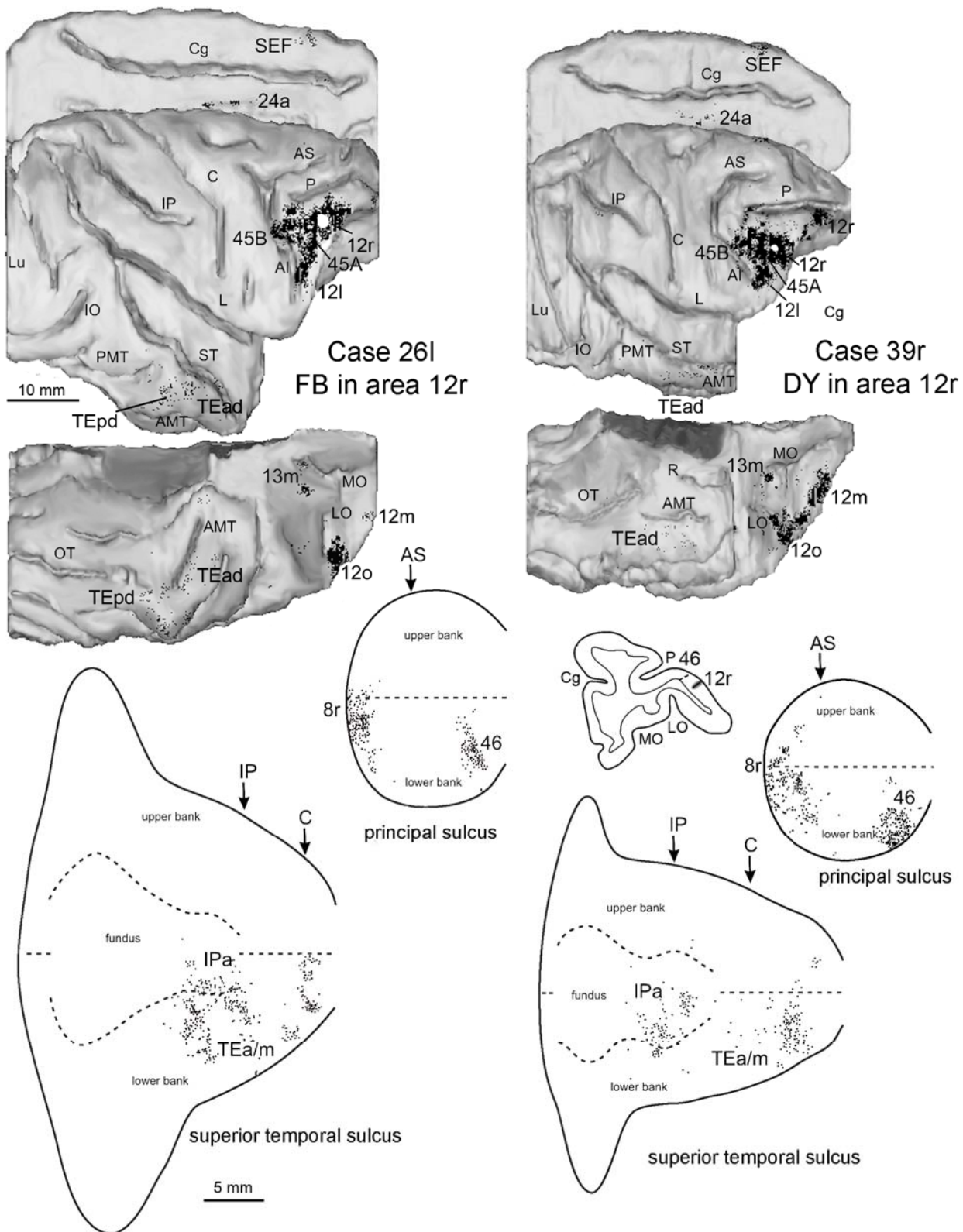
### *Connessioni della parte caudale dell'area 12r*

Le due iniezioni, caso 26l FB e caso 39r DY, attuate nella parte caudale dell'area 12r hanno evidenziato una distribuzione di marcatura molto simile. Queste iniezioni, essendo posizionate esclusivamente nella porzione caudale dell'area 12r, ne descrivono solo parzialmente il quadro delle connessioni ma si sono rivelate estremamente utili per confermarne il bordo architettonico con l'adiacente area 45A anche dal punto di vista odologico.

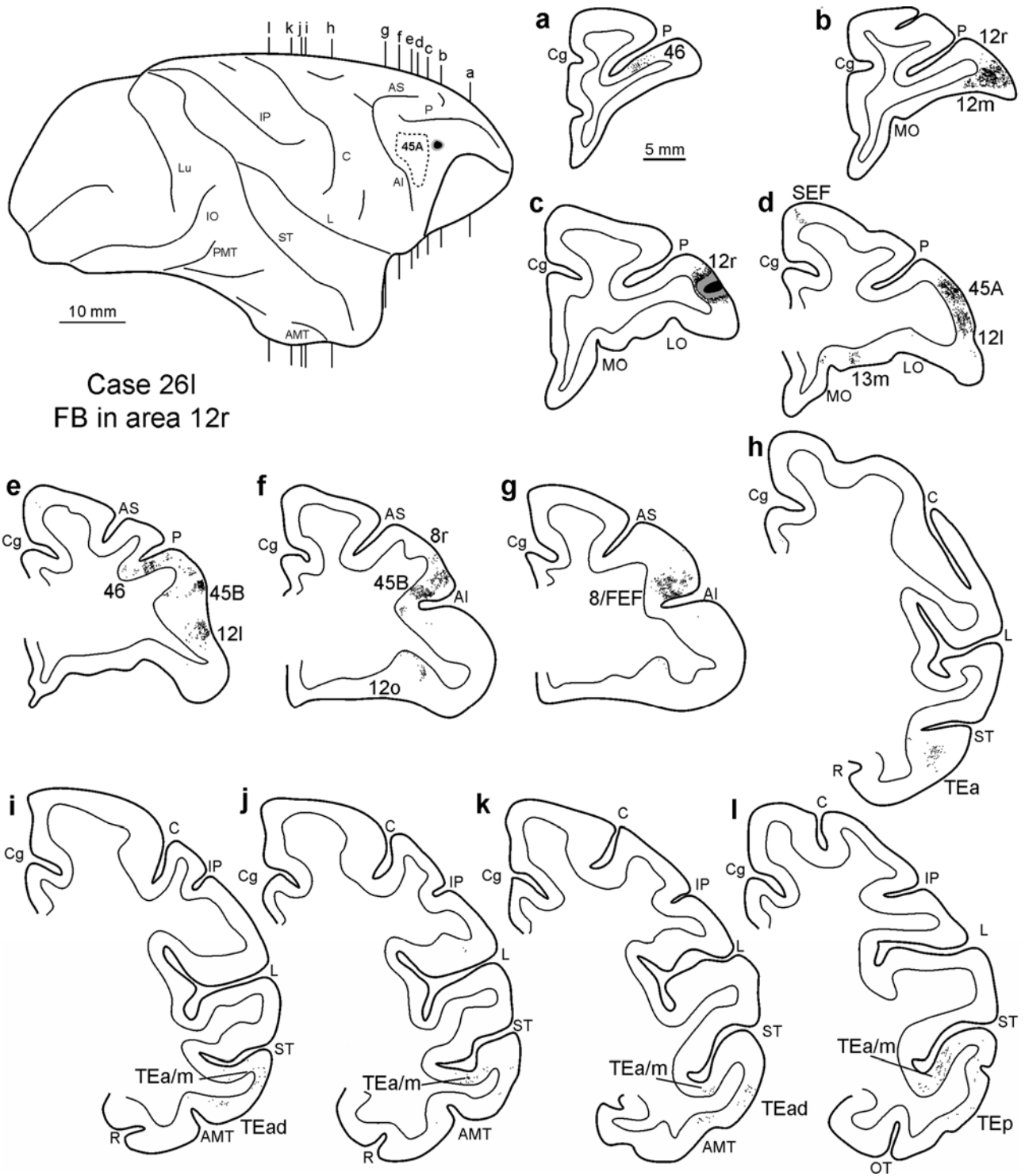
I risultati ottenuti in ambedue i casi iniettati sono mostrati nelle figure 18 e 19 e la percentuale di cellule marcate di ciascun caso è presentata in tabella 4.

Nel lobo frontale (Fig. 18) la marcatura intrinseca decorreva attraverso tutta l'estensione dell'area fino al bordo rostrale con l'area 10; oltre a queste connessioni intrinseche l'area è fortemente connessa con l'area 46 ventrale, soprattutto con la parte più rostrale, con le adiacenti aree 45A e 12l e con l'area 45B (Fig. 19 sezioni a-f). Ulteriori cellule marcate sono state osservate anche più caudalmente nella porzione ventrale dell'area 8/FEF (Fig. 19, sezione g), nell'area 8r (Fig. 19, sezione f) e nei SEF (Fig. 19, section d). Nella corteccia orbitofrontale relativamente ricche connessioni erano presenti con l'area 12m (Fig. 19, sezione b), con l'area 12o (Fig. 19, sezione f) e con l'area 13m (Fig. 19, sezione d).

L'unica regione corticale al di fuori del lobo frontale in cui è stata osservata marcatura è la corteccia inferotemporale, dove le cellule marcate erano localizzate esclusivamente nella parte rostrale ed intermedia dell'area TEa/m, nell'area IPa e nelle aree TEad e TEpd (Fig. 19, sezioni h-l).



**Figure 18.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezioni nell'area 12r nei Casi 26l FB e 39r DY mostrata in visioni dorsolaterali e dal basso di ricostruzioni 3D dell'emisfero iniettato (parte superiore) e mediante ricostruzioni bidimensionali del PS e del STS (parte inferiore) Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.



Case 26l  
FB in area 12r

**Figure 19.** Distribuzione della marcatura retrograda osservata a seguito di iniezione nell'area 12r nel Caso 26l FB in disegni di sezioni coronali rappresentative mostrate in ordine rostro-caudale (a-l). Il disegno bidimensionale dell'emisfero iniettato nella parte in alto ed a destra della figura mostra i livelli da cui sono state tratte le sezioni coronali, rappresentati da linee continue, i bordi dell'area 12r, rappresentati da linee tratteggiate, e la localizzazione dei siti di iniezione, visualizzati in nero, per il core, ed in grigio, per l'alone. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.

**Tabella 4.** Distribuzione percentuale (%) e numero totale (n) di neuroni marcati osservati a seguito di iniezioni rappresentative nelle aree 45A, 45B, 8/FEF ventrale, 8r, 46 ventro-caudale e 12r caudale.

Area iniettata Caso	45A		45B			8/FEF		8r		46		12	
	C36l CTBg	C37l FB	C26l DY	C36l FB	C30r FB	C36r FR	C37l CTBg	C37l CTBr	C39r FB	C23l FB	C26l CTBg	C26l FB	C39r DY
<b>VLPF &amp; DLPF</b>													
45A	X	X	18.4	16	21.5	2	2.7	2.1	5.3	1.9	1.5	35.9	39.2
45B	4.1	4.9	X	X	X	13.5	9.9	5.4	8.1	2	2	12.9	6.9
12l	12.3	12	11.6	8	11.9	*	*	*	*	1	1.9	16	10.1
12r caudal	5	3.1	12.2	6.3	8.6	1.6	*	-	-	14	6.2	X	X
12r rostral	-	*	5.3	3	3.5	-	-	-	-	5	3.6	2.5	8.5
46 ventral	-	*	6.4	10	2.4	2.6	2	13.8	6.8	X	X	7.5	6.5
46 dorsal	6.3	11.7	3	4.2	3	*	-	4.8	7.1	2.3	*	*	1.1
10	5.9	7.9	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*
9/8B	9.3	7.2	1.9	3.5	1.9	-	-	*	-	-	-	-	-
<b>Orbitofrontale</b>													
12o	14.1	9	*	1.5	*	-	-	-	-	*	*	1.1	7.5
13m	-	-	1.7	2	1	-	-	-	-	-	-	1.7	1.3
12m	-	-	1	1.2	*	-	-	*	-	-	-	4.4	5.2
11	-	-	*	*	-	-	-	*	-	*	-	-	*
<b>Prearcuata</b>													
8/FEF	7.4	8.1	18.1	16.1	25.1	X	X	62.2	60.3	*	*	6.7	2.5
8r	*	1.2	9	6	9.8	30.1	27.3	X	X	12.6	7.8	1.7	2.6
<b>Premotoria</b>													
SEF	1.1	1.3	1	1.5	*	1.8	4.3	1.4	1	-	-	*	*
44, F5	2.5	5.1	1	1.5	1.2	1.1	*	*	-	32.1	32	*	*
<b>Parietale</b>													
LIP	-	-	1.5	1.5	2	9	19.1	5	7.6	2.5	*	-	-
Opt	-	-	*	1.5	*	-	-	-	-	-	-	-	-
AIP, PG, PFG, PF	*	*	-	-	-	1	2.7	-	-	13	24.5	-	-
Opercular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.1	15.5	-	-
<b>Temporale</b>													
Auditory belt/parabelt	14.3	8.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*
STP	13	12	-	*	-	2.9	*	*	*	*	-	-	*
IPa, TEa/m, TE, TEO	*	3.1	4.4	8.4	7.3	18.2	13.3	*	*	1.2	*	7.2	4
MT, FST, MST	-	*	-	*	*	4.1	3.7	1.4	1.1	-	-	-	-
V2-V4	-	-	-	-	-	10.8	12.1	1.6	1	-	-	-	-
Insula	*	1.5	*	*	*	-	-	-	-	3.1	1	*	*
Cingolata	2.1	1.2	2	3.8	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Altre	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3.3	3	*	*
<b>Neuroni totali</b>	<b>3983</b>	<b>15386</b>	<b>16483</b>	<b>27581</b>	<b>23951</b>	<b>5332</b>	<b>3631</b>	<b>8092</b>	<b>11929</b>	<b>22874</b>	<b>6492</b>	<b>9705</b>	<b>14306</b>

X = area iniettata; \* = marcatura < 1%; - = nessuna marcatura

# 4. DISCUSSIONE

## 4.1 Organizzazione architettonica della VLPF caudale

Nella parte iniziale del nostro studio abbiamo fornito una descrizione dettagliata dell'organizzazione architettonica della porzione caudale della VLPF; in particolare, utilizzando un approccio combinato, basato su criteri cito-, mielo- e chemo-architettonici abbiamo identificato sei differenti aree completamente o parzialmente confinate all'interno di questo settore corticale. Due di queste, l'area 8/FEF e l'area 45B, decorrono lungo il banco anteriore del solco arcuato; altre due, l'area 8r e l'area 45A, sono localizzate nell'adiacente convessità, infine le ultime due, l'area 12 e l'area 46, confinano la prima dorsalmente e caudalmente e la seconda ventralmente, con l'area 45A.

Una nuova parcellazione anatomica della VLPF caudale si è resa indispensabile, prima di attuare uno studio odologico di questo settore corticale, alla luce delle notevoli divergenze osservabili confrontando tra loro le precedenti parcellazioni architettoniche della corteccia prefrontale.

Nella prima parcellazione anatomica della corteccia cerebrale del macaco, Brodmann (1909), considerò l'intera estensione della corteccia prearcuata come una singola area architettonica, denominata area 8; in una successiva parcellazione Walker (1940) suddivise il settore della corteccia prearcuata in una parte dorsale, denominata ancora area 8, ed in una ventrale, denominata, in virtù di una localizzazione anatomica simile a quella della corrispondente area dell'uomo, area 45. Benchè utilizzando differenti nomenclature numerosi altri autori, quali von Bonin e Bailey (1947), Barbas e Pandya (1989) e Preuss e Goldman-Rakic (1991), hanno successivamente proposto parcellazioni architettoniche sostanzialmente in accordo con la suddivisione dorso-ventrale della corteccia prearcuata proposta da Walker (1940).

La scoperta di una distinta regione funzionale, i FEF (Bruce e Goldberg, 1984; Bruce e coll., 1985), la cui localizzazione anatomica si estende in gran parte dell'area 8 di Walker ma anche nella parte dorsale dell'area 45 ha però messo in discussione la validità di queste parcellazioni anatomiche; in successivi studi Stanton e coll. (1989) hanno inoltre dimostrato che il settore corticale funzionalmente definito come FEF, ovvero la parte del banco anteriore del solco arcuato in corrispondenza della quale è possibile evocare con stimoli elettrici a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico, presenta anche una controparte architettonica caratterizzata dalla presenza di grosse cellule piramidali nel V strato.

Questi studi dimostrarono quindi che l'area 45 di Walker corrisponde ad un settore architettonicamente e funzionalmente non omogeneo.

Alla luce della discrepanza tra le precedenti parcellazioni anatomiche e le proprietà anatomo-

funzionali di questo settore corticale, Petrides e Pandya (1994; 1999; 2002) in una serie di successivi studi architetturici hanno proposto una nuova suddivisione della VLPF in cui, coerentemente con gli studi di Stanton e coll., la localizzazione anatomica dell'area 8 viene estesa più ventralmente in modo tale da farne coincidere il bordo architetturico, rappresentato dal punto del banco dell'arcuato in corrispondenza del quale scompaiono le grosse cellule piramidali nel V strato, con il bordo dei FEF; questo settore corticale, ulteriormente suddiviso in una parte dorsale, l'area 8ad, ed in una ventrale, l'area 8av, venne esteso rostralmente, differentemente dai FEF, fino alla punta posteriore del PS.

Ventralmente all'area 8, Petrides e Pandya (1994; 2002) hanno definito un ulteriore settore, architetturicamente caratterizzato dalla presenza di grosse cellule piramidali nelle profondità del III strato, denominato, in analogia con Walker, area 45; l'area 45 definita da questi autori si estende non solo lungo la porzione del banco anteriore dell'IAS situata ventralmente ai FEF, ovvero nella parte del banco anteriore del solco arcuato in corrispondenza della quale non è possibile indurre mediante stimolazione elettrica a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico, ma anche in corrispondenza dell'adiacente convessità; benchè suddivisa in due settori, uno situato in corrispondenza della convessità e denominato 45A ed uno confinato all'interno del banco e denominato 45B, l'area 45 di Petrides e Pandya venne considerata dai due autori fondamentalmente omogenea. Quest'area corrisponde solo in parte all'area 45 di Walker: in primo luogo in quanto la porzione dell'area che decorre lungo il banco anteriore del solco arcuato, la porzione denominata 45B, presenta infatti un'estensione dorsale minore rispetto all'area 45 di Walker, che invade anche la parte ventrale dei FEF; in secondo luogo in quanto la parte dell'area denominata 45A si estende anche nell'adiacente convessità; settore della convessità che nelle altre parcellazioni anatomiche della VLPF è stato oggetto di controversa attribuzione ed assegnato da Walker alle aree 46 e 12, da Preuss e Goldman-Rakic all'area 12 e da Barbas e Pandya all'area 8 ventrale ed all'area 46.

I nostri dati architetturici estendono le osservazioni di Petrides e Pandya (1994; 2002); coerentemente con questi autori anche noi abbiamo delimitato un settore in corrispondenza della convessità prefrontale, l'area 45, distinto rispetto alle aree 8, 46 e 12 ma abbiamo anche definito una serie di criteri cito-, mielo- e chemoarchitetturici mediante i quali distinguere morfologicamente le due suddivisioni dell'area 45 che sono dunque state definite come due aree architetturicamente distinte. Ad esempio dal punto di vista citoarchitetturico abbiamo evidenziato come, sebbene le cellule piramidali in corrispondenza delle porzioni profonde del III strato siano presenti sia nell'area 45A che nell'area 45B, come già descritto da Petrides e Pandya (2002), nell'area 45B queste cellule presentino dimensioni maggiori, dimensioni quantomeno paragonabili a quelle delle cellule piramidali del V strato dell'area 8/FEF con le quali costituiscono la popolazione di cellule piramidali di dimensione maggiore di tutta la corteccia prefrontale; nell'area 45A, inoltre, benchè le

cellule piramidali del III strato siano di dimensione inferiore rispetto alle corrispondenti dell'area 45B, si dimostrano essere in numero maggiore; l'area 45A, inoltre, è ulteriormente distinguibile dall'area 45B anche per la presenza di un evidente e caratteristico gradiente delle dimensioni e della densità cellulare in corrispondenza del III strato. Gli studi mieloarchitettonici e chemoarchitettonici ci hanno permesso di confermare i bordi citoarchitettonici tra le due aree e di definire ulteriori criteri per la loro identificazione. In primo luogo, sebbene le due aree presentino un grado di mielinizzazione relativamente simile, l'area 45B è caratterizzata dalla presenza di una singola banda di Baillarger differentemente dall'area 45A in cui sono chiaramente riconoscibili due bande distinte. In secondo luogo in ambedue gli studi chemoarchitettonici abbiamo evidenziato tra le due aree differenze sia di tipo qualitativo che quantitativo; in particolare, la densità delle cellule immunopositive all'SMI-32 nel III strato dell'area 45A si è dimostrata superiore rispetto a quella osservata nel corrispondente strato dell'area 45B; inoltre la densità complessiva delle cellule immunopositive alla calbindina nell'area 45A si è dimostrata significativamente maggiore rispetto a quella osservata nell'area 45B.

Rispetto alla parcellazione di Petrides e Pandya l'approccio multiarchitettonico da noi utilizzato ci ha permesso inoltre di delimitare due distinte aree architettoniche in corrispondenza del settore definito da questi autori come area 8: una di queste aree, l'area 8/FEF, presenta un'estensione del tutto sovrapponibile a quella dei FEF, in quanto ne coincide con la controparte architettonica, l'altra, l'area 8r, è invece localizzata nell'adiacente convessità e si estende fino alla punta posteriore del PS, in un settore che recenti studi hanno dimostrato essere implicato nella modulazione di movimenti oculari di vergenza e di accomodazione (Gamlin e Yoon, 2000).

Le graduali differenze, in senso rostro-caudale, della densità delle cellule immunopositive alla calbindina non ci hanno consentito di evidenziare chiari bordi architettonici tra tutte le aree studiate ma nel contempo ci hanno permesso di delimitare due distinte macroregioni, ciascuna delle quali costituita da aree aventi simile densità di questa sottopopolazione cellulare; una di queste macroregioni è localizzata rostralmente ed è costituita dall'area 45A e dall'area 46 l'altra è localizzata caudalmente ed è costituita dall'area 8/FEF, dall'area 8r e dall'area 45B; le tre aree costituenti questa macroregione caudale della VLPF presentano, oltre a queste caratteristiche morfologiche simili, anche analogie anatomico-funzionali; in particolare in un recente studio basato sull'utilizzo del desossiglucosio e su iniezioni di traccianti transinaptici (Moschovakis e coll. 2004), tutte e tre le aree si sono infatti dimostrate: a) attivate durante l'esecuzione di movimenti oculari saccadici; b) target di proiezioni oligosinaptiche provenienti dal muscolo laterale dell'occhio. Questi dati anatomico-funzionali, i nostri dati morfologici e gli studi fisiologici condotti sui FEF e sul settore della convessità corrispondente all'area 8r suggeriscono l'esistenza di un unico dominio oculomotorio coincidente con questa macroregione caudale della VLPF e costituito dall'area 8/FEF,

dall'area 8r e dall'area 45B. Coerentemente con questa ipotesi funzionale le aree 8r ed 8/FEF presentano anche una simile numerosità delle cellule piramidali del V strato immunopositive all'SMI-32, cellule piramidali che alla luce di questa ipotesi potrebbero pertanto rappresentare il substrato neurale alla base delle proiezioni ai centri sottocorticali implicati nella diretta modulazione dei movimenti oculari

Benchè sia difficile definire specificatamente come una maggiore o minore densità delle cellule immunopositive alla calbidina o all'SMI-32 possa essere correlata a differenze di carattere funzionale, è comunque ipotizzabile che le diverse densità di ognuna di queste sottopopolazioni cellulari sottenda l'esistenza di circuiterie corticali strutturalmente differenti; in particolare, sebbene ipotesi ancora da verificare, l'incremento della densità delle cellule immunopositive alla calbindina secondo un gradiente rostro-caudale lungo la VLPF potrebbe rappresentare il substrato morfologico alla base di alcune delle differenze funzionali rostro-caudali evidenziabili nel lobo frontale del macaco. In questo senso interessante è notare che anche recenti studi funzionali sull'uomo hanno portato taluni autori (Koechlin e coll. 2003) ad ipotizzare l'esistenza di un gradiente funzionale rostro-caudale lungo la corteccia prefrontale, gradiente secondo il quale esisterebbe una gerarchia di controllo cognitivo che va dal livello più generale ed aspecifico della corteccia premotoria ai livelli più specializzati della VLPF caudale e rostrale.

Le ultime due aree da noi definite architetticamente sono l'area 46 e l'area 12, aree che confinano rispettivamente la prima ventralmente e la seconda dorsalmente e caudalmente con l'area 45A.

L'area 46 è situata all'interno del PS e nella convessità circostante; il nostro interesse si è focalizzato esclusivamente in corrispondenza della porzione dell'area situata nel banco ventrale del PS e nell'adiacente convessità, ovvero la parte dell'area che confina con l'area 45A e che si estende fino al fondo del PS; questo settore si è dimostrato omogeneo e distinto architetticamente rispetto alle altre aree della VLPF da noi studiate, ma sembra presentare a sua volta caratteristiche architettiche differenti rispetto alle porzioni dell'area situate nel banco dorsale e nelle parti più rostrali del PS; la porzione dell'area 46 da noi delimitata architetticamente sembra essere interamente compresa all'interno di un settore funzionalmente implicato nella processazione di informazione di tipo visuo-spaziale.

Il settore dell'area 12 che confina ventralmente con l'area 45A presenta caratteristiche architettiche ed una localizzazione anatomica del tutto compatibile con l'area 12l definita da Carmichael e Price; questo settore dell'area 12 si estende caudalmente fino alla punta del solco arcuato, ventralmente fino alla riflessione orbitale e rostralmente presenta un'estensione analoga all'area 45A. Il settore dell'area 12 che confina rostralmente con l'area 45A sembrerebbe corrispondere all'area 12r di Carmichael e Price, settore caratterizzato e distinguibile dall'area 45A per la presenza di un III strato omogeneamente popolato di cellule piramidali di piccole dimensioni.

## 4.2 Connessioni corticali delle aree 45A e 45B

Un importante punto del nostro studio è stato valutare la plausibilità, dal punto di vista odologico, del bordo, definito architettonicamente, tra le aree 45A e 45B.

Sebbene fortemente e reciprocamente connesse l'una con l'altra, le aree 45A e 45B presentano un quadro di connessioni sia a livello frontale che a livello temporale e parietale notevolmente distinti e segregati tra loro.

Come riassunto nella figura 20, le principali proiezioni prefrontali dell'area 45A sono osservabili in corrispondenza dell'adiacente area 12l, nella parte caudale dell'area 12r, nell'area 10, nella parte dorso-rostrale dell'area 46 e dorsalmente nelle aree 9 ed 8B; le connessioni orbitofrontali sono quantitativamente elevate ma completamente circoscritte nell'area 12o. Nel lobo frontale densa marcatura è stata osservata anche nella parte dorsale dell'area 8/FEF (corrispondente alla porzione dei FEF in cui sono rappresentati movimenti oculari saccadici di ampiezza elevata, IFEF, Bruce e Goldberg 1985) ed in un settore situato in corrispondenza del fondo dell'arcuato e recentemente definito come area 44 (Petrides e Pandya 2002; Belmalih e coll. 2008); più limitate sono invece le connessioni con i SEF e con l'area 8r.

Analogamente all'area 45A anche l'area 45B presenta forti connessioni con l'area 12l e con la parte caudale dell'area 12r; l'area 45B si distingue qualitativamente, a livello della corteccia prefrontale, dall'area 45A per: a) selettive connessioni con le porzioni ventro-rostrali e caudali dell'area 46 e con la parte rostrale dell'area 12r; b) completa assenza di connessioni con l'area 10 e con la parte dorso-rostrale dell'area 46 c) distribuzione della marcatura nella DLPF che non si estende nell'area 9 ma rimane pressochè completamente confinata in corrispondenza dell'area 8B. La marcatura nell'area 8/FEF a seguito di iniezioni nell'area 45B si distingue notevolmente rispetto a quella osservata a seguito di iniezioni in 45A sia quantitativamente, in quanto molto più ricca, sia qualitativamente, in virtù della tendenza a distribuirsi prevalentemente nella parte ventrale dell'area (parte corrispondente alla porzione dei FEF in cui sono rappresentati movimenti oculari saccadici di ampiezza ridotta, sFEF, Bruce e Goldberg 1985). A livello della corteccia orbitofrontale la marcatura, rispetto a quella osservata a seguito di iniezioni nell'area 45A, è quantitativamente meno ricca ma più estesa e comprende oltre all'area 12o anche le aree 12m, 13m e benchè con maggiore variabilità l'area 11. Differentemente dall'area 45A, l'area 45B presenta inoltre forti connessioni con l'area 8r mentre simili, rispetto a quelle della 45A, sia per localizzazione anatomica che per densità di marcatura sono le connessioni con i SEF; infine relativamente modeste sono le connessioni con l'adiacente area 44, fortemente connessa invece con l'area 45A.

A livello del lobo temporale l'area 45A si differenzia dalla 45B per selettive connessioni con le

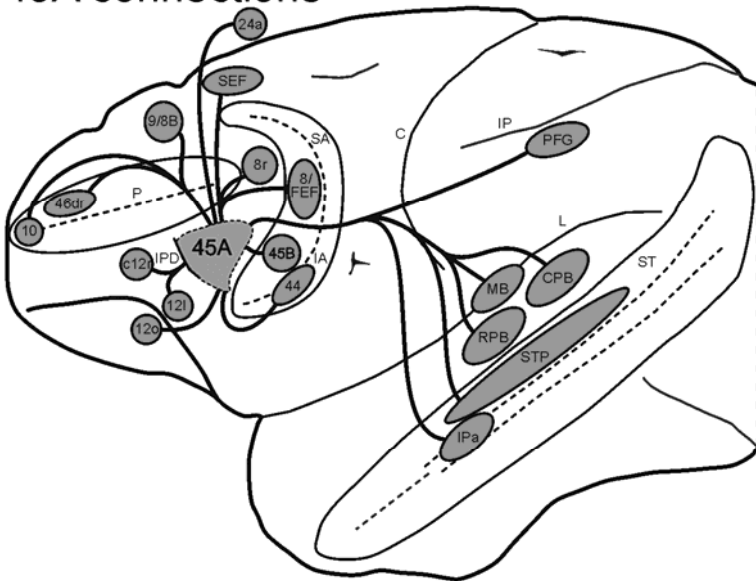
porzioni del banco dorsale dell'STS corrispondenti all'area fisiologicamente definita come STP e per specifiche proiezioni verso le aree uditive complesse dell'STG. Sebbene ambedue le aree 45A e 45B presentino connessioni in corrispondenza dell'area IPa, di TEa/m e delle aree della convessità inferotemporale, quantitativamente la marcatura in queste regioni è molto maggiore a seguito di iniezioni nell'area 45B rispetto a quella osservata a seguito di iniezioni nella 45A; inoltre, le proiezioni delle due aree, tranne nel caso di IPa dove convergono, coinvolgono porzioni di questi settori temporali largamente segregati e distinti.

Nel lobo parietale le connessioni di ambedue le aree, 45A e 45B, sono relativamente limitate e largamente segregate: l'area 45B è infatti esclusivamente connessa con la parte dorsale dell'area LIP e con l'adiacente area Opt mentre l'area 45A presenta solo limitate connessioni con l'area PFG.

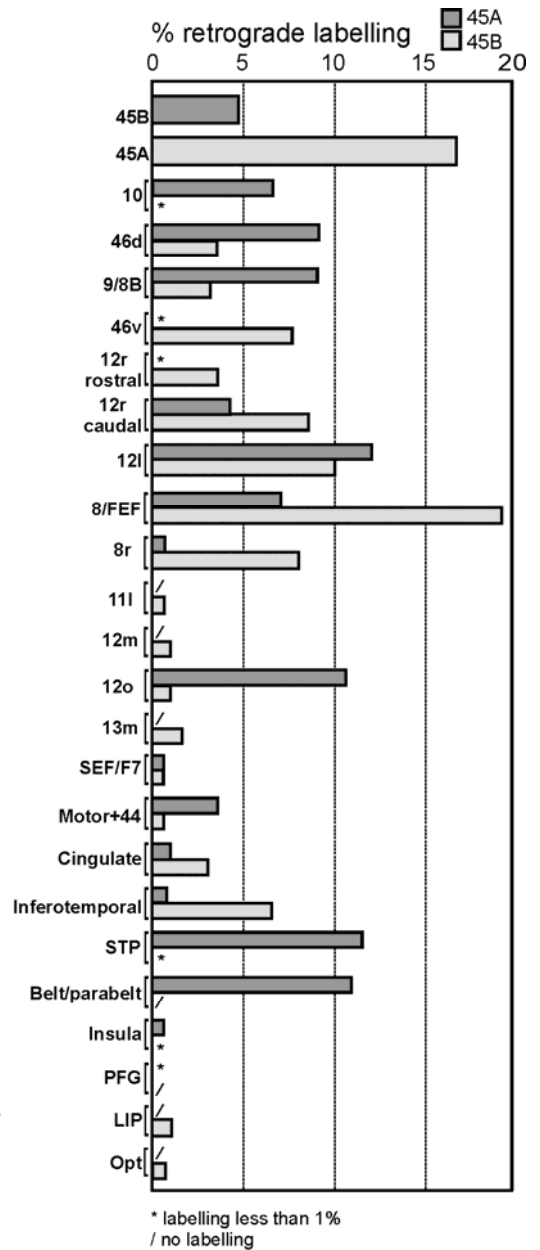
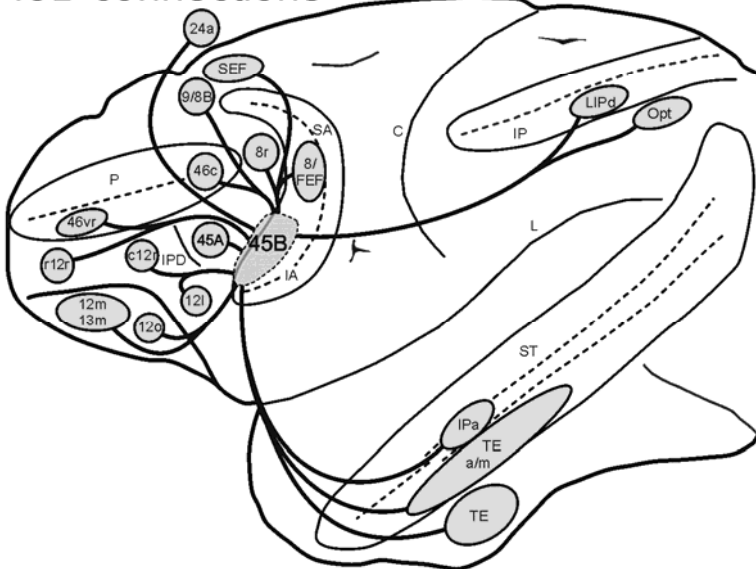
Nei precedenti studi di connettività dell'area 45 di Petrides e Pandya (2002) le iniezioni di traccianti coprivano l'intera estensione dell'area e non hanno permesso di discriminare le connessioni del settore della convessità, corrispondente all'area 45A, rispetto a quelle della regione del banco, corrispondente all'area 45B.

Le nostre iniezioni nelle due suddivisioni dell'area 45, sebbene se prese in considerazione nella loro globalità mostrano connessioni completamente compatibili con la marcatura osservata negli studi di Petrides e Pandya, estendono le osservazioni di questi autori e ci hanno permesso, in virtù di una più circoscritta localizzazione dei siti di iniezione, di discriminare le altamente segregate proiezioni delle due aree.

### 45A connections



### 45B connections



**Figure 20.** Visione riassuntiva delle connessioni corticali ipsilaterali delle aree 45A e 45B (parte sinistra) e valori medi percentuali della marcatura retrograda (parte destra) osservata nei casi di iniezioni nelle aree 45A e 45B mostrati in tabella 4. Abbreviazioni come nelle Figure 1 e 5.

Oltre all'analisi qualitativa dei pattern di connessione delle due suddivisioni dell'area 45 nel nostro studio abbiamo anche analizzato la distribuzione laminare della marcatura, allo scopo di ottenere uno strumento supplementare che ci permettesse di differenziare ulteriormente le due aree sia l'una rispetto all'altra che rispetto alle adiacenti aree della VLPF caudale.

#### **4.3 Distribuzione laminare della marcatura nelle aree 45A e 45B**

Nei sistemi sensoriali, le differenze nella distribuzione laminare dei terminali marcati sono state utilizzate come strumento per definire l'ordine gerarchico che intercorre tra aree reciprocamente interconnesse tra loro e, conseguentemente, determinare la direzione lungo la quale decorre il flusso delle informazioni (vedasi Rockland e Pandya, 1979; Maunsell e Van Essen, 1983; Friedman e coll., 1986; Felleman e Van Essen, 1991). Secondo il modello proposto da Felleman e van Essen (1991) è possibile distinguere principalmente tre differenti tipi di pattern di distribuzione laminare della marcatura: connessioni a *feedforward* che si osservano quando aree gerarchicamente inferiori proiettano ad aree gerarchicamente superiori, connessioni a *feedback* che si osservano quando aree gerarchicamente superiori proiettano ad aree gerarchicamente inferiori e connessioni *lateral*i che si osservano tra aree aventi lo stesso livello gerarchico.

Parte dei risultati ottenuti nel nostro studio, in particolare talune connessioni delle aree 45A e 45B, non sono facilmente ascrivibili all'interno di questo modello ma sono in linea con studi di altri autori, come Webster e coll. (1994), che evidenziarono già la stessa difficoltà ad interpretare la distribuzione laminare delle proiezioni prefrontali osservate a seguito di iniezioni nelle aree inferotemporali TE e TEO con il modello di Felleman e van Essen (1991). Alcune distribuzioni laminari osservate nel nostro studio sono invece coerenti con un altro modello, proposto dalla Barbas e collaboratori (Barbas 1986; Barbas e Rempel-Clower, 1997; Barbas 2002; Medalla e Barbas, 2006), secondo il quale le connessioni provenienti da aree frontali differiscono tra loro soprattutto quantitativamente più che qualitativamente; modello secondo il quale le differenze nella distribuzione laminare sono prevedibili e dipendono dai diversi gradi di densità cellulare e di differenziazione laminare tra le aree connesse; nel nostro caso specifico, ad esempio a seguito di iniezioni nell'area 45A e 45B, la distribuzione laminare delle cellule e dei terminali marcati nelle aree orbitofrontali è localizzata prevalentemente negli strati profondi come previsto per connessioni da un settore più differenziato (quello prefrontale ventrolaterale) ad uno meno differenziato (quello orbitofrontale). Anche le connessioni con le aree temporali, ad esempio quelle dell'area 45A con l'area IPa, che sono localizzate soprattutto nel III-VI strato, e quelle dell'area 45B con l'area TEa/m, localizzate principalmente nella parte profonda del III strato e nel IV, rappresentano il caso che si osserva quando si hanno connessioni tra aree aventi caratteristiche strutturali simili, caso nel quale

specificatamente sia i terminali che le cellule marcate si distribuiscono soprattutto negli strati intermedi (Rempel-Clower e Barbas 2000).

Benchè in ciascun caso specifico sia difficile definire quale ruolo funzionale sia sotteso da una differente distribuzione laminare della marcatura, le differenze dei pattern osservati, soprattutto nelle aree in cui convergono proiezioni provenienti da diversi settori corticali, suggeriscono l'esistenza di modalità differenti con le quali aree diverse possono modulare una stessa area in funzione della differente tipologia della distribuzione laminare delle connessioni (Barbas, 2002). In particolare benchè sia l'area 45A che l'area 45B presentino proiezioni convergenti nella stessa area inferotemporale IPa la distribuzione laminare della marcatura osservata è di tipo differente, lasciando pertanto presupporre l'esistenza di due distinti ruoli funzionali nella modulazione di questo settore temporale da parte di queste due aree prefrontali.

#### **4.4 Connessioni delle aree adiacenti alle aree 45B e 45A**

Un ulteriore importante punto del nostro studio è stato valutare se i pattern di connessioni da noi osservati ci permettano di distinguere le aree 45B e 45A dalle adiacenti aree della VLPF; in particolare l'area 45B rispetto alle adiacenti aree 8/FEF ed 8r e l'area 45A rispetto alle adiacenti aree 46 e 12r.

##### *Connessioni dell'area 8/FEF*

I dati ottenuti a seguito di iniezioni nella parte ventrale dell'area 8/FEF sono coerenti con precedenti studi di connettività della controparte fisiologica di questo settore, la porzione ventrale dei FEF, sFEF (Huerta e coll. 1987; Stanton e coll. 1993; Schall e coll. 1995; Stanton e coll. 1995), hanno evidenziato un quadro di connessioni marcatamente distinto rispetto a quello osservato a seguito di iniezioni in corrispondenza dell'adiacente area 45B: in primo luogo l'area 8/FEF presenta proiezioni prefrontali limitate pressochè esclusivamente alle adiacenti aree della VLPF caudale ed è completamente priva di connessioni con la corteccia orbitofrontale; in secondo luogo presenta forti ed estese connessioni con regioni temporali, come FST, MST e TEO, situate più caudalmente rispetto ai settori della corteccia temporale connessi con la 45B, ed è inoltre fortemente connessa con aree visive extrastriate, come V2, V3, V4, V4t e V5/MT, completamente scevre di marcatura a seguito di iniezioni nella 45B. Anche nel lobo parietale la distribuzione della marcatura tra le due aree è nettamente distinta: l'area 8/FEF presenta infatti forti connessioni con AIP, che è priva di connessioni con l'area 45B, e con LIP, nella quale benchè sia presente marcatura anche a seguito di iniezioni nell'area 45B le proiezioni delle due aree sono largamente segregate; in particolare,

nell'area LIP, l'area 8/FEF presenta marcatura prevalentemente nelle porzioni ventrali, LIPv (Blatt e coll. 1990) mentre l'area 45B presenta invece proiezioni esclusivamente nella parte più dorsale dell'area, LIPd (Blatt e coll. 1990). Le proiezioni delle due aree, 45B ed 8/FEF, nell'area LIP sono inoltre ulteriormente distinguibili per una diversa distribuzione laminare delle cellule e dei terminali marcati: l'area 45B presenta infatti una marcatura retrograda di tipo bilaminato ed una distribuzione di terminali marcati di tipo colonnare, ovvero una distribuzione di marcatura che si osserva tipicamente tra aree aventi lo stesso livello gerarchico (Felleman e van Essen 1991), differentemente l'area 8/FEF presenta un pattern di marcatura di tipo *feedback* con una distribuzione di cellule marcate prevalentemente negli strati superficiali ed una distribuzione dei terminali in cui viene risparmiato il IV strato.

Anche in IPa e nella parte intermedia di TEa/m, dove parte delle proiezioni della 45B e dell'area 8/FEF convergono, la distribuzione laminare della marcatura è qualitativamente differente: in particolare se l'area 8/FEF evidenzia un pattern a *feedback* caratterizzato da cellule distribuite prevalentemente negli strati supragranulari e da terminali localizzati pressochè esclusivamente nel VI strato, l'area 45B, come in parte già descritto nella precedente sezione, presenta una distribuzione di cellule marcate di tipo bilaminare e terminali marcati localizzati prevalentemente negli strati intermedi; questi due distinti pattern di marcatura suggeriscono pertanto che le due aree ricevano ed inviino a questi settori temporali una differente tipologia di informazione.

In definitiva i pattern di connessioni largamente segregati e la differente distribuzione laminare, nei pochi settori costituenti un target comune, rappresentano ulteriori criteri odologici, che si aggiungono a quelli architettonici (Stanton e coll. 1989; Petrides e Pandya 1994, 2002; Gerbella e coll. 2007) e funzionali (Stanton e coll. 1989), per distinguere tra loro queste due aree del banco anteriore dell'IAS.

### *Connessioni dell'area 8r*

La percentuale di marcatura nella corteccia prefrontale a seguito di iniezioni nell'area 8r è maggiore rispetto a quella osservata in tutte le altre aree studiate; l'area 8r inoltre differentemente dalle adiacenti aree 8/FEF, 45B e 45A, evidenzia limitate connessioni temporali, localizzate pressochè esclusivamente nelle aree MT, FST e V4. L'unica area al di fuori del lobo frontale densamente connessa con l'area 8r è l'area LIP, dove abbiamo osservato due differenti cluster di marcatura: uno dorsale e sostanzialmente localizzato in una posizione analoga alla marcatura osservata a seguito di iniezioni nell'area 45B ed uno ventrale localizzato in una posizione pressochè coincidente a quella della marcatura osservata a seguito di iniezioni nell'area 8/FEF. Le forti connessioni con l'area LIP, con le adiacenti aree 8/FEF e 45B e con i SEF sono coerenti con la precedente ipotesi funzionale

che l'area 8r sia parte, insieme all'area 8/FEF ed all'area 45B, del dominio oculomotorio prefrontale.

#### *Connessioni della porzione ventro-caudale dell'area 46*

L'area 46 comprende una larga regione architettonicamente ed odologicamente non omogenea (Barbas e Mesulam 1985; Barbas e Pandya 1989; Preuss e Goldman-Rakic 1991; Petrides e Pandya 1994, 1999, 2002). Nel nostro studio ci siamo focalizzati nella caratterizzazione odologica esclusivamente della parte ventro-caudale dell'area, porzione il cui bordo ventrale confina con l'area 45A e la cui parte caudale confina con il bordo rostrale dell'area 8r. I nostri risultati sono simili e completamente confrontabili rispetto a quelli di altri studi precedenti in cui la localizzazione anatomica dei siti di iniezione corrisponde a questa parte ventro-caudale dell'area ed in particolare confermano che questa porzione dell'area 46 presenta: a) connessioni molto forti con la parte ventrale della corteccia premotoria, in particolare con l'area F5; b) forti connessioni con la corteccia parietale, soprattutto in corrispondenza della parte rostrale dell'IPL e dell'opercolo parietale; c) connessioni temporali relativamente limitate e segregate nell'area IPa e nell'area TEa/m.

I nostri risultati odologici confermano dunque l'esistenza di un bordo, già definito architettonicamente, tra l'area 46 e l'area 45A ed in particolare enfatizzano l'esistenza di una suddivisione dorso-ventrale tra una regione prefrontale dorsale, comprendente l'area 46, che riceve principalmente proiezioni parietali ed un settore ventrale, comprendente l'area 45A, connesso pressochè esclusivamente con il lobo temporale.

#### *Connessioni dell'area 12r*

Infine, un ulteriore importante punto del nostro studio è stato valutare la plausibilità del bordo, definito architettonicamente, tra l'area 45A e l'area 12r anche dal punto di vista odologico; la posizione del bordo architettonico tra queste due aree è infatti controversa: se infatti noi in accordo con Petrides e Pandya (1994, 2000) ne abbiamo individuato la posizione a livello dell'IPD alcuni autori ne hanno ipotizzato una localizzazione più caudale (Preuss e Goldman-Rakic 1991; Romanski e coll. 1999a) mentre altri lo hanno localizzato più rostralmente (Carmichael e Price 1994). I nostri dati, in completo accordo con quelli di Petrides e Pandya (2002), indicano che le connessioni temporali della parte caudale dell'area 12r, limitate esclusivamente al giro temporale inferiore, distinguono nettamente questo settore corticale dall'adiacente area 45A.

I risultati del nostro studio odologico suggeriscono pertanto che l'area 45A costituisce l'unica controparte architettonica della VLPF caudale le cui connessioni interessano i settori della corteccia

acustica implicati nella processazione di informazione uditiva complessa di tipo non spaziale e che l'area 45B è un distinto settore della VLPF caudale le cui forti connessioni con aree oculomotorie e con aree visive gerarchicamente elevate sono coerenti con la suggerita affiliazione al dominio oculomotorio prefrontale.

#### **4.5 Considerazioni funzionali**

A partire dagli anni 80' Goldman-Rakic (1987; vedi anche Levy e Goldman Rakic 2000) ha proposto l'ipotesi di un organizzazione modulare della corteccia prefrontale basata sull'esistenza di sistemi in parallelo in grado di processare distinti stimoli sensoriali sia di origine parietale che temporale in termini di memoria operativa -working memory-. Secondo questo modello interpretativo la VLPF ed in particolare la sua parte più caudale, comprendente sia l'area 12 che l'area 45A, sembrerebbe essere implicata nella processazione di informazione visiva di tipo non spaziale (*object memory domain*); coerentemente con questo modello in molti studi, sia precedenti che successivi a questa ipotesi, è stata evidenziata la presenza, in corrispondenza della regione ventrale al PS, di neuroni la cui attività è correlata alla visione di oggetti e stimoli visivi complessi (Pigarev e coll. 1979; Rosenkilde e coll. 1981; Suzuki e Azuma 1983; Wilson e coll. 1993; Asaad e coll. 1998; Hoshi e coll. 2000) e di immagini di facce (O Scalaidhe e coll. 1997).

Recenti studi di risonanza magnetica funzionale, su scimmie non anestetizzate, hanno inoltre evidenziato che un ristretto settore di questa porzione della VLPF, in particolare la zona circostante all'IPD, è attivata durante l'osservazione di immagini di facce e di visi (Tsao e coll. 2008); questo settore sembra corrispondere con la stessa regione anatomica in cui in studi di registrazione elettrofisiologica di singole unità cellulari è stata osservata la presenza di neuroni che rispondono a stimoli non spaziali di tipo complesso o puramente visivi o puramente uditivi o bimodali acustico-visivi, tra i quali immagini di facce e vocalizzazioni (Romanski e Goldman-Rakic 2002; Romanski e coll. 2005; Sugihara e coll. 2006); alla luce di questi dati fisiologici Romanski (2004, 2007) ha ipotizzato che questo settore prefrontale svolga un ruolo nel controllo dei comportamenti comunicativi.

Coerentemente con questa ipotesi interpretativa, questo settore corticale riceverebbe proiezioni sia dalle regioni dell'STG, implicate nell'integrazione di stimoli acustici complessi di tipo non spaziale (Romanski e coll. 1999), tra i quali anche vocalizzazioni, che dalla regione del banco dorsale dell'STS, corrispondente all'area fisiologicamente definita come STP, in cui viene attuata una processazione di informazione complessa di tipo multisensoriale ed in cui è stata evidenziata la presenza di neuroni che rispondono alla visione di azioni biologiche ed ad immagini di visi (Oram e Perrett 1994; Barraclough e coll. 2005; Jellema e Perrett 2006). Questo settore prefrontale è stato

localizzato dalla Romanski in corrispondenza della parte caudale dell'area 12, dove si sovrapporrebbero sia le proiezioni provenienti dalle corteccie acustiche dell'STG che quelle provenienti dalle corteccie visive inferotemporalì; un settore prefrontale localizzato dunque in una posizione intermedia tra l'area 45A, secondo questa ipotesi target esclusivo di proiezioni dalle corteccie visive inferotemporalì, e l'area 12, target selettivo invece delle proiezioni acustiche dell'STG. Il modello della Romanski si contrappone però a quello proposto da Petrides e Pandya (2002; vedi anche Petrides 2005) secondo il quale l'area 45 rappresenterebbe il settore della VLPF caudale target selettivo di proiezioni provenienti dalle corteccie acustiche e dall'area multimodale STP mentre l'area 12 (area 12/47 secondo la suddivisione di questi autori) costituirebbe un settore localizzato più rostralmente e target selettivo di proiezioni inferotemporalì; secondo questi autori inoltre l'area 45, in virtù della sua localizzazione anatomica, delle caratteristiche citoarchitettoniche e delle suddette connessioni con le aree acustiche, sarebbe l'omologa della corrispondente area 45 dell'uomo (Petrides e Pandya 2002).

I nostri dati architettònici ed odologici sembrano in grado di dirimere questo conflitto interpretativo: l'area 45A è infatti target specifico delle proiezioni frontali dalle aree acustiche rostrali dell'STG e dall'area multimodale STP e mostra inoltre una localizzazione anatomica compatibile con quella del settore prefrontale attivato, in studi di fMRI, a seguito della presentazione di immagini di facce e di visi (Tsao e coll. 2008) e nel quale, in studi di elettrofisiologia, sono stati registrati neuroni sensibili alla presentazione di stimoli comunicativi (Sugihara e coll. 2006; Romanski e coll. 2007).

In conclusione, l'area 45A coincide e costituisce la controparte architettònica del settore della VLPF caudale a cui è stato assegnato, dalla Romanski, un ruolo nel controllo dei processi comunicativi (Romanski e coll. 2004; Sugihara e coll. 2006; Romanski e coll. 2007) e per il quale Petrides e Pandya hanno ipotizzato un'omologia con la corrispondente area 45 dell'uomo (Petrides e Pandya, 2002).

I nostri dati odologici e dati funzionali presenti in letteratura, in particolare l'attivazione in studi di fMRI del settore corrispondente all'area 45A durante l'osservazione di azioni svolte da altri (Nelissen e coll. 2005), un aspetto dell'informazione visiva di notevole rilevanza in animali con una vita sociale estremamente complessa come i primati, oltre a confermare un possibile ruolo dell'area 45A nei comportamenti comunicativi, ne suggeriscono proprietà funzionali più generali; in particolare questi dati di fMRI e le proiezioni che giungono all'area 45A dall'area multisensoriale STP, anch'essa attivata in studi di fMRI durante la visione di azioni svolte da altri (Nelissen e coll. 2006) e sede di neuroni la cui scarica è correlata alla visione di differenti tipologie di movimenti biologici (Oram e Perrett 1994; Barraclough e coll. 2005; Jellema e Perrett 2006), suggeriscono che queste due aree siano parte di un network implicato nella processazione degli aspetti visivi presenti nei comportamenti comunicativi.

L'area 45A presenta inoltre connessioni con settori, come la parte dorsale dell'area 8/FEF, i SEF, la parte dorso-rostrale dell'area 46 e l'area 12o, che sono reciprocamente connessi tra loro e ricevono proiezioni (Huerta e coll. 1987; Stanton e coll. 1993; Schall e coll. 1995; Stanton e coll. 1995; Huerta e Kaas 1990; Luppino e coll. 2001, 2003; Wang e coll. 2005; Seltzer e Pandya 1989; Petrides e Pandya 1999; Saleem e coll. 2007; Carmichael e Price 1995) dalle cortecce acustiche dell'STG e dall'area STP; questo circuito temporo-prefrontale potrebbe costituire un substrato neurale implicato nella processazione di informazione visiva relata alla posizione degli occhi dell'interlocutore durante i processi comunicativi. Questa ipotesi è coerente con la presenza nell'area STP di neuroni visivi la cui scarica è correlata non solo alla visione di specifiche parti del viso o del corpo ma anche alla specifica posizione dello sguardo (Perrett e coll. 1992; Carey e coll. 1997) e sembra supportata anche da osservazioni etologiche e comportamentali che evidenziano infatti un ruolo fondamentale dello sguardo, sia nell'uomo che nella scimmia, durante i processi comunicativi; in particolare se nell'uomo, durante tali processi, l'attenzione si focalizza in parti uguali sulla bocca e sugli occhi dell'interlocutore, nella scimmia sembra interessare soprattutto gli occhi che costituiscono, in questa specie, il principale parametro utilizzato per definire le intenzioni altrui (Ghazanfar e coll. 2005) ed il mezzo per esprimere segnali di dominanza o di sottomissione nei confronti dei conspecifici (Tate e coll. 2006).

I nostri dati indicano inoltre che l'area 45B è un distinto settore architettonico ed odologico della VLPF caudale, target di elezione di proiezioni temporali provenienti dalle porzioni più rostrali della corteccia inferotemporale e dalla parte anteriore dell'area IPa. Le connessioni con queste regioni visive gerarchicamente elevate ed implicate nella processazione di stimoli visivi complessi di tipo non spaziale e le forti connessioni con aree oculomotorie come l'area 8/FEF, l'area 8r ed i SEF sono in linea con l'ipotesi di un'affiliazione dell'area 45B al dominio oculomotorio della VLPF caudale; coerentemente con questa ipotesi, come l'area 8/FEF e l'area 8r, anche l'area 45B fa parte del settore della VLPF caudale connesso oligosinapticamente con i muscoli laterali dell'occhio ed attivato, in studi funzionali basati sull'utilizzo di desossiglucosio, durante l'esecuzione di movimenti oculari saccadici (Moschovakis e coll. 2004); Sebbene queste caratteristiche anatomo-funzionali ed alcune caratteristiche morfologiche, la densità delle cellule immunopositive alla calbindina, accomunino le tre aree della VLPF caudale, l'area 45B differisce per specifici aspetti funzionali dall'area 8/FEF e dall'area 8r; differentemente da quello che accade in queste due aree infatti, la cui microstimolazione con stimoli a bassa soglia evoca movimenti oculari di tipo saccadico e movimenti di vergenza e di accomodazione, la stimolazione intracorticale dell'area 45B non si rivela efficace nell'induzione di nessun tipo di movimento oculare (vedasi Bruce e coll. 1985; Stanton e coll. 1989; Gamlin e Yoon 2000; ma anche le metodologie di stimolazione del nostro

studio utilizzate per definire i FEF come controparte fisiologica dell'area 8/FEF).

L'area 45B si distingue dall'area 8/FEF e dall'area 8r anche odologicamente: a) per la presenza di connessioni con le aree orbitofrontali e con le aree prefrontali rostrali che sono invece completamente prive di marcatura a seguito di iniezioni nell'area 8/FEF e nell'area 8r; b) per l'assenza di connessioni con aree visive primarie, che sono invece fortemente connesse con l'area 8/FEF. Queste differenze odologiche permettono di ipotizzare che l'area 45B all'interno del dominio oculomotorio prefrontale possa assumere un particolare ruolo di sito di ingresso di informazioni di tipo motivazionale e di tipo cognitivamente complesso, provenienti rispettivamente dalle corteccie orbitofrontali e dalle aree prefrontali rostrali; informazioni che potrebbero essere successivamente utilizzate dalle aree più propriamente esecutive, l'area 8/FEF e l'area 8r, per la diretta modulazione dei movimenti oculari.

Benchè studi di registrazione elettrofisiologica di quest'area non siano ancora stati attuati, in studi di fMRI l'area 45B, differentemente dall'area 8/FEF, si attiva a seguito della presentazione di immagini di oggetti complessi e di azioni biologiche svolte su di essi (Nelissen e coll. 2005) ed alla presentazione di immagini di facce e di visi (Tsao e coll. 2008); queste risposte funzionali sono coerenti con le connessioni che l'area 45B presenta con l'area TEa/m, in cui è attuata processazione di informazione visiva di oggetti tridimensionali (Janssen e coll. 2001) ed in cui sono presenti neuroni la cui attivazione è relata alla visione di azione biologiche svolte con la mano dove vi è una specifica interazione tra oggetto ed effetto (Perrett e coll. 1989). Futuri studi fisiologici potranno chiarire più precisamente le proprietà funzionali dell'area 45B e definirne il possibile ruolo nel controllo dei movimenti oculari; attualmente i nostri dati ci permettono di ipotizzare che l'area 45B possa essere un'area "preoculomotoria" in cui la convergenza di informazioni prefrontali, orbitofrontali ed inferotemporali potrebbe essere utilizzata allo scopo di guidare l'esplorazione di scene visive, di oggetti complessi, di azioni biologiche e di immagini di facce ed di visi.

#### **4.6 Conclusioni**

I nostri dati sono concordi con l'ipotesi che la corteccia prefrontale, o quantomeno la VLPF caudale, sia suddivisa non solo in regioni, come ipotizzato dalla Goldmann Rakic (1987), ma anche in singole aree architettoniche caratterizzate da specifici e distinti pattern di connessioni.

L'esistenza di queste suddivisioni anatomo-funzionali non presuppone che ciascun settore anatomico agisca come un'unità indipendente anzi, la forte connettività intraprefrontale caratterizzante le aree della VLPF caudale è in linea con l'ipotesi che specifici settori corticali solo

agendo di concerto siano in grado di costituire i circuiti funzionali che sottendono processi cognitivamente complessi (see, e.g., Miller e coll. 2002; Tanji e Hoshi, 2008).

La specificità delle connessioni, ad esempio dell'area 45A, con aree prefrontali che presentano comuni proiezioni alle porzioni anteriori delle corteccie temporali e parietali, è inoltre coerente con l'ipotesi dell'esistenza di circuiterie altamente specifiche e funzionalmente definite (come proposto inizialmente da Carmichael e Price 1996, ma vedasi anche Saleem e coll. 2008).

In definitiva la presenza di aree architettoniche distinte morfologicamente ed odologicamente anche a livello della corteccia prefrontale pur non presupponendo una suddivisione modulare delle funzioni cerebrali in cui singole zone corticali agiscano come organi mentali indipendenti suggerisce una ripartizione delle funzioni cerebrali tale per cui ciascuna facoltà mentale è rappresentata in modo differente all'interno delle varie aree corticali la cui vicendevole interazione ne garantisce la completa espressione.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Andersen RA, Asanuma C, Essick G, Siegel RM. 1990. Corticocortical connections of anatomically and physiologically defined subdivisions within the inferior parietal lobule. *J Comp Neurol.* 296: 65-113.
- Asaad WF, Rainer G, Miller EK. 1998. Neural activity in the primate prefrontal cortex during associative learning. *Neuron.* 21: 1399.
- Barbas H. 1986. Pattern in the laminar origin of corticocortical connections. *J Comp Neurol.* 252: 415-422.
- Barbas H. 1988. Anatomic organization of basoventral and mediodorsal visual recipient prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 276: 313-342.
- Barbas H, Mesulam M-M (1981) Organization of afferent input to subdivision of area 8 in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 200: 407-431.
- Barbas H, Mesulam MM. 1985. Cortical afferent input to the principalis region of the rhesus monkey. *Neuroscience.* 15: 619-637.
- Barbas H, Pandya DN. 1989. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 286: 353-375.
- Barbas H, Rempel-Clower N. 1997. Cortical structure predicts the pattern of corticocortical connections. *Cereb Cortex.* 7: 635-646.
- Barbas H, Ghashghaei HT, Rempel-Clower N, Xiao D. 2002. Anatomic basis of functional specialization in prefrontal cortices in primates. In: Grafman J, (ed.) *Handbook of Neuropsychology.* Amsterdam: Elsevier Science. pp. 1-27
- Barracough NE, Xiao D, Baker CI, Oram MW, Perrett DI. 2005. Integration of Visual and Auditory Information by Superior Temporal Sulcus Neurons Responsive to the Sight of Actions. *J Cogn Neurosci.* 17: 377-391.

Bayliss GC, Rolls ET, Leonard CM. 1987. Functional subdivisions of the temporal lobe neocortex. *J Neurosci.* 7: 330-342.

Bettio F, Demelio S, Gobbetti E, Luppino G, Matelli M. 2001. Interactive 3-D reconstruction and visualization of primates cerebral cortex. Society for Neuroscience Abstracts. 728.724.

Blatt GJ, Andersen RA, Stoner GR. 1990. Visual receptive field organization and cortico-cortical connections of the lateral intraparietal area (Area LIP) in the macaque. *J Comp Neurol.* 299: 421-445.

Bonin G von, Bailey P (1947) *The Neocortex of Macaca Mulatta*. Urbana: University of Illinois Press.

Borra E, Belmalih A, Calzavara R, Gerbella M, Murata A, Rozzi S, Luppino G. 2008. Cortical connections of the macaque anterior intraparietal (AIP) area. *Cereb Cortex.* 18: 1094-1111.

Boussaoud D, Ungerleider L, Desimone R. 1990. Pathways for motion analysis: cortical connections of the medial superior temporal and fundus of the superior temporal visual areas in the macaque. *J Comp Neurol.* 296: 462-495.

Brodmann K. 1909 *Vergleichende Lokalisationslehre der Groshirnrinde*. Leipzig (Reprinted 1925): Barth.

Bruce C, Desimone R, Gross CG. 1981. Visual properties of neurons in a polysensory area in superior temporal sulcus of the macaque. *J Neurophysiol.* 46: 369-384.

Bruce CJ, Goldberg ME (1984) Physiology of the frontal eye fields. *Trends Neurosci* 7: 436-441.

Bruce CJ, Goldberg ME, Bushnell C, Stanton GB. 1985. Primate frontal eye fields. II. Physiological and anatomical correlates of electrically evoked movements. *J Neurophysiol.* 54: 714-734.

Cadore G, Petrides M. 2007. Ventrolateral prefrontal neuronal activity related to active controlled memory retrieval in nonhuman primates. *Cereb Cortex.* 17: i27-40.

Calzavara R, Zappala A, Rozzi S, Matelli M, Luppino G (2005) Neurochemical characterization of the cerebellar-recipient motor thalamic territory in the macaque monkey. *Eur J Neurosci.* 21: 1869-1894.

Campbell MJ, Morrison JH (1989) Monoclonal antibody to neurofilament protein (SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the human and monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 282: 191-205.

Carey DP, Perrett DI, Oram MW. 1997. Recognizing, understanding and reproducing actions. In: Boller F, Grafman J, ed. *Handbook of Neuropsychology*. Amsterdam: Elsevier. pp 111-129.

Carmichael ST, Price JL. 1994. Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 346: 366-402.

Carmichael ST, Price JL. 1995. Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 363: 642-664.

Carmichael ST, Price JL. 1996. Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 371: 179-207.

Cavada C, Goldman-Rakic PS. 1989. Posterior parietal cortex in rhesus monkey: II. Evidence for segregated corticocortical networks linking sensory and limbic areas with the frontal lobe. *J Comp Neurol.* 287: 422-445.

Condé F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA (1994) Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J Comp Neurol.* 341: 95-116.

Connolly JD, Goodale MA, Cant JS, Munoz DP (2007) Effector-specific fields for motor preparation in the human frontal cortex. *NeuroImage.* 34: 1209.

Cusick CG, Seltzer B, Cola M, Griggs E (1995) Chemoarchitectonics and corticocortical terminations within the superior temporal sulcus of the rhesus monkey: evidence for subdivisions of superior temporal polysensory cortex. *J Comp Neurol.* 360: 513-535.

DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG (1989) High-resolution light and electron microscopic immunohistochemistry of colocalized GABA and calbindin D-28k in somata of double bouquet cell axons of monkey somatosensory cortex. *Eur J Neurosci.* 4: 46-60.

Dombrowski SM, Hilgetag CC, Barbas H (2001) Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. *Cereb Cortex* 11: 975-988.

Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed hierarchical processing in primate cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 1: 1-47.

Freedman DJ, Riesenhuber M, Poggio T, Miller EK. 2002. Visual Categorization and the Primate Prefrontal Cortex: Neurophysiology and Behavior. *J Neurophysiol*. 88: 929-941.

Galletti C, Gamberini M, Kutz DF, Fattori P, Luppino G, Matelli M (2001) The cortical connections of area V6: an occipito-parietal network processing visual information. *Eur J Neurosci* 13: 1572-1588.

Gallyas F (1979) Silver staining of myelin by means of physical development. *Neurol Res* 1: 203-209.

Gamlin PD, Yoon K (2000) An area for vergence eye movement in primate frontal cortex. *Nature* 407: 1003.

Geyer S, Zilles K, Luppino G, Matelli M (2000) Neurofilament protein distribution in the macaque monkey dorsolateral premotor cortex. *Eur J Neurosci* 12: 1554-1566.

Gerbella M, Belmalih A, Borra E, Rozzi S, Luppino G. 2007. Multimodal architectonic subdivision of the caudal ventrolateral prefrontal cortex of the macaque monkey. *Brain Struct Funct*. 212: 269-301.

Ghazanfar AA, Maier JX, Hoffman KL, Logothetis NK. 2005. Multisensory integration of dynamic faces and voices in rhesus monkey auditory cortex. *J Neurosci*. 25: 5004-5012.

Ghazanfar AA, Santos LR. 2004. Primate brains in the wild: the sensory bases for social interactions. *Nat Rev Neurosci*. 5: 603.

Goldman-Rakic P. 1987. Circuitry of primate prefrontal cortex and regulation of behavior by representational memory. In: Plum F, Mountcastle F, ed. *Handbook of Physiology*. Washington DC: The American Physiological Society. pp 373-515.

Gregoriou GG, Borra E, Matelli M, Luppino G. 2006. Architectonic organization of the inferior parietal convexity of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 496: 422-451.

Hackett TA, Stepniewska I, Kaas JH. 1999. Prefrontal connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *Brain Res.* 817: 45-58.

Hendry SH, Jones EG, Emson PC, Lawson DE, Heizmann CW, Streit P (1989) Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 76: 467-472.

Hof PR, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat* 16: 77.

Hof PR, Morrison JH (1995) Neurofilament protein defines regional patterns of cortical organization in the macaque monkey visual system: a quantitative immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 352: 161-186.

Hoshi E, Shima K, Tanji J. 2000. Neuronal activity in the primate prefrontal cortex in the process of motor selection based on two behavioral rules. *J Neurophysiol.* 83: 2355-2373.

Huerta MF, Kaas JH. 1990. Supplementary eye field as defined by intracortical microstimulation: connections in Macaques. *J Comp Neurol.* 293: 299-330.

Huerta MF, Krubitzer LA, Kaas JH. 1987. Frontal eye field as defined by intracortical microstimulation in squirrel monkeys, owl monkeys, and macaque monkeys II. Cortical connections. *J Comp Neurol.* 265: 332-361.

Koechlin E, Ody C, Kouneiher F. (2003) The architecture of cognitive control in the human prefrontal cortex *Science.* 302(5648):1181-5.

Kondo H, Tanaka K, Hashikawa T, Jones EG (1999) Neurochemical gradients along monkey sensory cortical pathways: calbindin-immunoreactive pyramidal neurons in layers II and III. *Eur J Neurosci* 11: 4197-4203.

Kondo H, Tanaka K, Hashikawa T, Jones EG (1994a) Neurochemical gradients along the monkey occipito-temporal cortical pathway *Neuroreport* 5: 613-616.

Janssen P, Vogels R, Liu Y, Orban GA. 2001. Macaque inferior temporal neurons are selective for three-dimensional boundaries and surfaces. *J Neurosci.* 21: 9419-9429.

Jellema T, Perrett DI. 2006. Neural representations of perceived bodily actions using a categorical frame of reference. *Neuropsychologia.* 44: 1535.

Kaas JH, Hackett TA. 2000. Subdivisions of auditory cortex and processing streams in primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 11793-11799.

Levy R, Goldman Rakic PS. 2000. Segregation of working memory functions within the dorsolateral prefrontal cortex. *Exp Brain Res.* 133: 23-32.

Lewis JW, Van Essen DC. 2000. Corticocortical connections of visual, sensorimotor, and multimodal processing areas in the parietal lobe of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 428: 112-137.

Luppino G, Belmalih A, Borra E, Gerbella M, Rozzi S. 2006. Architectonics and cortical connections of the ventral prearcuate area 45B of the macaque monkey. 2006 Program No 63.2 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006. Online.

Luppino G, Calzavara R, Rozzi S, Matelli M. 2001. Projections from the superior temporal sulcus to the agranular frontal cortex in the macaque. *Eur J Neurosci.* 14: 1035-1040.

Luppino G, Rozzi S, Calzavara R, Matelli M. 2003. Prefrontal and agranular cingulate projections to the dorsal premotor areas F2 and F7 in the macaque monkey. *Eur J Neurosci.* 17: 559-578.

Maioli MG, Squatrito S, SamolskyDekel BG, Sanseverino ER (1998) Corticocortical connections between frontal periarculate regions and visual areas of the superior temporal sulcus and the adjoining inferior parietal lobule in the macaque monkey. *Brain Res* 789 : 118-125.

Matelli M, Govoni P, Galletti C, Kutz DF, Luppino G. 1998. Superior area 6 afferents from the superior parietal lobule in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 402: 327-352.

Medalla M, Barbas H. 2006. Diversity of laminar connections linking periarculate and lateral intraparietal areas depends on cortical structure. *Eur J Neurosci*. 23: 161-179.

Miller EK, Freedman DJ, Wallis JD. 2002. The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*: 357: 1123.

Morecraft RJ, Louie JL, Herrick JL, Stilwell-Morecraft KS. 2001. Cortical innervation of the facial nucleus in the non-human primate: A new interpretation of the effects of stroke and related subtotal brain trauma on the muscles of facial expression. *Brain*. 124: 176-208.

Morecraft RJ, McNeal DW, Stilwell-Morecraft KS, Dvanajscak Z, Ge J, Schneider P. 2007. Localization of arm representation in the cerebral peduncle of the non-human primate. *J Comp Neurol*. 504: 149-167.

Moschovakis AK, Gregoriou GG, Ugolini G, Doldan M, Graf W, Guldin W, Hadjidimitrakis K, Savaki HE. 2004. Oculomotor Areas of the Primate Frontal Lobes: A transneuronal transfer of rabies virus and [14c]-2-deoxyglucose functional imaging study. *J Neurosci*. 24: 5726-5740.

Murray EA, Bussey TJ, Wise SP. 2000. Role of prefrontal cortex in a network for arbitrary visuomotor mapping. *Exp Brain Res*. 133: 114-129.

Nelissen K, Luppino G, Vanduffel W, Rizzolatti G, Orban GA. 2005. Observing others: multiple action representation in the frontal lobe. *Science*. 310: 332-336.

Nelissen K, Luppino G, Vanduffel W, Rizzolatti G, Orban GA. 2006. Representation of observed actions in macaque occipitotemporal and parietal cortex. Program No 306.12 2006 Neuroscience Meeting Planner Atlanta, GA: Society for Neuroscience, 2006 Online.

Ninokura Y, Mushiake H, Tanji J. 2004. Integration of temporal order and object information in the monkey lateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol*. 91: 555-560.

O Scailidhe SP, Wilson FAW, Goldman-Rakic PS. 1997. Areal segregation of face-processing neurons in prefrontal cortex. *Science*. 278: 1135-1138.

Olson CR, Musil SY, Goldberg ME. 1996. Single neurons in posterior cingulate cortex of behaving macaque: eye movements signals. *J Neurophysiol*. 76: 3285-3330.

Oram MW, Perrett DI. 1994. Responses of anterior superior temporal polysensory (STPa) neurons to 'biological motion' stimuli. *Cog Neurosci.* 6: 99-116.

Passingham RE. 1993 The frontal lobe and voluntary action. Oxford: Oxford University Press.

Passingham RE, Toni I, Rushworth MFS. 2000. Specialisation within the prefrontal cortex: the ventral prefrontal cortex and associative learning. *Exp Brain Res.* 133: 103-113.

Perrett DI, Harries MH, Bevan R, Thomas S, Benson PJ, Mistlin AJ, Chitty AJ, Hietanen JK, Ortega JE. 1989. Frameworks of analysis for the neural representation of animate objects and actions. *J Exp Biol.* 146: 87-113.

Perrett DI, Hietanen JK, Oram MW, Benson PJ, Rolls ET. 1992. Organization and Functions of Cells Responsive to Faces in the Temporal Cortex [and Discussion]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 335: 23.

Petrides M. 2000. The role of the mid-dorsolateral prefrontal cortex in working memory. *Exp Brain Res.* 133: 44-54.

Petrides M. 2005. Lateral prefrontal cortex: architectonic and functional organization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360: 781.

Petrides M, Cadoret G, Mackey S. 2005. Orofacial somatomotor responses in the macaque monkey homologue of Broca's area. *Nature.* 435: 1235.

Petrides M, Pandya DN. 1988. Association fiber pathways to the frontal cortex from the superior temporal region in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 273: 52-66.

Petrides M, Pandya DN. 1994. Comparative architectonic analysis of the human and the macaque frontal cortex. In: Boller F, Grafman J, ed. Handbook of Neuropsychology. Amsterdam: Elsevier. pp 17-58.

Petrides M, Pandya DN. 1999. Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. *Eur J Neurosci.* 11: 1011-1036.

Petrides M, Pandya DN. 2002. Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey. *Eur J Neurosci.* 16: 291-310.

Petrides M, Pandya DN. 2007. Efferent association pathways from the rostral prefrontal cortex in the macaque monkey. *J Neurosci.* 27: 11573-11586.

Pigarev IN, Rizzolatti G, Scandolara C. 1979. Neurons responding to visual stimuli in the frontal lobe of macaque monkeys. *Neurosci Lett.* 12: 207.

Preuss TM, Goldman-Rakic PS (1989) Connections of the ventral granular frontal cortex of macaques with perisylvian premotor and somatosensory areas: anatomical evidence for somatic representation in primate frontal association cortex. *J Comp Neurol* 282: 293-316.

Preuss TM, Goldman-Rakic PS. 1991. Myelo- and cytoarchitecture of the granular frontal cortex and surrounding regions in the streptisine primate *Galago* and the anthropoid primate *Macaca*. *J Comp Neurol.* 310: 429-474.

Rempel-Clower NL, Barbas H. 2000. The Laminar Pattern of Connections between Prefrontal and Anterior Temporal Cortices in the Rhesus Monkey is Related to Cortical Structure and Function. *Cereb Cortex.* 10: 851-865.

Romanski LM. 2004. Domain specificity in the primate prefrontal cortex. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 4: 421-429.

Romanski LM. 2007. Representation and integration of auditory and visual stimuli in the primate ventral lateral prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 17: i61-69.

Romanski LM, Averbeck BB, Diltz M. 2005. Neural representation of vocalizations in the primate ventrolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol.* 93: 734-747.

Romanski LM, Bates JF, Goldman Rakic PS. 1999a. Auditory belt and parabelt projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 403: 141-157.

Romanski LM, Goldman-Rakic PS. 2002. An auditory domain in primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci.* 5: 15.

Romanski LM, Tian B, Fritz J, Mishkin M, Goldman-Rakic PS, Rauschecker JP. 1999b. Dual streams of auditory afferents target multiple domains in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci.* 2: 1131-1136.

Rosenkilde CE, Bauer RH, Fuster JM. 1981. Single cell activity in ventral prefrontal cortex of behaving monkeys. *Brain Res.* 209: 375.

Rozzi S, Calzavara R, Belmalih A, Borra E, Gregoriou GG, Matelli M, Luppino G. 2006. Cortical connections of the inferior parietal cortical convexity of the macaque monkey. *Cereb Cortex.* 16: 1389-1417.

Saito N, Mushiake H, Sakamoto K, Itoyama Y, Tanji J. 2005. Representation of immediate and final behavioral goals in the monkey prefrontal cortex during an instructed delay period. *Cereb Cortex.* 15: 1535-1546.

Saleem KS, Kondo K, Price JL. 2008. Complementary circuits connecting the orbital and medial prefrontal networks with the temporal, insular, and opercular cortex in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 506: 659-693.

Saleem KS, Price JL, Hashikawa T. 2007. Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic subdivisions of the perirhinal and parahippocampal cortices in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 500: 973-1006.

Saleem KS, Tanaka K. 1996. Divergent projections from the anterior inferotemporal area TE to the perirhinal and entorhinal cortices in the macaque monkey. *J Neurosci.* 16: 4757-4775.

Schall JD, Morel A, King DJ, Bullier J. 1995. Topography of visual cortex connections with frontal eye field in macaque: convergence and segregation of processing streams. *J Neurosci.* 15: 4464-4487.

Schlag J, Schlag-Rey M. 1987. Evidence for a supplementary eye field. *J Neurophysiol.* 57: 179-200.

Seltzer B, Pandya DN. 1989. Frontal lobe connections of the superior temporal sulcus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 281: 97-113.

- Shiwa T. 1987. Corticocortical projections to the monkey temporal lobe with particular reference to the visual processing pathways. *Arch Ital Biol.* 125: 139-154.
- Stanton GB, Bruce CJ, Goldberg ME. 1993. Topography of projections to the frontal lobe from the macaque frontal eye fields. *J Comp Neurol.* 330: 286-301.
- Stanton GB, Bruce CJ, Goldberg ME. 1995. Topography of projections to posterior cortical areas from the macaque frontal eye fields. *J Comp Neurol.* 353: 291-305.
- Stanton GB, Deng S-Y, Goldberg ME, McMullen NT. 1989. Cytoarchitectural characteristics of the frontal eye fields in macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 282: 415-427.
- Stanton GB, Friedman HR, Dias EC, Bruce CJ. 2005. Cortical afferents to the smooth-pursuit region of the macaque monkey's frontal eye field. *Exp Brain Res.* 165: 179.
- Stanton GB, Goldberg ME, Bruce CJ. 1988. Frontal eye fields efferents in the macaque monkey: I. Subcortical pathways and topography of striatal and thalamic terminal fields. *J Comp Neurol.* 271: 473-492.
- Sugihara T, Diltz MD, Averbeck BB, Romanski LM. 2006. Integration of auditory and visual communication information in the primate ventrolateral prefrontal cortex. *J Neurosci.* 26: 11138-11147.
- Suzuki H, Azuma M. 1983. Topographic studies on visual neurons in the dorsolateral prefrontal cortex of the monkey. *Exp Brain Res.* 53: 47-58.
- Tanji J, Hoshi E. 2008. Role of the lateral prefrontal cortex in executive behavioral control. *Physiol Rev.* 88: 37-57.
- Tate AJ, Fischer H, Leigh AE, Kendrick KM. 2006. Behavioural and neurophysiological evidence for face identity and face emotion processing in animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361: 2155.
- Tsao DY, Freiwald WA, Tootell RBH, Livingstone MS. 2006. A cortical region consisting entirely of face-selective cells. *Science.* 311: 670-674.

- Tsao DY, Schweers N, Moeller S, Freiwald WA. 2008. Patches of face-selective cortex in the macaque frontal lobe. *Nat Neurosci.* 11: 877.
- Van Essen DC 1985 Functional organization of primate visual cortex. In: *Cerebral Cortex* (Jones EG, Peters A, eds.), pp 259-329. New York: Plenum Press.
- Walker E. 1940. A cytoarchitectural study of the prefrontal area of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 98: 59-86.
- Wang Y, Isoda M, Matsuzaka Y, Shima K, Tanji J. 2005. Prefrontal cortical cells projecting to the supplementary eye field and presupplementary motor area in the monkey. *Neurosci Res.* 53: 1-7.
- Watson, DE (1992) *Contouring: A Guide to the Analysis and Display of Spatial Data*, Tarrytown, NY: Pergamon (Elsevier Science, Inc.)
- Webster MJ, Bachevalier J, Ungerleider LG. 1994. Connections of inferior temporal areas TEO and TE with parietal and frontal cortex in macaque monkeys. *Cereb Cortex.* 4: 470-483.
- White IM, Wise SP. 1999. Rule-dependent neuronal activity in the prefrontal cortex. *Exp Brain Res.* 126: 315-335.
- Wilson FA, Scalaidhe SP, Goldman Rakic PS. 1993. Dissociation of object and spatial processing domains in primate prefrontal cortex. *Science.* 260: 1955-1958.

## **Ringraziamenti**

Desidero ringraziare Prof. Giuseppe Luppino, per la sua attenta e sapiente guida, Stefano Rozzi per il quotidiano stimolo a migliorare e il suo ottimo esempio, Abdelouahed Belmalih e Elena Borra per l'immane collaborazione e il sempre amichevole supporto.