
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALBERTO STEFANELLI, EMILIA CATALDI, LUISA ANNA
IERADI

Sinapsi interneuroniche in aggregati di cellule cerebellari di embrione di pollo in coltura

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 59 (1975), n.6, p. 831–835.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1975_8_59_6_831_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Sinapsi interneuroniche in aggregati di cellule cerebellari di embrione di pollo in coltura* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Embryonic rudiments of the cerebellum of 11 days old chick embryos were dissociated with trypsin; numerous spherules or globets of 100–300 μ diameter were re-aggregated after some hours; these were cultivated in vitro in a giratory shaker for a maximum of 21 days. Ultrathin sections for electron microscopy observation were made. Purkinje cells, granule cells and Golgi cells are recognizable. Various parts of these globets were found rich in synaptic knobs and other simple synaptic patterns as well some complex synaptic systems typical of normal cerebellum. Easily identifiable are cerebellar “glomeruli” formed of a central “rosette” synaptically joined with dendritic claws of the granule cells and “en marron” systems with the perikaryon of the Golgi cells. The complete absence of all extracerebellar afference is the proof that granule cells and Golgi cells are capable of synaptic connection with afferents of a different nature to those normally formed by mossy fibres and other fibres of extracerebellar origin. It is thus experimentally demonstrated that it is the recipient neuron which determines the synaptic pattern whatever the nature of the afference. It is also demonstrated that it is the activity of the efferent or recipient station which determines the synaptogenetic behaviour of nervous pathways.

Queste ricerche si inquadrano nel problema generale del differenziamento dei neuroni che già da molti anni andiamo indagando nel nostro Istituto con il metodo dell'isolamento *in vivo* e *in vitro*.

Il differenziamento delle cellule cerebellari di Purkinje è stato già preso in esame da uno di noi (Stefanelli) sin dal 1954 con l'isolamento di frammenti cerebellari di embrioni di pollo trapiantati in allanto-corion in rapporto alla dimensione dei frammenti, in colture organizzate (Ieradi e Cataldi 1973) e con tecniche istochimiche (Ieradi e Cataldi, 1964) (Cataldi Ieradi e Caravita 1974).

Abbozzi cerebellari di embrioni di pollo di 11 giorni sono stati disgregati sino a cellule libere (Tav. I, fig. 1) con tripsinizzazione in mezzi privi di calcio e magnesio e successivamente meccanicamente, pipettando. La sospensione cellulare è stata posta a ruotare (70 rpm) in giratory shaker in fiasche di Erlenmayer di 25 ml in MEM (*minimal essential medium*) con glutamina (0,1 %), più siero di cavallo (10 %), estratto embrionale (2 %) diluito in Gey al 50 % e glucosio 600 mg %. Si sono aggregate delle sferule di 100–300 μ di diametro

(*) Ricerca compiuta nell'Istituto di Anatomia comparata “G. B. Grassi”, della Università di Roma, con un contributo del CNR e con la collaborazione tecnica dei Sigg. Gentili, per le colture *in vitro*, e Scorsini per la microscopia elettronica.

(**) Nella seduta del 13 dicembre 1975.

(Tav. I, fig. 2) che sono state coltivate per un massimo di 21 giorni (cioè ad una età corrispondente a quella di pulcini di 12 giorni). Sono state quindi fissate in gluteraldeide (1 %) più formaldeide (4 %) secondo Karnosky ('65) 0,15M in tampone sodio cacodilato a pH 7,2-7,4. Lo studio è stato fatto al microscopio ottico su sezioni colorate con il metodo argentario di Bodian e su sezioni semifine colorate con blu di toluidina e al m. elettronico su sezioni ultrasottili ottenute con Ultratome LKB.

Negli aggregati si sono differenziati alcuni tipi di neuroni; tra questi chiaramente riconoscibili alcune cellule di Purkinje, molte cellule di Golgi (II tipo) e moltissime cellule granulari. Rimandiamo ad un lavoro *in extenso* la descrizione di questi neuroni e della glia che appare molto abbondante e con elementi di cospicue dimensioni, per soffermarci sui tipi sinaptici che abbiamo riscontrato e che ci permettono nuove deduzioni.

Le sinapsi si ritrovano per lo più riunite in zone circoscritte in posizione, nell'aggregato, del tutto casuale. Si possono distinguere bottoni sinaptici semplici (Tav. II, fig. 3) e complessi sinaptici, cioè espansioni o varicosità di neuriti con numerosi punti sinaptici attivi. Sono predominanti le sinapsi a membrane simmetriche, classificate da Gray (1959) di II tipo; rare quelle asimmetriche. Le vescicole presinaptiche, abbondanti, sono sempre di tipo sferico; non si sono riscontrate sinapsi di tipo elettrico (*tight* o *gap junction*). Non siamo sin ora riusciti a permetterci il riconoscimento della natura delle fibre presinaptiche, afferenti, mentre ci è stato facile accertare la natura del neurone ricevente per le sue caratteristiche strutturali tipiche.

Abbiamo potuto riconoscere in modo molto preciso «glomeruli» cerebellari e sinapsi «en marron» con le cellule di Golgi.

I glomeruli cerebellari (Tav. III, figg. 5 e 6) sono formati da una varicosità ampia, o clava, o «rosetta», ricca di mitocondri e di vescicole presinaptiche circondata dai dendriti delle cellule granulari, tipici per la forma «a zampetta» definiti anche «dendritic claws». I vari dendriti a contatto con la clava costituiscono tanti punti attivi del sistema con ispessimento delle membrane e affollamento delle vescicole dal lato presinaptico. Alla periferia dei dendriti delle cellule granulari altre fibre sono simili a quelle che nelle condizioni normali costituiscono il plesso neuritico prodotto dalle cellule di Golgi (Mugnaini e Forstrønen 1967, Mugnaini 1969). La somiglianza di questi glomeruli ricostituiti nei nostri aggregati con i glomeruli del cervelletto normale è notevolissima, solo che nei glomeruli ricostituiti la clava o rosetta centrale non è di fibre estrinseche, quali sono le fibre muschiose e le fibre rampicanti del cervelletto normale, ma appartengono a neuriti di elementi intrinseci al cervelletto.

Le sinapsi «en marron» rappresentano un altro complesso sinaptico scoperto da Chan-Palay e Palay nel ratto (1971), definito «en marron» per l'aspetto pieghettato assunto dalla membrana del pericaryon delle cellule di Golgi entro cui si impegnano altrettante pieghettature delle varicosità delle fibre muschiose e rampicanti (*). Nei nostri aggregati compaiono sinapsi

(*) Vedi nota aggiunta.

« en marron » tipiche (Tav. II, fig. 4), ma, anche in questo caso, come nel precedente, la varicosità appartiene a neuriti di cellule intrinseche al cervelletto di natura completamente diversa.

La conclusione che si può trarre da questi risultati ci permette di introdurre un nuovo concetto nella meccanica della sinaptogenesi.

Risulta innanzi tutto evidente che alcune cellule cerebellari hanno la capacità, pur nelle condizioni di isolamento da noi provocate, di realizzare sistemi sinaptici complessi e altamente specifici pur in assenza di una afferenza specifica. L'espansione presinaptica, di natura estranea, non influisce sulla struttura sinaptica altamente specifica e peculiare del neurone ricevente. Così si formano « glomeruli » morfologicamente perfetti tra i dendriti a zampetta (*dendritic claws*) delle cellule granulari e varicosità o rosette presinaptiche che non sono nè di fibre muschiose nè di fibre rampicanti come avviene nel neurone integro. Così si formano sinapsi « en marron » con le cellule di Golgi con una afferenza che non è nè di fibre muschiose nè rampicanti.

La determinazione della specificità strutturale delle sinapsi è quindi dovuta al neurone ricevente, come aveva già prospettato Mugnaini (1971) basandosi sulla osservazione che nelle normali vie nervose centrali fibre afferenti della stessa natura, formino sinapsi diverse quando si uniscono a centri diversi. Anche Palay e Palay ('71), riferendosi a glomeruli costituiti da collaterali di fibre rampicanti, ipotizzano il valore del neurone ricevente nella edificazione della sinapsi e concludono che sono necessarie ricerche embriologiche e sperimentali per giungere ad una conferma. Le nostre osservazioni danno una precisa dimostrazione sperimentale che la *specificità strutturale della sinapsi è determinata dal neurone ricevente*.

Un'altra deduzione che scaturisce da queste esperienze è la *aspecificità del contatto sinaptico*: il neurone ricevente si sinapta sempre in modo specifico alla sua natura con afferenze di qualsiasi natura, purché le clave o le varicosità neuritiche siano ricche di vescicole cariche di mediatore chimico.

Questi fatti non sono in favore di una concezione neurobiotattica o neurotropica nella costituzione della concatenazione dei neuroni nella edificazione delle vie nervose. Si è più verosimilmente portati a considerare nelle nostre sferule riaggregate, con una organizzazione disordinata, ad un incontro degli elementi pre- e post-sinaptici del tutto casuale; il chemiotropismo può forse essere invocato alle brevissime distanze, forse per opera del neurotrasmettitore, al momento della unione delle membrane pre e post-sinaptica. Nel caso specifico da noi studiato è verosimile che nell'accrescimento normale dell'encefalo le fibre muschiose e rampicanti raggiungano il cervelletto e la zona di sinapsi guidate dal tigmotropismo, secondo il principio della *contact guidance* di P. Weiss (1934), ove la glia ha una fondamentale importanza nella predisposizione del supporto su cui si accrescono le fibre.

La deduzione, secondo noi, più importante che si può trarre da questi risultati, è che in una catena sinaptica di una via nervosa in formazione, non è il 1° neurone che si unisce al 2° e questo che si unisce al 3° e così via, ma

è il 2° neurone che si sinapta col 1°, il 3° col 2° e così di seguito, spostando quindi l'ordine della attività sinaptogenetica della catena.

Le presenti osservazioni ci permettono inoltre di intervenire nella recentissima discussione sul significato delle alterazioni strutturali del cervelletto dei topi mutanti « weaver » in cui mancano quasi completamente le cellule granulari (Larramendi '69, Sotelo '75). Secondo Sotelo il nuovo aspetto morfologico del cervelletto sarebbe dovuto ad un rimodellamento delle strutture tendenti a compensare le funzioni perdute. In un recentissimo articolo su « Nature » Shin-Ho Chung appoggia questa veduta dicendo che nel programma di sviluppo vi è una « strategia flessibile » utile a minimizzare l'effetto di un errore genetico. Nei nostri aggregati la « strategia flessibile » porta alla costituzione di sinapsi perfette, ma con afferenze del tutto occasionali, e non può far certo raggiungere alcun equilibrio nel nuovo ordine morfologico delle sferule riaggregate *in vitro*.

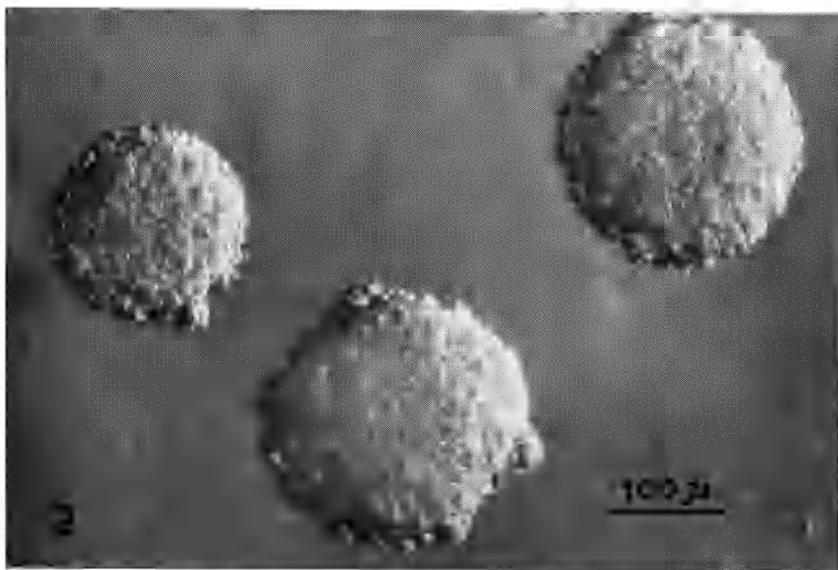
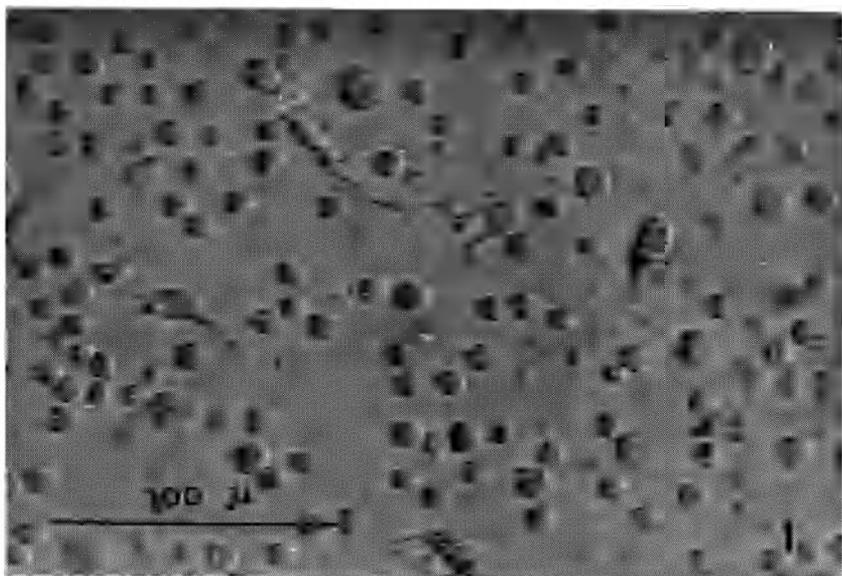
Nota aggiuntiva.

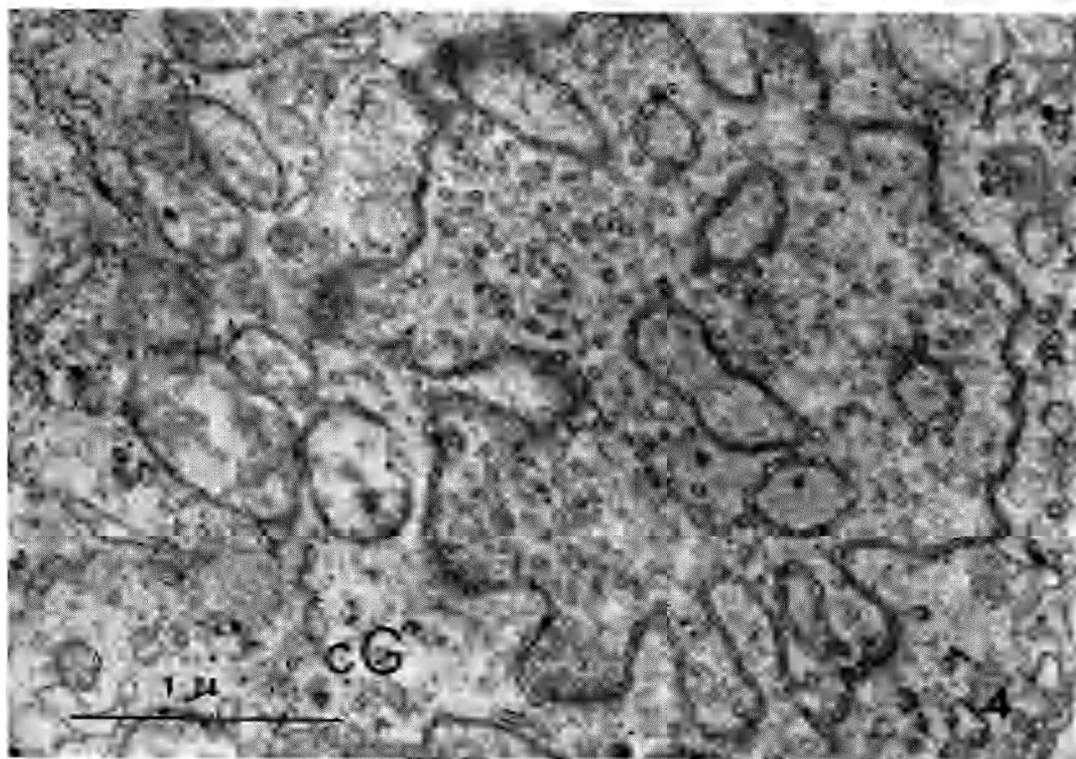
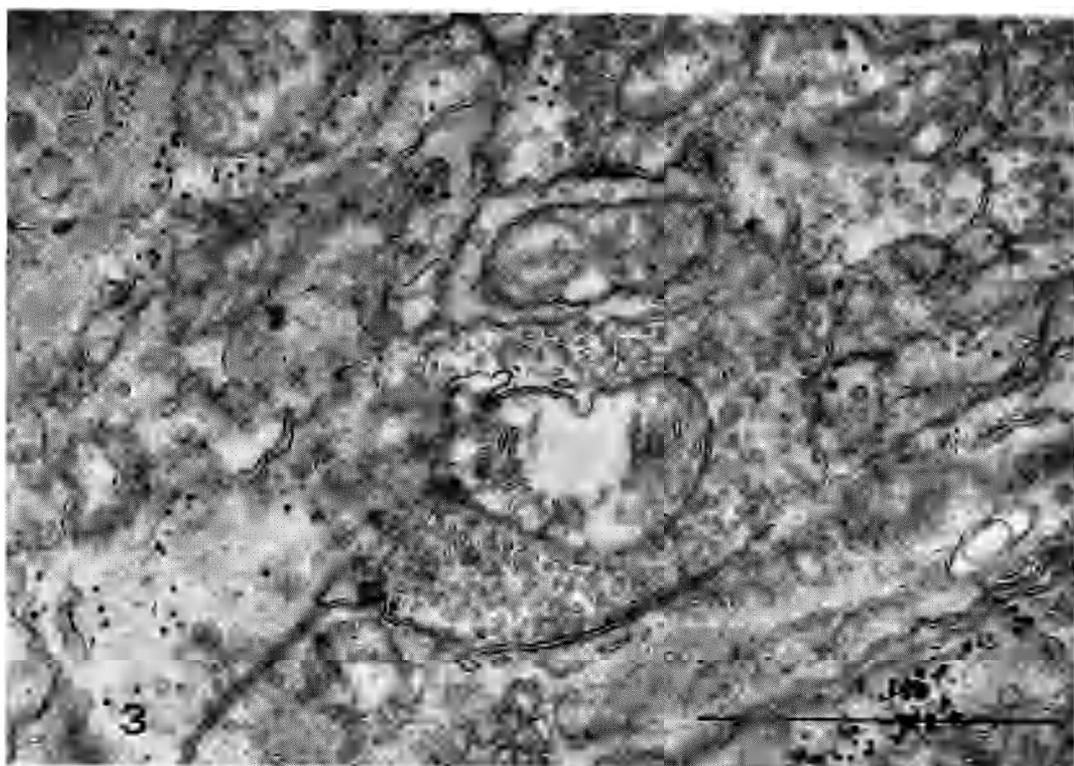
Le caratteristiche sinapsi « *en marron* » tra le fibre muschiose e le fibre rampicanti e i pirenofori delle cellule di Golgi di II tipo sono state scoperte nel 1971 nel ratto da Palay e Chan-Palay e ampiamente descritte nel loro libro « *Cerebellar cortex* » (Ed. Springer-Verlag) del 1974. Mugnaini non ha trovato queste sinapsi nel pollo (comunicazione personale e secondo dati riferiti in un capitolo del libro di Jansen e Larsell « *The cerebellum* » (Univ. Minnesota Press) del 1972), ne sono state descritte nel gatto da Hamori e Szntagothai (*Exper. Brain Res.* 1966). Tuttavia nei nostri aggregati il loro profilo appare in modo chiarissimo e con relativa frequenza. Osservazioni in corso su cervelletti integri di pulcini e polli adulti non ci permettono ancora di affermarne la presenza, ma va tenuto presente che le cellule di Golgi sono piuttosto rare persino per la osservazione ottica. In una lettera del 31/3/1976 S. L. Palay mi comunica di aver trovate sinapsi « *en marron* » anche nella scimmia e nel gatto e conclude come sia presumibile che questa sinapsi sia diffusa in tutti i Vertebrati superiori.

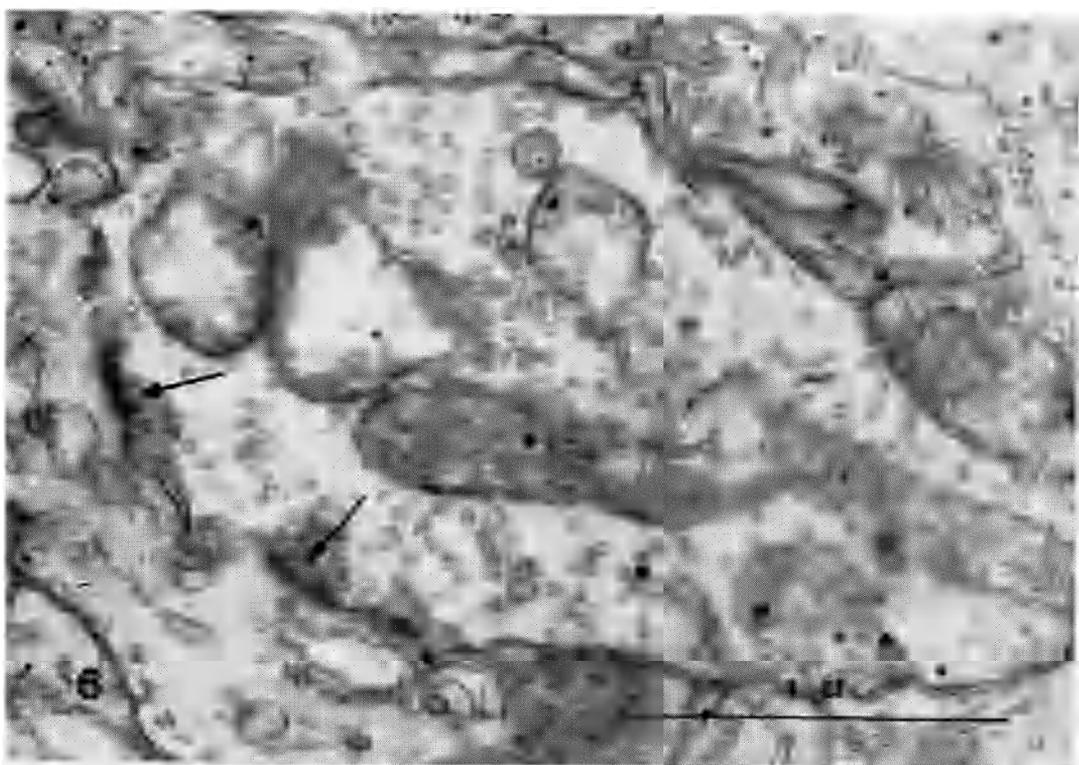
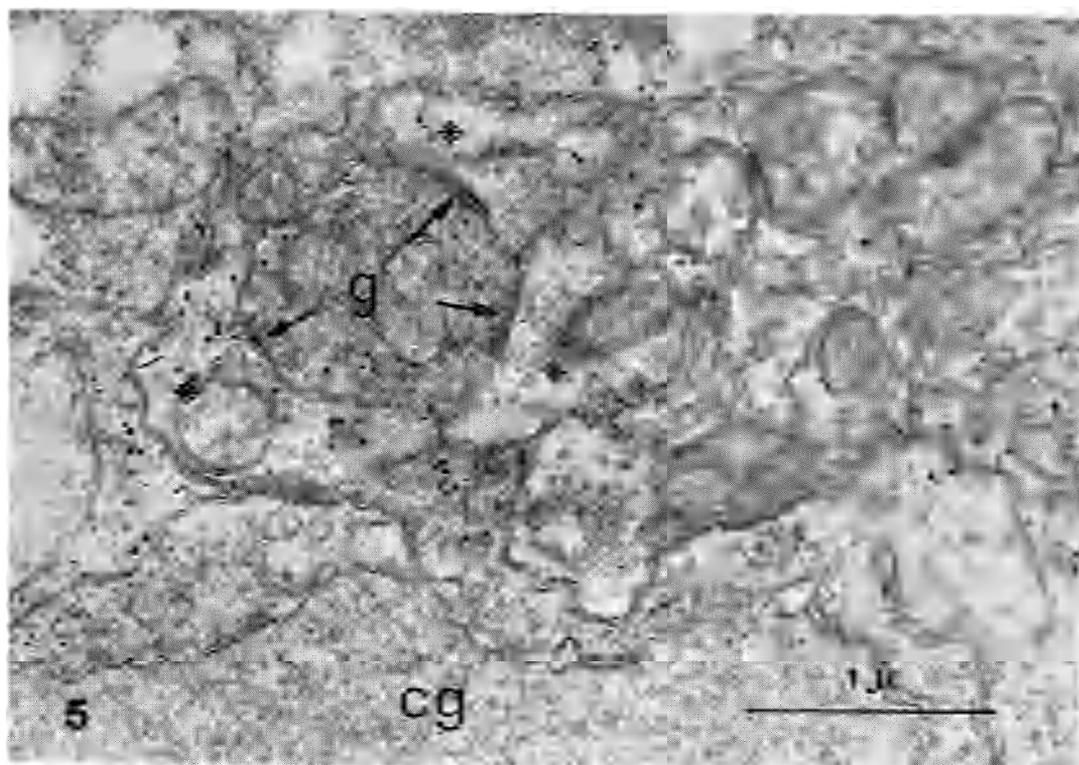
Il fatto incontrovertibile che queste sinapsi si siano formate nelle sferule aggregate di cervelletto di embrione di pollo, e con una certa frequenza, trova la sua spiegazione più plausibile, secondo noi, che le cellule di Golgi, assai rade e disseminate nel cervelletto integro, si trovino « concentrate » negli aggregati per una maggior sopravvivenza di queste cellule rispetto alle stesse cellule di Purkinje e alle cellule granulari poiché al momento della disgregazione (11 giorni di incubazione) sono, come tutte le cellule stellate, le meno differenziate.

BIBLIOGRAFIA

- CATALDI E, IERADI L. A. e CARAVITA S., *Acetylcholinesterase distribution in the cerebellar cortex in the chick during development: an electron microscopic study.* « J. of Neurocytol. », 5, 35-48 (1974).
- CHAN-PALAY V. e S. L. PALAY., *Tendril and glomerular collaterals of climbing fibres in the granular layer of the Rat cerebellar cortex.* « Z. Anat. Entw. Gesch. », 133, 247-273 (1971).
- GRAY E. G., *Axo-somatic and axo-dendritic synapses of cerebellar cortex.* « J. Anat » 93, 345-350, London (1961).
- HAMORI J. e SZENTÁGOTHAJ J., *Partecipation of Golgi neurone processes in the cerebellar glomeruli.* « Exp. Brain Res. », 2, 118-128 (1966).
- IERADI L. A. e CATALDI E., *Localizzazioni della colinesterasi nel cervelletto di Uccelli.* « Riv. di Istoch. », 10, 413-420 (1964).







- IERADI L. A. e CATALDI E., *Attività della acetilcolinesterasi nel cervelletto di pollo coltivato in vitro*. «Rend. Acc. Naz. Lincei», 53, 214-216 (1973).
- LARRAMENDI L. M., *Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of the mouse*. In «Neurobiology of cerebellar evolution and development», Chicago (1969).
- MUGNAINI G., *Ultrastructural aspects of cerebellar morphology in the chick embryo*. «Anat. Rec.», 154, 391 (1966).
- MUGNAINI G., *Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis*. In «Neurobiology of cerebellar evolution and development», Chicago (1969).
- MUGNAINI G. e FORSTRØNEN P. F. F., *Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis*. «Z.f. Zellf.», 77, 115-143 (1967).
- SOTELO C., *Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice*. «Brain Res.», 94, 19-44 (1975).
- SHIN-HO CHUNG, *Synaptic remodelling in the mutant cerebellum*. «Nature», 257, 86-87 (1975).
- STEFANELLI A., *Fattore spaziale e organizzazione strutturale nel differenziamento dei neuroni dei lobi ottici e del cervelletto in impianti allanto-coriali*. «Rend. Acc. Naz. Lincei», 16, 792-798 (1954).
- WEISS P., *In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fibre*. «J. Exper. Zool.», 68, 393-448 (1934).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Stato di disgregazione delle cellule di abbozzo cerebellare di embrione di pollo di 11 giorni.
- Fig. 2. - Sferule aggregate in bottiglie di Erlenmeyer (in *giratory shaker*) dopo 21 giorni di coltura.

TAVOLA II.

- Fig. 3. - Bottoni simpatici semplici in sferule di 21 giorni di coltura.
- Fig. 4. - Tipica sinapsi «en marron» compenetrata nel pericaryon di una cellula di Golgi (cG).

TAVOLA III.

- Fig. 5. - Tipico glomerulo cerebellare (g) circondato dai dendriti a zampetta delle cellule granulari (asterisco). Con le frecce sono indicati i punti attivi. Coltura di 21 gg.
- Fig. 6. - Altra rosetta o clava di un glomerulo carica di mitocondri e di vescicole presinaptiche. Con le frecce i punti attivi; 21 gg. di coltura.