
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALBERTO STEFANELLI, EMILIA CATALDI, LUISANNA
IERADI

Sinapsi dendro-dendritiche ed altre sinapsi in sferule riaggregate e coltivate in vitro di bulbi olfattori di embrione di pollo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 61 (1976), n.6, p. 653–660.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_61_6_653_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 dendro-dendritiche ed altre sinapsi in sferule riaggregate e coltivate in vitro di bulbi olfattori di embrione di pollo* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, EMILIA CATALDI e LUISANNA IERADI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Well differentiated neurons and glial cells are visible within globular structures of about 200 μ diameter, obtained from a aggregation of disaggregated olfactory bulbs of chicken embryos, 10 days' incubation old, and cultivated in the "rotating shaker" for 20 days. Particularly recognizable are mitral cells and granule cells (amacrine). Electron microscopy reveals different kinds of synaptic profiles: axo-dendritic, axo-somatic and dendro-dendritic. Of particular interest is the finding in the cultivated globules of this last type of synapse between mitral cell dendrites and dendrites of the granule cell, because it is clearly evident that this type of synapse is not produced here by any excitement derived from peripheric input (from *fila olfactoria*) in this case completely lacking, as it is proposed by physiological works, but is the expression of an intrinsic capability of the coupled neurons, acquired at the moment of the specific hystogenetic determination at an embryonal stage, earlier than the stage of disaggregation. Many peculiar morphological data of these dendro-dendritic synapses are described and discussed.

Abbiamo dimostrato (questi « Rendiconti » 1975, vol. LIX), come in sferule riaggregate di cervelletto di embrione di pollo di 10 gg, coltivate *in vitro* per circa 20 gg in « rotating shaker », si formino specifiche sinapsi quali i « glomeruli » e le sinapsi « en marron », pur nella completa assenza di ogni afferenza extracerebellare, quale quella rappresentata dalla fibre muschiose e rampicanti. Negli aggregati si sono formati « glomeruli » tipici tra i dendriti delle cellule granulari e fibre di origine « locale » di natura sicuramente diversa dalle fibre muschiose e sinapsi *en marron* tra pirenofori di cellule di Golgi e fibre che non sono certamente collaterali di fibre rampicanti, come si verifica nell'organo integro. Siamo così giunti alla conclusione che questi tipici modelli sinaptici sono determinati dal neurone ricevente, mentre non appare manifesta alcuna azione del neurone afferente.

Questi risultati ci hanno spinto ad una estensione delle ricerche per definire se questo comportamento possa essere considerato generale e per saggiare le intrinseche capacità sinaptogeniche di neuroni isolati.

L'attuale indagine è stata rivolta alle sinapsi dei bulbi olfattori che si formano sia nei glomeruli olfattori tra i dendriti delle cellule mitrali e a pennacchio e la *fila olfactoria* e i neuroni interglomerulari, sia tra le cellule mitrali e le cellule granulari e a neurite breve dello strato plessiforme esterno. Abbiamo

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

(**) Nella seduta dell'11 dicembre 1976.

usato come materiale embrioni di pollo, sia per la nostra maggior esperienza di coltura di questo materiale, sia soprattutto per essere i rapporti nervosi nei bulbi olfattori degli uccelli più semplici di quelli dei mammiferi e quindi di più facile interpretazione. Anche in questo caso l'esperienza è consistita nel far differenziare i neuroni olfattori in condizione di isolamento, privi di ogni afferenza periferica (*fila olfactoria*) e centrale (dal tratto e lobo). Come nelle precedenti ricerche ricordate, si è operato disgregando i bulbi olfattori di embrioni di 10 gg con tripsina e agitazione meccanica, secondo la tecnica di Moscona, e coltivando poi la sospensione di cellule in fiaschette di Erlenmeyer in *rotating shaker* (70-90 rpm), alla temperatura di 37°, per circa 20 gg. Dopo tale periodo le cellule risultano riaggregate in sferule di circa 200 μ di diametro (Tav. II). Queste sferule rappresentano dei microsistemi isolati di neuroni di bulbo olfattorio, privi di ogni afferenza sia centrale che periferica. Di queste sferule sono stati allestiti preparati, sia per la osservazione al microscopio ottico (fissaggio in Bouin, colorazione con tionina e col metodo di Bodian), sia all'elettronico (fissaggio in gluteraldeide e inclusione in metacrilato).

Nelle singole sferule sono risultati differenziati vari tipi cellulari: cellule di nevroglia, qualche cellula endoteliale (di origine vascolare), vari neuroni tra cui, riconoscibili per le dimensioni notevoli e per i grossi dendriti, le cellule mitrali (cM) e a pennacchio (cP) oltre ad altri piccoli neuroni, quali neuroni periglomerulari (cPG) e ad assone breve (cAB) ed altri, che per i tipici rapporti sinaptici che ora diremo, sono da considerarsi cellule granulari (cG), amacrine. Si osservano inoltre moltissime sezioni di prolungamenti riferibili ad assoni (che non appaiono mai mielinizzati) ricchi di neurotubuli e neurofilamenti, a dendriti con reticolo endoplasmico, con ribosomi e con mitocondri, a fibre gliali con vaste aree ricche di gliofilamenti, infine a profili sinaptici di varia natura terminali e « an passant ». Questi elementi, pur distribuiti casualmente, hanno una diversa densità nell'ambito delle sferule così da far apparire evidenti tre zone concentriche (fig. 7, Tav. II): una periferica, ricca di cellule piccole, prevalentemente gliali e endoteliali, una centrale con i pirenofori più grossi ed una intermedia scarsa di cellule e ricca di prolungamenti gliali e nervosi. Nella zona centrale, tra le cellule si osservano aree di tipo neuropilare in cui appare il maggior addensamento di profili sinaptici.

Nelle sferule non compare alcuna struttura paragonabile ai glomeruli olfattori; ciò è del tutto comprensibile essendo mancante il cospicuo apporto materiale rappresentato dalle *fila olfactoria*.

Nei profili sinaptici si osservano, con varia densità, da fittissime a rade, le vescicole presinaptiche elettrolucenti, sempre sferiche; in varie sedi si notano anche vescicole di maggiori dimensioni, con centro opaco di tipo catecolaminico.

Per poter fare una valutazione sulla natura delle sinapsi e dei sistemi sinaptici che si formano in queste condizioni di isolamento, crediamo utile il confronto degli schemi dei rapporti sinaptici nel bulbo integro (fig. 1 A) e di quelli osservati e sospettabili nelle sferule (fig. 1 B). È opportuno anche ricordare come vi sia un notevole parallelismo di struttura tra il bulbo olfat-

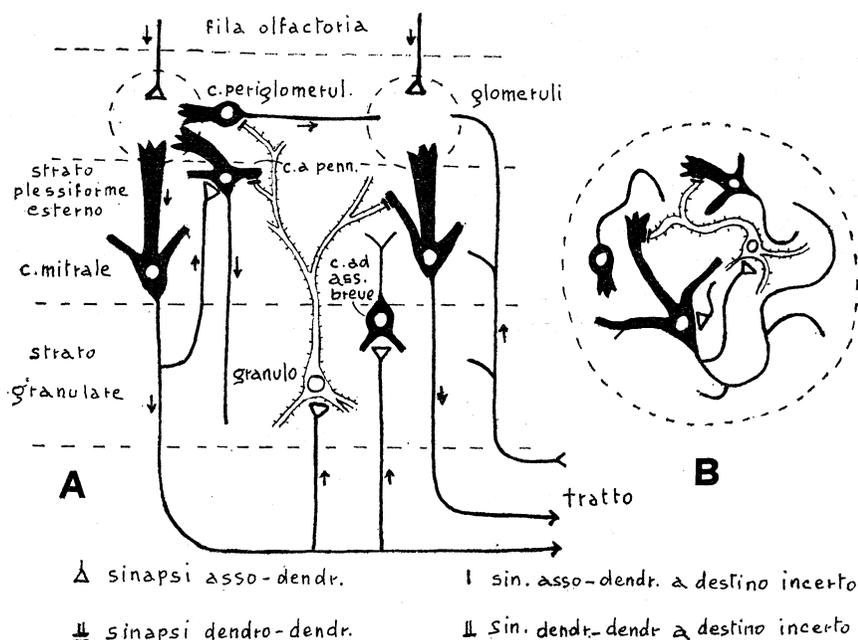


Fig. 1.

torio e la retina. Come nella retina esistono cellule amacrine che collegano i neuroni del ganglio cerebrale con sinapsi dendro-dendritiche (*d-d*), così nel bulbo i granuli, pure amacrine, collegano con sinapsi *d-d* le cellule mitrali. Altro parallelismo è quello delle cellule orizzontali della retina che collegano le cellule bipolari e quello delle cellule periglomerulari che collegano i dendriti delle cellule mitrali e a pennacchio di glomeruli diversi. La fig. 2, desunta da

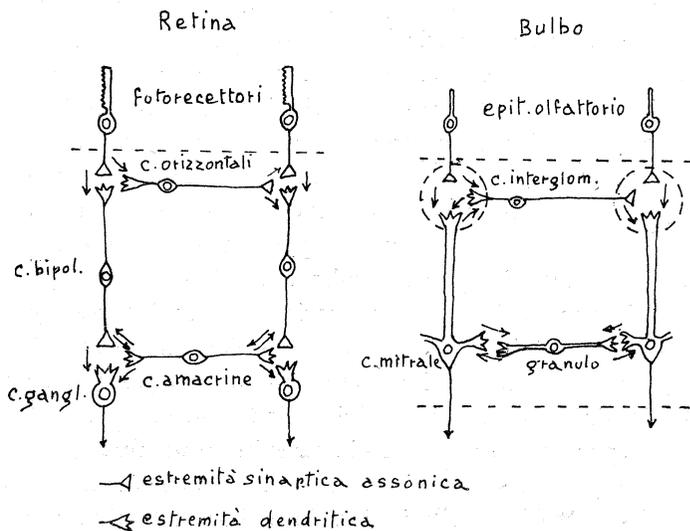


Fig. 2.

Shepherd (1970), mostra schematicamente questo parallelismo e la posizione delle sinapsi *d-d* (frecche opposte).

Le sinapsi *d-d* sono state descritte da Andres (1965), da Rall, Shepherd e Reese (1966), da Price e Powell (1970) da Ralston (1971) e da Ramon-Moliner (1973, 1975).

Lieberman (1972) descrive sinapsi *d-d* nei nuclei talamici e Morest (1971) ne descrive anche a carico di neuroni tipici con assone.

Sono stati descritti due modelli di sinapsi *d-d*: 1) *single*, ad una direzione; 2) *doppie* affiancate con direzione opposta, dette «reciproche». (Hirata, 1964, Andres, 1965). Le sinapsi singole sono a loro volta di due tipi (fig. 3: 1 a e b):

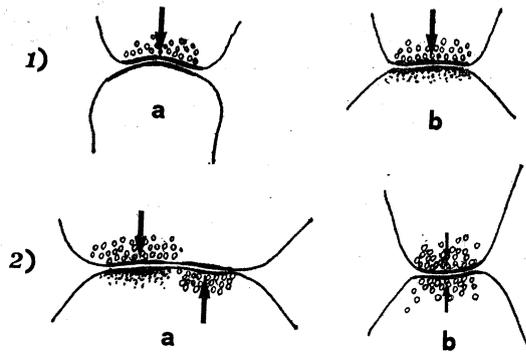


Fig. 3.

simmetriche (Colonnier, 1968) o di II tipo secondo Gray (1959), con membrane pre- e post-sinaptiche leggermente ispessite in modo eguale e senza materiale postsinaptico; *asimmetriche* (o di I tipo di Gray) con membrana post-sinaptica più ispessita e munita di materiale post-sinaptico (*synaptic webb* o *synaptic fuzz*). Nelle sinapsi reciproche con polarità opposta (fig. 3: 2 a), una è di tipo simmetrico ed una di tipo asimmetrico. Abbiamo potuto osservare sinapsi doppie reciproche nei preparati di controllo, ma abbiamo anche osservato sinapsi reciproche, con vescicole da entrambi i lati, singole (Tav. I e Tavv. III e IV), classificabili come «reciproca singola» (fig. 3: 2 b). Questo tipo sinaptico è stato reperito in diversi esempi nella zona neuropilare dei nostri riaggregati. Esso può essere interpretato come uno stadio più primitivo di sinapsi reciproca o come una sezione obliqua di una coppia reciproca tipica, probabilmente con punti attivi a polarità opposta molto ravvicinati.

Sinapsi reciproche nel bulbo olfattorio di uccelli (*Phylomachus pugnax*) sono state già descritte da Andres (1970) tra dendriti delle cellule mitrali e di cellule granulari, notando inoltre nel terminale del granulo anche vescicole di tipo catecolaminico, più grandi delle elettrolucenti e con centro opaco. Pertanto la presenza di queste vescicole sarebbe indicativa della parte granulare; essendo presenti queste vescicole a centro opaco anche nelle sinapsi dei nostri aggregati si potrebbe attribuire il valore di granulo al lato che le contiene (Tavv. IV e V).

Il significato di queste particolari articolazioni sinaptiche è stato supposto, per il bulbo olfattorio, per la costituzione di un circuito ricorrente ad azione retroattiva (*feed back*), inibitrice delle cellule mitrali (Rall *et al.* 1966; Rall e Shepherd, 1968; Reese e Brightman 1970). Secondo McLeod (1971) il sistema *d-d* del bulbo olfattorio avrebbe una doppia azione: di autoinibizione dell'*input* mitrale con la conseguente limitazione della frequenza degli eccitamenti (così che l'*output* diventa relativamente indipendente dall'*input*); di inibizione reciproca delle cellule mitrali vicine, così da aumentare il contrasto tra le canalizzazioni adiacenti (secondo lo schema sostenuto da Hartline Wagner e Ratliff (1956) per la visione). Una inibizione laterale è anche provocata a livello glomerulare con sinapsi *d-d* con le cellule interglomerulari. Secondo Rall e Coll. (1966) le sinapsi *d-d* mitrale-granulo sarebbero eccitatrici e sono asimmetriche e caratterizzate da un *fuzz* postsinaptico, mentre le sinapsi granulo-mitrali sarebbero inibitrici e sono simmetriche e prive di *fuzz*. È stata considerata anche una differenza, tuttavia non generalizzabile, nelle forme delle vescicole: tonde nelle eccitatrici, ovali nelle inibitrici. Secondo E. L. Withe (1972) le sinapsi di tipo doppio reciproco sarebbero tipiche tra cellule che ricevono *input* periferico (quali le cellule mitrali e a pennacchio e interglomerulari), mentre le sinapsi semplici sarebbero tipiche tra dendriti di neuroni che non ricevono *input* periferico (quali le cellule granulari). Tuttavia Hinds (1970) trova entrambi i tipi tra neuroni con *input* periferico; secondo Reese e Shepherd (1973) le sinapsi reciproche mancano tra neuroni che non ricevono entrambi *input* periferico.

Da questi dati si potrebbe trarre la conclusione che la elaborazione delle vescicole presinaptiche nei dendriti, e quindi la doppia attività recettoria e trasmettitrice di questi, così come il modello sinaptico, sia la conseguenza della attività funzionale determinata dall'*input* periferico, ma i tipi sinaptici da noi osservati nelle nostre sferule, assolutamente isolate da ogni *input*, ci convincono a modificare questa conclusione. Nella seguente Tabella I sono succintamente indicati i tipi o modelli sinaptici da noi osservati in bulbi olfattori integri e in sferule riaggregate della stessa età (vedi nelle pagine precedenti il significato delle abbreviazioni).

Nelle sferule riaggregate non abbiamo mai trovato strutture che possano essere interpretate come glomeruli olfattori. Questo fatto non contraddice i precedenti nostri risultati sulle sinapsi cerebellari che hanno definito il non valore della afferenza sulla determinazione del modello sinaptico, poiché il significato morfologico dei glomeruli olfattori è molto diverso da quello dei glomeruli cerebellari: infatti mentre questi sono strutture di pochi μ , formate da una sola fibra afferente centrale, varicosa, detta « rosetta », « agganciata » dai dendriti a pinza di una cellula granulare, il glomerulo olfattorio è una struttura molto più grande, di qualche centinaio di μ , formata da un cospicuo fascio di un centinaio di fibre afferenti (*fila olfactoria*) che si sinaptano (negli Uccelli) con un grosso dendrite di una cellula mitrale e con dendriti di cellule a pennacchio. È pertanto ovvio che in assenza di tanto materiale afferente la struttura non possa essere edificata.

TABELLA I

Sede	Tipo sinaptico (*)	Elementi articolati	
IN BULBO OLFATTORIO INTEGRO (pulcini di 20 gg): nei glomeruli	<i>a-d</i> terminale o «en passant»	f. olfatt. → cM, cP	
	<i>d-d</i> doppia reciproca	cPG ↔ cM, cP	
	nello strato pless. esterno .	<i>a-d</i>	aff. centr. → cM, cP
		<i>d-d</i> simmetrica	coll. ass. M → cG, cAB cM ↔ cG
IN SFERULE RIAGGREGATE (embrione di 11 gg + 20 di coltura)	<i>a-d</i>	cM, cP, cPG → cG e altre	
	<i>d-d</i> semplice simmetrica	cM ↔ cG	
	<i>d-d</i> doppia o sempl. reciproca	cM ↔ cPG	
	<i>d-s</i>	cG → cM, cP	

(*) *a-d* asso-dendritico; *d-d* dendro-dendritico; *d-s* dendro-somatico.

Molto importante è invece, ai fini della nostra indagine, la presenza negli aggregati di sinapsi *d-d*, sia semplici che reciproche. Il concetto di Reese e Shepherd che le sinapsi *d-d* reciproche si possano formare solo tra neuroni che ricevono entrambi un *input* non è applicabile nelle nostre condizioni di isolamento. Nei nostri aggregati, pur in assenza di qualsiasi *input* centrale o periferico, si formano sinapsi reciproche *d-d*. Questo dimostra come la specificità geneticamente fissata al momento della determinazione istogenetica si estrinsechi non solo nelle dimensioni e nella forma del pirenoforo e dei prolungamenti dendritici e neuritici, ma anche nelle capacità di una sinaptogenesi secondo un modello altamente specifico.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRES K.M. (1965) - *Der Feinbau der Bulbus olfactorius der Ratte unter besonderer Berücksichtigung der synaptischen verbindungen*, «Z. Zellf.», 65, 530-561.
- ANDRES K.H. (1970) - *Anatomy and ultrastructure of the olfactory bulb in Fish, Amphibia, Reptiles, Birds und Mammals*. In «Taste und smell in Vertebrates», Ciba Found. Symp. Churchill, London.
- COLONNIER M. (1968) - *Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex*, «Brain Res», 9, 268-287.

- GRAY E. G. (1959) - *Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex*, « J. Anat. », 93, 420-433.
- HARTLINE H. K., WAGNER H. G. e RATLIFF F. (1956) - *Inhibitions in the eye of Limulus*, « J. gen. Physiol. », 39, 651-673.
- HINDS J. W. (1970) - *Reciprocal and serial dendro-dendritic synapses in the glomerular layer of the rat olfactory bulb*, « Brain Res. », 17, 530-534.
- HIRATA Y. (1964) - *Some observations on the fine structure of the synapses in the olfactory bulb with particular reference to atypical synaptic configurations*, « Arch. Histol Jap. », 24, 293-302.
- LIEBERMAN A. R. (1972) - *Presynaptic dendrites and a distinctive class of synaptic vesicle*, « Brain Res. », 42, 196-200.
- MACLEOD P. (1971) - *Structure and function of the higher olfactory centers*. In: « Olfaction », Ed. Lloid M. Beidler. Springer-Verlag, Berlino.
- MOREST D. K. (1971) - *Dendrodendritic synapses of cells that have axons*, « Z. Anat. Entw. », 133, 216-246.
- PRICE J. L. e POWELL T. P. S. (1970) - *The synaptology of the granule cells of olfactory bulb*, « J. Cell. Sc. », 7, 125-155.
- RALL W. e SHEPHERD G.M. e REESE T.S. e BRIGHTMAN M. W. (1966) - *Dendro-dendritic synaptic pathways for inhibition in the olfactory bulb*, « Exper. neurol », 14, 44-56.
- RALL W. e SHEPHERD G.M. (1968) - *Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interconnections in olfactory bulb*, « J. Neurophysiol. », 31, 884-915.
- RAMÓN-MOLINER E. (1973) - *Presynaptic pericaria in olfactory bulb of guinea pig*, « Brain Res. », 63, 351-356.
- RAMÓN-MOLINER E. (1975) - *Can dendrites be presynaptic?* In: « Advances in Neurology », Vol. 12, Ed. Kreutzberg Raven Press. N.Y.
- RALSTON H. J. (1971) - *Evidence for presynaptic dendrites and proposal for their mechanism of action*, « Nature », 230, 585-587.
- REESE T.S. e SHEPHERD G.M. (1972) - *Dendro-dendritic synapses in the central nervous system*. In: « Structure and function of Synapse », Ed. D. Pappas e D. P. Purpura. Raven N. Y.
- SHEPHERD G.M. (1970) - *The olfactory bulb as a simple cortical system: experimental analysis and functional implications*. In: « Neuroscience », Vol. II. The Rockefeller Univ. Press.
- SHEPHERD G.M. (1974) - *The synaptic organization of the brain*, Oxford Univ. Press.
- SMITH C. A. e SJOSTRAND F. S. (1961) - *Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections*, « J. Ultrastruct. Res. », 5, 523-556.
- STEFANELLI A., CATALDI E. e IERADI L. A. (1976) - *Sinapsi interneuroniche in aggregati di cellule cerebellari di embrione di pollo in coltura*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 59, 831-834.
- WHITE E. L. (1972) - *Synaptic organization in the olfactory glomerulus of the mouse*, « Brain Res. », 37, 69-80.
- WHITE E. L. (1973) - *Synaptic organization of the mammalian olfactory glomerulus: New finding including an intraspecific variation*, « Brain Res. », 60, 299-313.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-V

TAVOLA I

- Fig. 1. - Sezione trasversa di bulbo olfattorio di embrione di pollo di 11 giorni di incubazione.
- Fig. 2. - Sezione di parte di bulbo olfattorio di pulcino di 10 giorni dalla schiusa. gl strato dei glomeruli olfattori, M strato delle cellule mitrali. Barra 100 μ .
- Fig. 3. - Sinapsi dendro-dendritica (d) reciproca, presumibilmente tra cellula mitrale e cellule periglomerulare in bulbo olfattorio integro di pulcino di 10 giorni. Barra = 100 μ .

TAVOLA II

- Fig. 4. - Stato di disgregazione di bulbo olfattorio di embrione di pollo di 10 giorni di incubazione.
- Fig. 5. - Globuli aggregati dopo 20 giorni di coltura in *rotating shaker*.
- Fig. 6. - Sezioni istologiche di alcuni globuli colorate con tionina.
- Fig. 7. - Sezione di un globulo mostrante la topografia delle cellule. Barre = 100 μ .

TAVOLA III

- Fig. 8. - Sinapsi dendro-somatiche col pirenoforo di una cellula mitrale (M) in sferula riaggregata dopo 21 giorni di coltura; i dendriti sono delle cellule granulari (dG). Con frecce grosse sono indicate le sinapsi dendro-somatiche e con freccia sottile una sinapsi asso-dendritica simmetrica (a, d). Con g è indicata la glia. Barra = 100 μ .

TAVOLA IV

- Fig. 9. - Sinapsi in un globulo riaggregato dopo 21 giorni di coltura. Con la doppia freccia è indicata una sinapsi dendro-dendritica. Barra = 100 μ .

TAVOLA V

- Fig. 10. - Sinapsi in una sferula riaggregata dopo 21 giorni di coltura. Sono visibili con doppia freccia sinapsi dendro-dendritiche (d, d); G cellule granulare, n suo nucleo; g glia. Barra = 100 μ .

