
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ALBERTO STEFANELLI, ANNAMARIA ZACCHEI, EMILIA
CATALDI, LUISANNA IERADI

**Modelli sinaptici in aggregati retinici di embrioni di
pollo coltivati in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.5, p. 206–212.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_5_206_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_5_206_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. — *Modelli sinaptici in aggregati retinici di embrioni di pollo coltivati in vitro* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, ANNAMARIA ZACCHEI, EMILIA CATALDI e LUISANNA IERADI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The cells of the retina of chick embryo at the 4th day of incubation were isolated by the trypsin disgregation technique. These cells were let reaggregate into spherules (about 200 μ diam.) and then cultivated in vitro for up to 25 days.

By means of the electron-microscope the synapses were studied. The result is that the *synaptic ribbons* of photoreceptors and of the bipolar cells are specific structures, intrinsically determined in the early embryo, related to the modality of release of the chemical mediator, independently of any reconstruction of the specific synaptic model, termed *dyad* by Dowling (1966). On the contrary, the topographic orientation of the ribbons, along the bisetrix of the diedric prominence of the presynaptic terminal, appears to be related to the normal organization, as dyads, of the receiving buds (horizontal and bipolar cells or amacrine and gangliar cells). In fact in the reaggregated spherules a dyad model is never achieved and the ribbons are randomly distributed and frequently far from the cellular membrane. This fact means also that in the reaggregated spherules specific orientative forces on nerve terminals are absent.

Con osservazioni al microscopio elettronico di riaggregati di alcune regioni encefaliche di embrioni di pollo (1966, 1967), abbiamo portato un contributo favorevole al concetto che il « modello » sinaptico dei casi da noi studiati sia determinato dal neurone ricevente. Tale è il caso dei « glomeruli » cerebellari che risultano determinati dai dendriti « a pinza » delle cellule granulari capaci di far assumere l'aspetto di fibre muschiose anche a fibre estranee che casualmente vengono a loro contatto; tale è il caso delle campanule di Held che si formano a carico di fibre afferenti, anche di natura non radicolare che vengono a contatto con le cellule dei centri cocleari. Anche la formazione in sferule riaggregate di materiale dei bulbi olfattori di sinapsi dendro-dendritiche porta ad escludere in questa sinaptogenesi così specifica ogni influenza periferica specifica come si dedurrebbe dai lavori di E. L. White (1972) e di Reese e Shepherd (1973).

In precedenti esperienze avevamo ottenuto in riaggregati di retina di embrioni di pollo (disgregati al 4° giorno di incubazione e coltivati sino a 25 giorni) la differenziazione di fotorecettori e la formazione nel polo efferente di queste cellule, di *synaptic ribbons*, o barre sinaptiche, caratteristiche strutture elettrodense sulla cui superficie sono regolarmente disposte le vescicole sinaptiche (1966, 1967).

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta del 10 novembre 1978.

Secondo le ricerche più recenti (vedi il Capitolo IV del libro « Synapses », edito da Cottrell e Usher Wood, scritto da Osborne, 1977) i *synaptic ribbons*, scoperti da Sjöstrand nel 1955, sarebbero l'espressione di vescicole collassate e appiattite, vescicole che conservano la loro forma primitiva in diversi casi, come nei recettori cocleari (Smith 1961), nei fotorecettori pineali di Anfibi (Kelly 1964) e nei neuromasti vestibolari (Flock 1964) e della linea laterale (Trujillo, Cenoz 1961). Come hanno osservato Kidd (1960) e Dowling e Boycott (1961) i *synaptic ribbons* si trovano anche nello strato plessiforme interno della retina.

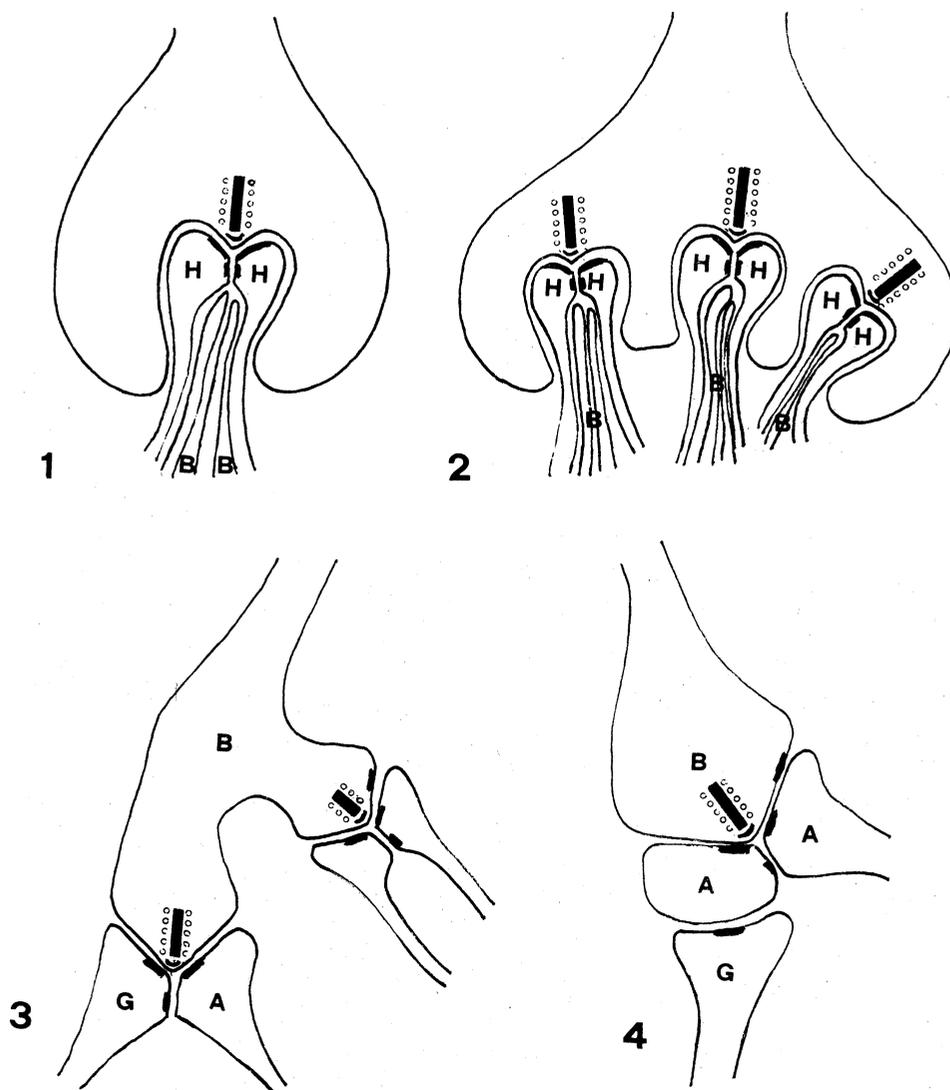


Fig. 1. — Modelli di sinapsi retiniche: 1 « sferula » di bastoncello con una unità sinaptica (diade); 2 « pedice » di cono con tre unità sinaptiche; 3, 4 sinapsi dello strato plessiforme interno. A cellule amacrine, B bipolari, G ganglionare, H orizzontale.

I « ribbons » retinici sono associati a « modelli » sinaptici estremamente peculiari. Infatti l'articolazione sinaptica, sia nello strato plessiforme esterno che in quello interno non avviene tra un neurone afferente ed *uno* efferente, ma tra un afferente e *due* riceventi contemporaneamente cioè, come hanno definito Dowling e Boycott, con una *diade* ricevente (fig. 1).

Nello strato plessiforme esterno le sinapsi dei coni e dei bastoncelli differiscono fundamentalmente per il numero delle unità sinaptiche o diadi: una o due nella « sferula » apicale dei bastoncelli, espansione bulbosa terminale; numerose diadi nella espansione bulbosa terminale dei coni, detta *pedicle* o « pedicello ».

Ogni unità o diade è formata da due fibre di natura dendritica delle cellule orizzontali (H), disposte a contatto con la membrana presinaptica della prominenza apicale nell'interno della sferula, tra loro unite da un desmosoma, e da una o due estremità dendritiche delle cellule bipolari (B) che rimangono inguainate tra i terminali delle orizzontali senza venire a diretto contatto con la membrana presinaptica del fotorecettore (fig. 1.1). Tra la prominenza

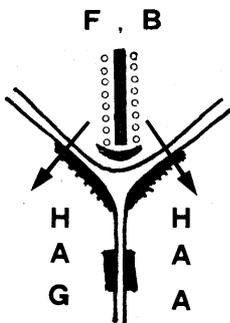


Fig. 2. - Schema di diade sinaptica e del « synaptic ribbon ». F. fotorecettore (altre lettere come figura precedente).

diedrica del trasmittente e i due terminali delle orizzontali rimane uno spazio intersinaptico dal profilo a forma di stella a tre punte con angoli quindi di circa 120 gradi. Il *synaptic ribbon* si viene sempre a trovare lungo la bisettrice del promontorio diedrico dell'elemento afferente separato dalla membrana presinaptica da un « corpo denso » di aspetto, in sezione, arciforme. La fig. 2 schematizza questo profilo sinaptico caratteristico ⁽¹⁾.

Nei coni le unità sinaptiche, le diadi, sono del tutto simili a quelle dei bastoncelli, ma sono più numerose, separate le une dalle altre da ripiegamenti della membrana presinaptica.

(1) Con osservazioni sulle Razze (*Raja erinacea* e *R. ocellata*) Dowling ha potuto osservare che nei bastoncelli, gli unici fotorecettori retinici di questi animali, vi sono nelle sferule più diadi, similmente ai coni di altri animali. Ha anche potuto distinguere due tipi di cellule bipolari, B₁ e B₂, le prime con terminali che non raggiungono la membrana presinaptica e le seconde che la raggiungono.

Le sinapsi dello strato plessiforme interno sono anch'esse costituite da unità simili, ma con la differenza che i due elementi riceventi possono essere dello stesso tipo (delle cellule amacrine) o di tipo diverso (uno delle cellule amacrine (A) ed uno delle cellule ganglionari (B)) (Dowling e Boycott 1960, Dowling 1968, Allen 1969, Kolb 1970, Cohen 1972). Anche in queste sinapsi il *synaptic ribbon* è situato lungo la bisettrice della prominenza diedrica del terminale trasmittente delle cellule bipolari (B).

Il problema è se questo modello sinaptico (raffigurato nella fig. 2) sia determinato dai terminali riceventi in coppia, siano essi eguali (H, H oppure A, A) o diversi (A, G), e se il *ribbon* sia provocato o indotto da questo peculiare tipo di unione a triade (un apicale trasmittente e due apicali riceventi).

Con la tecnica da noi applicata, di disgregazione di retine embrionali prima di ogni differenziamento sinaptico e di successiva riaggregazione casuale delle cellule così separate, abbiamo messo insieme tutti gli elementi retinici per una possibile ricombinazione secondo un piano normale (senza volerci qui addentrare nella questione se questo possa avvenire solo per regolare fortuito incontro degli elementi o se intervengano anche fattori orientativi di qualsivoglia natura).

Una difficoltà nella interpretazione delle immagini elettroniche dei nostri aggregati è dovuta alla mancanza di una organizzazione sufficiente da permetterci di orientare in modo appropriato il globulo aggregato per il taglio. Le sezioni colpiscono pertanto le cellule secondo piani del tutto casuali. Così viene a mancare una possibilità topografica per il riconoscimento di alcuni tipi cellulari, riconoscimento che rimane possibile solo per i fotorecettori, quando sia presente materiale del raddomero, e per le cellule ganglionari per le loro notevoli dimensioni.

Come abbiamo già illustrato nelle precedenti note, si rinvennero in questi aggregati molte sinapsi e abbiamo potuto segnalare la presenza di *ribbons* anche in numero cospicuo in uno stesso terminale (fig. 3 desunta da fotografie elettroniche già pubblicate). Dalle presenti osservazioni non risulta mai realizzato il modello caratteristico descritto di diade pur essendo invece riconoscibili i *ribbons*. Tale situazione dimostra che per la formazione di queste ultime strutture non è necessaria la realizzazione del modello a diade e che quindi la formazione dei *ribbons* è dovuta alla intrinseca capacità della cellula a formarli indipendentemente dalla realizzazione del modello di articolazione sinaptica con riceventi accoppiati. La presenza di *ribbons* plurimi, orientati in qualche caso normali rispetto alla superficie cellulare, ma più spesso senza alcun riferimento con questa, o addirittura lontano da questa, dimostra che per l'orientamento dei *ribbons* occorre invece la realizzazione della diade. Una conferma di ciò ci è data dalle osservazioni di Caravita e Cataldi (1975) su intere vescicole ottiche di embrione di rana (prelevate allo stadio 19, inizio neurula) e coltivate in vitro: qui, dove la compagine strutturale non è stata alterata si formano diadi tipiche. Pertanto possiamo affermare che la forma-

zione dei *ribbons* è relativa alla specifica modalità di rilascio del mediatore chimico indipendentemente dalla realizzazione di un specifico modello sinaptico e che invece l'orientamento dei *ribbons* è determinato dalla realizzazione della diade ricevente.

Segnaliamo per inciso che nei nostri aggregati sono osservabili anche profili sinaptici riferibili al tipo « *basal junction* » (descritto da Lasanskj (1977) in *Ambystoma*) caratteristici per la scarsità di vescicole contro la membrana presinaptica.

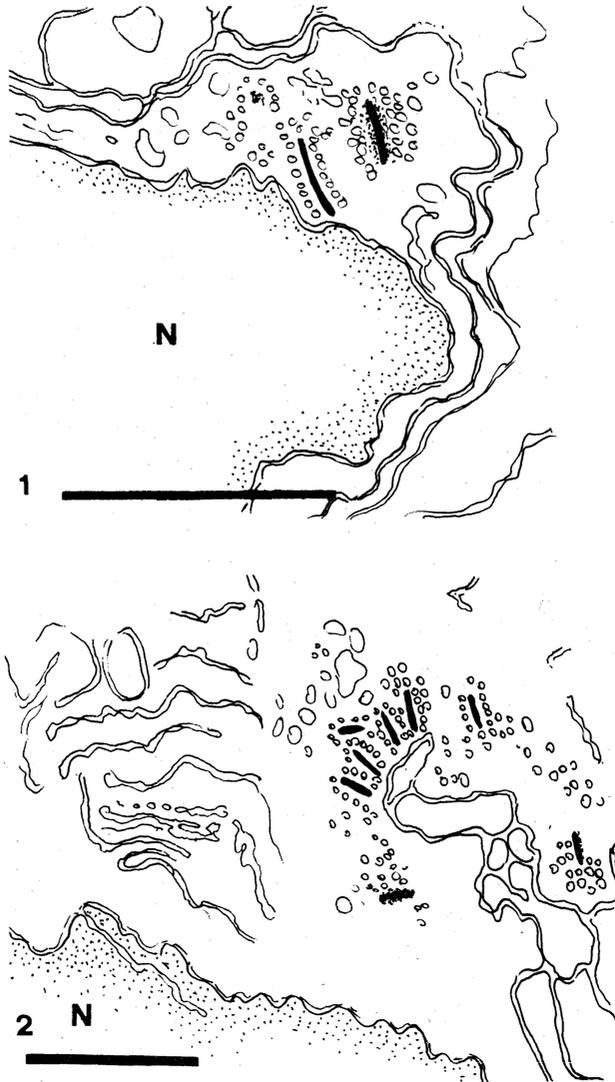


Fig. 3. - Profili sinaptici ridisegnati da fotografie già pubblicate (questi « Rendiconti » vol. XL « Arch. Zool. It. », vol. LI). Notare la tendenza al parallelismo dei *ribbons* e in molti casi il mancato rapporto con la membrana cellulare. N nucleo. Barra = 1 μ .

* * *

La conclusione che si può trarre dalle presenti osservazioni, in riferimento al nostro problema sul valore del neurone ricevente nella determinazione del modello sinaptico, è che i *synaptic ribbons* non caratterizzano un modello sinaptico, quale è quello a diadi della retina, ma sono solo l'espressione della modalità di rilascio del mediatore chimico, acquisita al momento della determinazione istogenetica specifica, indipendentemente dalla realizzazione del « modello » sinaptico. Risulta invece che l'orientamento del *ribbon* è determinato dalla realizzazione della coppia ricevente, secondo il modello « a diade », localizzandosi questa struttura lungo la bisettrice della prominenza diedrica presinaptica. Risulta in fine che negli aggregati da noi realizzati non si manifestano fattori orientativi di sorta che favoriscano il regolare incontro dei terminali riceventi, sia relativi allo strato plessiforme esterno che interno, nella costituzione delle diadi. Non si sono infatti mai osservate né « sferule » riferibili ai bastoncelli, né « pedicles » riferibili ai coni, morfologicamente conformati.

BIBLIOGRAFIA

- CARAVITA S. e CATALDI E. (1975) - *Differentiation of photoreceptors in cultured optic vesicles from embryos of Rana esculenta*. « J. Embr. exper. Morphol. », 33, 664-645.
- DE ROBERTIS E. e FRANCHI C. M. (1956) - *Electron Microscopic observations on synaptic vesicles in synapses of the retinal rods and cones*, « J. Bioph. Bioch. Cytol. », 2, 307-318.
- DOWLING J. E. e BOYCOTT B. B. (1965) - *Neural connection of the retina: fine structure of the inner plexiform layer*. *Cold Spring Harb. Symp.* « Quant. Biol. », 30, 393-402.
- DOWLING J. E. (1968) - *Synaptic organization of the frog retina: an electron microscopic analysis comparing the retinas of frogs and primates*. « Proc. Roy. Soc. Biol. », 170, 205-227.
- DOWLING J. E. (1974) - *Synaptic arrangements in the vertebrate retina: the photoreceptors synapse*. Da « Synaptic transmission and neuronal interaction » ed: M V L Bennett Raven Press N. Y.
- DOWLING J. E. (1975) - *The Vertebrate retina*. Raven Press N. Y.
- FLOCK A. (1964) - *Structure of the macule utriculi with special reference to directional interplay of sensory responses as revealed by morphological polarization*. « J. Cell. Biol. », 22, 413-431.
- GRAY E. G. e PEASE H. (1971) - *On understanding the organization of retinal receptor synapses*. « Brain Res. », 25, 1-15.
- KIDD M. (1962) - *Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina in the cat and the pigeon*. « J. Anat. », 96, 179-187.
- KOLB H. (1970) - *Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of the Golgi-impregnated cells*. « Phil. Tans. R. Soc. London », B 258, 264.
- LADMAN A. J. (1958) - *The fine structure of the rod bipolar cell synapses in the retina of the albino rat*, « J. Bioph. Bioch. Cytol. », 4, 459.
- MISSOTTEN L. (1965) - *The ultrastructure of the retina*. Arscia Uitgaven Brussels.
- LASANSKY A. (1977) - *Synaptic organization of retina receptors*. In: « Vertebrate photoreception », Ed. H. B. Barlov « Ac. Press ».
- OSBORNE M. P. (1977) - *Role of vesicles with some observations on vertebrate sensory cells*. In: « Synapses », Ed. G. A. Cottrell e P. R. User Woods Blackie London.
- RODIECK R. W. (1973) - *Vertebrate retina*. Freeman e Co S. Francisco.

- SJÖSTRAND F. S. (1953) - *Ultrastructure of the retinal rod synapses of guinea pig eye*. « J. Appl. Physics », 24, 1422-1423.
- SHEPHERD G. M. (1974) - *The synaptic organization of the brain*. Oxford Univ. Press.
- SMITH C. (1961) - *Innervation patterns of the cochlea: the internal hair cells*, « Ann. Otol. Rhin. Laryng. », 70, 504-527.
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. (1966) - *Sinapsi in vitro da cellule disgregate di retina di embrione di pollo*. « Rend. Acc. Naz. Lincei », XL, 758-762.
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. (1966) - *Differenziamento in riaggregati di retina*. « Arch. Zool. Ital. », LI, 985-995.
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. (1967) - *Differenziamento di fotorecettori di pollo riaggregati e coltivati in vitro*. « Rend. Acc. Naz. Lincei », XLII, 594-597.
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. (1967) - *New forming retinal synapses in vitro*. « Experientia », 23, 199.
- STELL W. K. (1967) - *The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina* « Am. J. Anat. », 121, 401-000.
- STELL W. K. (1972) - *The morphological organization of the vertebrate retina* In: « Handbook of Sensory Physiology », Vol. VII/2, Ed. Fuortes M. G. Springer Verlag Berlin.
- TRUJILLO-CENOZ O. (1961) - *Electron microscope observation on chemo- and mechanoreceptor cells of fishes*. « Z. Self. Mikr. Anat. », 54, 654-676.
- WEST R. e DOWLING J. E. (1972) - *Synapses onto different morphological types of retinal ganglion cell*, « Science », 178, 510-512.

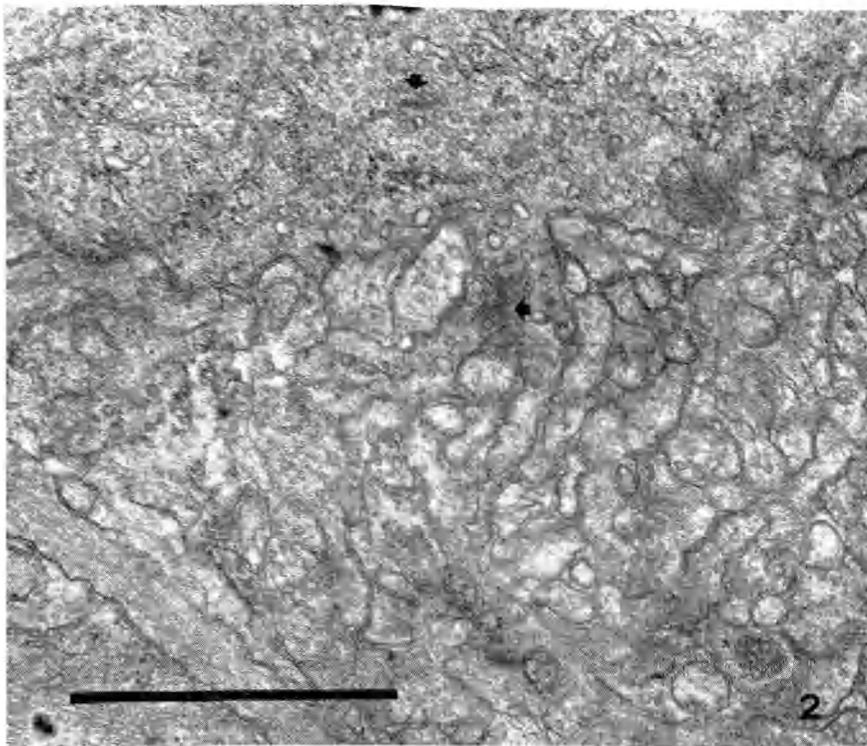
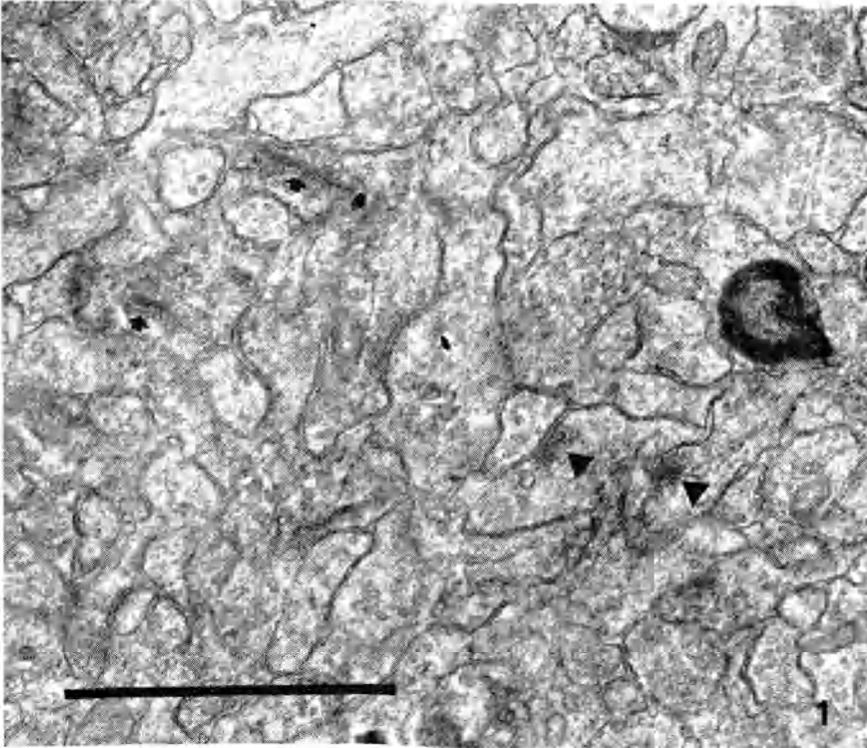


Foto elettroniche di riaggregati di retina di embrioni di 4 giorni e coltivati per 21 giorni. Notare le posizioni aberranti dei *ribbons* (freccie) e la mancata realizzazione di diadi. Barra = 1 μ .