

# **Università degli Studi di Padova**

**Dipartimento di Biologia**  
**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina**

**Ruolo delle reti mirabili spinali nella dinamica  
vascolare delle immersioni profonde negli zifidi  
(Ziphiidae)**

**Relatore**

Prof.ssa Carlotta Mazzoldi  
Dipartimento di Biologia

**Correlatori**

Prof. Bruno Cozzi  
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Dott. Marco Bonato  
Dipartimento di Biologia

**Laureanda**  
Camilla Benigno

ANNO ACCADEMICO 2016 - 2017



## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag. 5</b>
1.1 Inquadramento generale.....	pag. 5
1.2 I cetacei.....	pag. 6
1.2.1 Adattamenti al nuoto.....	pag. 7
1.2.2 Apparato scheletrico.....	pag. 8
1.2.3 Termoregolazione e osmoregolazione.....	pag. 11
1.2.4 Metabolismo energetico.....	pag. 14
1.2.5 Apparato respiratorio.....	pag. 15
1.2.6 Apparato cardiocircolatorio.....	pag. 20
1.3 Specie oggetto di studio: <i>Ziphius cavirostris</i> .....	pag. 25
1.3.1 Morfologia e identificazione.....	pag. 27
1.3.2 Ecologia e comportamento.....	pag. 28
1.3.3 Distribuzione e conservazione.....	pag. 29
1.3.4 Adattamenti anatomici e fisiologici.....	pag. 31
1.4 Obiettivo dello studio.....	pag. 35
<b>2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag. 36</b>
2.1 Campioni utilizzati.....	pag. 36
2.2 Preparazione dei campioni.....	pag. 37
2.3 Analisi istologica.....	pag. 37
2.4 Acquisizione delle immagini.....	pag. 39
2.5 Volume sanguigno della rete mirabile midollare.....	pag. 39
2.6 Elaborazione del foglio di calcolo Excel.....	pag. 43
2.6.1 Correlazione tra <i>heart rate</i> e <i>stroke volume</i> .....	pag. 44
2.6.2 Simulazione delle condizioni di superficie e d'immersione....	pag. 48
2.6.2.1 Calcolo dei volumi.....	pag. 49
2.6.2.2 Bilancio sanguigno.....	pag. 51
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>pag. 54</b>
3.1 Volume sanguigno della rete mirabile midollare.....	pag. 54
3.2 Distribuzione del sangue in superficie e in immersione.....	pag. 55
3.2.1 Calcolo dei volumi.....	pag. 55

3.2.2 Bilancio sanguigno.....	pag. 56
<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>pag. 64</b>
4.1 Volume sanguigno delle reti mirabili midollari.....	pag. 64
4.2 Bilancio emo-dinamico.....	pag. 65
4.3 Ulteriori adattamenti e prospettive future.....	pag. 70
4.4 Assunti e limiti dello studio.....	pag. 72
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag. 73</b>
<b>6. ALLEGATI.....</b>	<b>pag. 74</b>
6.1 La Banca Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo.....	pag. 74
6.2 Protocollo Ematossilina - Eosina.....	pag. 75
6.3 Tabelle dei valori relativi ai campioni di colonne vertebrali.....	pag. 77
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>pag. 81</b>
<b>8. SITOGRAFIA.....</b>	<b>pag. 89</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Inquadramento generale

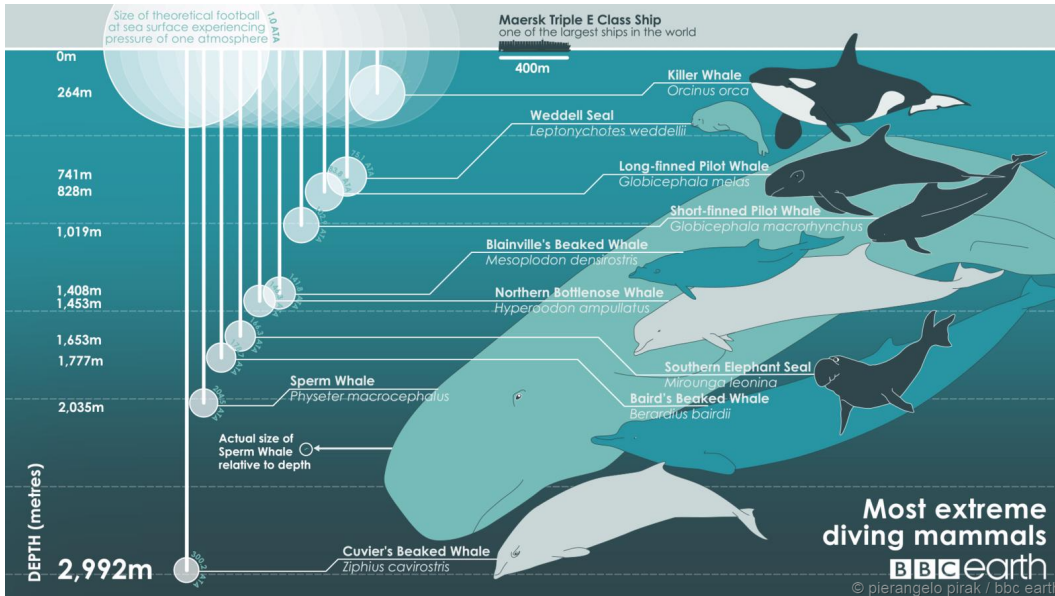
I mammiferi marini rappresentano il risultato di un processo evolutivo che ha permesso il ritorno di questi animali alla vita acquatica, dove la presenza di un'alta abbondanza di cibo, secondo Ponganis *et al.* (2003), sarebbe stata la principale causa di tale transizione. La sopravvivenza in mare è stata resa possibile grazie allo sviluppo di numerosi adattamenti fisiologici e anatomici.

La maggior parte di questi vertebrati vive in acque superficiali, limitandosi a brevi immersioni a basse profondità; al contrario, molte specie di uccelli e mammiferi spendono la maggior parte del loro tempo sott'acqua, esibendo comportamenti di foraggiamento, riproduttivi e sociali. Per gli animali polmonati l'adattamento alla vita subacquea presenta delle restrizioni, che Costa (2007) categorizza in due gruppi: l'effetto della pressione idrostatica, che aumenta in modo proporzionale alla profondità, e la mancanza di ossigeno associata all'apnea durante l'immersione.

Per contrastare o quantomeno limitare tali effetti, l'organismo di questi animali mette in atto dei meccanismi compensatori che permettono all'individuo di sopravvivere anche in condizioni estreme. Il loro funzionamento è stato oggetto di numerosi studi nel corso degli anni, tanto che attualmente si possiedono informazioni sufficienti sulla sequenza d'immersione dei delfinidi (Cozzi *et al.*, 2017).

Al contrario, vi è una forte carenza di dati sui cosiddetti *deep divers*, come l'elefante marino (genere *Mirounga*), il capodoglio (*Physeter macrocephalus*) e le specie appartenenti alla famiglia degli zifidi, in particolare lo zifio (*Ziphius cavirostris*), conosciuto per le elevate profondità che riesce a raggiungere in immersione e per i brevi e sporadici intervalli di superficie (Rommel *et al.*, 2006).

Tramite l'analisi istologica di reti mirabili di zifio presenti nella Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo dell'Università di Padova, il seguente studio si pone l'obiettivo di verificare se lo schema d'immersione dei delfinidi vale anche per questa specie o se vi siano altri meccanismi fisiologici che entrano in gioco, permettendo la sopravvivenza di questo animale.



**Figura 1.1** - Schema riassuntivo delle profondità raggiunte da alcune specie di mammiferi marini. Fonte: Pierangelo Pirak / BBC Earth, [www.bbc.com/earth/story/20150115-extreme-divers-defy-explanation](http://www.bbc.com/earth/story/20150115-extreme-divers-defy-explanation).

## 1.2 I cetacei

L'ordine Cetacea (dal greco κῆτος, “balena”) rappresenta il più grande gruppo di mammiferi marini attualmente esistenti, i quali si sono originati circa 50 milioni di anni fa nell'epoca dell'Eocene (Thewissen *et al.*, 2009), riadattandosi all'ambiente acquatico primordiale.

Sono caratterizzati da un corpo fusiforme, simile a quelli dei pesci, che conferisce loro una notevole idrodinamicità, riducendo l'attrito con l'acqua: questo rappresenta un ottimo esempio di convergenza evolutiva, in cui specie filogeneticamente diverse ma con stili di vita simili sviluppano le stesse strutture. Tuttavia, pur vivendo in un ambiente fatto d'acqua, essi presentano molte caratteristiche dei mammiferi terrestri, come una respirazione di tipo polmonare che non consente loro di ricavare l'ossigeno necessario direttamente dall'acqua, come invece avviene nelle branchie dei pesci tramite uno scambio controcorrente (Castro & Huber, 2010).

Per queste loro particolari caratteristiche sono da sempre stati oggetto di controversie e discussioni sulla loro classificazione. E' grazie ad Aristotele, il primo

storico naturalista del quale possediamo gli studi, che abbiamo una prima catalogazione: nella sua opera “*Historia Animalium*” egli distingue gli animali in “bloodless” (invertebrati) e “blooded” (vertebrati), inserendo in quest’ultimo gruppo anche i cetacei, riconoscendone le caratteristiche in comune con i mammiferi terrestri, quali la viviparità e la respirazione polmonare. Aristotele fu, quindi, il primo a considerare delfini e balene come un gruppo separato dai pesci (Romero, 2012).

Attualmente l’ordine dei cetacei comprende all’incirca 85 specie, suddivise in due sottordini: i mysticeti, che comprendono balene, balenottere e megattere, caratterizzati dalla presenza di fanoni per il filtraggio dell’acqua al posto dei denti, e gli odontoceti, come delfini, capodogli e orche, che presentano una vera e propria dentatura. Esiste anche un terzo sottordine, quello degli Archaeoceti, le cui specie sono ormai tutte estinte. Analisi genetiche hanno dimostrato come i cetacei siano filogeneticamente prossimi agli Artiodactyla, in particolare agli Hyppopotamidae; i due ordini sono stati riuniti insieme sotto il nome di Cetartiodactyla (Berta *et al.*, 2015).

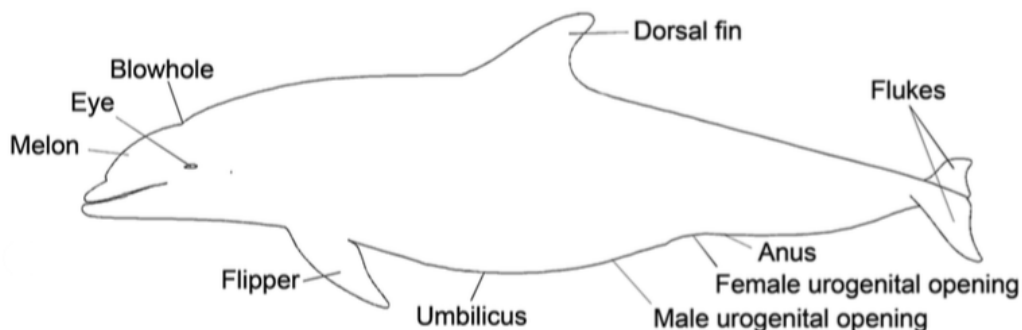
Nel corso dell’evoluzione questi animali sono stati in grado di adattarsi alle condizioni e ai limiti della vita in immersione, diventando così dei perfetti *freedivers*. Per permettere a questi mammiferi di sopravvivere al di sotto della superficie del mare si sono sviluppate delle caratteristiche anatomiche e fisiologiche che presentano un pattern comune per quanto riguarda l’adattamento all’immersione, sebbene alcuni di questi elementi varino in base alla specie (Berta *et al.*, 2015).

### **1.2.1 Adattamenti al nuoto**

Come già accennato nel paragrafo precedente, i cetacei hanno sviluppato una forma del corpo affusolata per contrastare la resistenza opposta dall’acqua che, in quanto liquido, presenta una densità maggiore di quella dell’aria:  $\rho_{H_2O} = 1 \text{ kg/L}$  (Schmidt-Nielsen, 1997).

Possiedono un paio di pinne pettorali, una pinna dorsale e una caudale (Figura 1.2). Le pinne pettorali, o *flippers*, derivano da modificazioni degli arti anteriori e sono

caratterizzate da un accorciamento di omero, radio e ulna e da cinque “dita” di diversa lunghezza, tra loro separate ma racchiuse all’interno di un tegumento che conferisce alla pinna una forma triangolare ed appiattita. La pinna dorsale è posta all’incirca a metà della lunghezza dell’animale, è costituita da tessuto connettivo e non ha omologhi fra gli animali terrestri in quanto conferisce stabilità al nuoto, funzione svolta anche dalle pinne pettorali. La pinna caudale è formata da due lobi orizzontali, detti *flukes*, responsabili della propulsione del nuoto e costituiti da tessuto connettivo. Contrariamente a quella dei pesci, la coda dei cetacei compie un movimento verticale consentendo lo spostamento di un maggior volume d’acqua e, quindi, un’elevata velocità di movimento. E’ analoga alla coda dei mammiferi terrestri e non deriva dalla fusione degli arti posteriori come erroneamente si credeva, in quanto non ha una base scheletrica. Nel corso dell’evoluzione, infatti, le appendici posteriori sono andate perse, sebbene siano ancora visibili durante la fase embrionale: queste non si sviluppano ulteriormente e nella fase adulta rimane solamente una coppia di ossa vestigiali (Slijper, 1979).



**Figura 1.2** - Morfologia esterna di un tursiope (*Tursiops truncatus*) (Rommel *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Apparato scheletrico

Gli studi sugli adattamenti dello scheletro dei cetacei sono stati i primi ad essere condotti grazie alle importanti scoperte di Slijper (1979).

Lo scheletro costituisce in media il 17% del peso corporeo e la sua funzione principale non è legata al sostegno del corpo bensì all’ancoraggio della



muscolatura. Pertanto le ossa risultano essere generalmente più leggere e spugnose rispetto a quelle dei mammiferi terrestri, in quanto servono per il mantenimento dell'assetto durante il nuoto (Slijper, 1979). Analisi istologiche su ossa di specie primitive hanno rivelato che la loro densità è legata alla profondità a cui l'animale vive: le specie superficiali sono caratterizzate da un'ossatura con un'alta densità, contrariamente a quelle di profondità che presentano una densità ossea minore (Gray *et al.*, 2007).

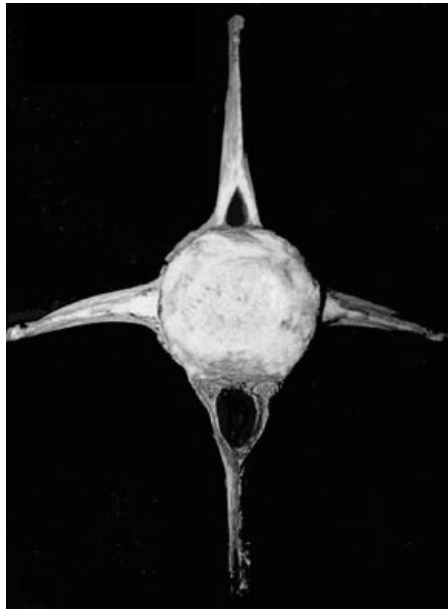
Il cranio ha subito una modificazione telescopica caratterizzata da un allungamento del rostro, che è collegato ad uno spazio di forma relativamente sferica, destinato all'alloggiamento delle strutture cerebrali oltre al melone e all'organo dello spermaceti nel capodoglio. Inoltre, presenta un'asimmetria dovuta alla posizione dello sfiatatoio, situato a sinistra rispetto all'asse centrale (Cozzi *et al.*, 2009). Si ipotizza che tale deviazione sia causata dalla posizione asimmetrica della laringe: più grande è l'asimmetria, maggiore è la dimensione della preda che viene inghiottita (MacLeod *et al.*, 2007).

La gabbia toracica presenta uno sterno di piccole dimensioni, al quale si attacca solo un numero ridotto di costole. Le restanti sono dette "false coste" che, non essendo ossificate, sono molto flessibili e accompagnano la riduzione volumetrica dei polmoni dovuta ai cambiamenti pressori legati alla profondità. A differenza dei pinnipedi, queste due caratteristiche non consentirebbero la sopravvivenza al di fuori dell'ambiente acquatico: sterno e costato, infatti, non sono sufficientemente robusti da sostenere il peso corporeo sulla terraferma. Questo è ciò che succede agli individui che si spiaggiano, non più sostenuti dall'acqua, fino alla riduzione della ventilazione polmonare e alla morte dell'animale per soffocamento (Castro & Huber, 2010).

Il collo dei cetacei è molto corto poiché le prime vertebre cervicali sono fuse fra loro (il numero è variabile in base alla specie) e questo causa una certa rigidità della testa che può compiere movimenti limitati rispetto al resto del corpo: ad esempio, in specie come il tursiopo (*Tursiops truncatus*) e l'inia (*Inia geoffrensis*) può formare un angolo di 45° al massimo in senso verticale e angoli minori in senso laterale (Slijper, 1979).

La morfologia delle vertebre è omogenea, sebbene sia possibile distinguere la sezione caudale da quella lombare grazie alla presenza di ossa associate alle

vertebre della coda e situate in posizione ventrale, sotto il corpo vertebrale: queste sono disposte a formare una V e racchiudono un canale, detto arco di Chevron o arco emale (Figura 1.3), la cui funzione è quella di contenere un sistema arterioso che permette l'irrorazione della coda (Rommel *et al.*, 2006).



**Figura 1.3** - Vertebra caudale di un cetaceo. Sono ben evidenti i due canali: neurale (sopra) ed emale (sotto).

Fonte: [www.atlanteanatcomp.unito.it](http://www.atlanteanatcomp.unito.it).

Un ulteriore adattamento alla vita acquatica è l'allungamento della zona lombare, alla quale si attaccano i muscoli della coda: l'aumento della superficie di ancoraggio, infatti, garantisce una maggiore potenza e, di conseguenza, una maggiore propulsione durante il nuoto (Slijper, 1979).

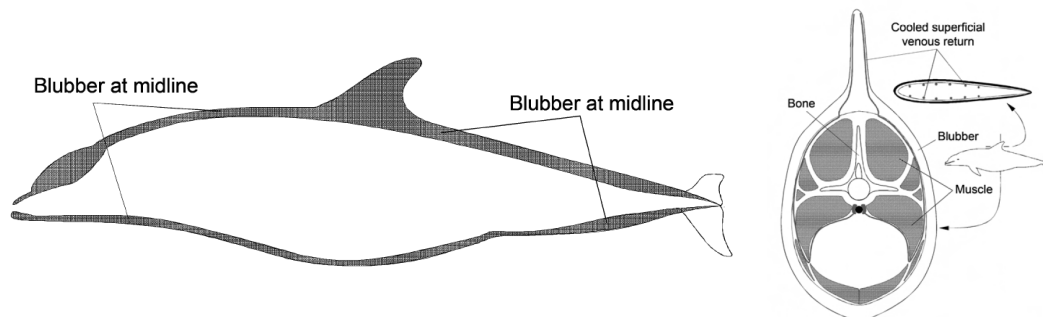
Come già introdotto nel paragrafo precedente, solamente le ossa delle appendici anteriori sono sviluppate, mentre quelle posteriori sono visibili solo allo stadio embrionale. Pertanto, l'elongazione di una colonna vertebrale per tutta la lunghezza del corpo e la mancanza di strutture analoghe agli arti inferiori dei mammiferi terrestri giustificano l'assenza di un osso sacro in questi animali.

### 1.2.3 Termoregolazione e osmoregolazione

In quanto mammiferi, i cetacei sono animali omeotermi, ovvero sono in grado di mantenere la propria temperatura corporea costante indipendentemente da quella esterna.

L'energia termica di un mammifero in ambiente acquatico viene dispersa molto più velocemente di quanto accade sulla terraferma, poiché la conduttività del calore è 25 volte superiore a quella dell'aria (Heyning, 2001; Schmidt-Nielsen, 1997).

Pertanto questi animali, che trascorrono tutto il loro ciclo biologico in immersione, hanno sviluppato tre principali meccanismi per regolare la temperatura interna. Il primo è l'isolamento termico grazie ad uno strato sottocutaneo di tessuto adiposo vascolarizzato, chiamato *blubber* (Figura 1.4), che riveste l'interna superficie corporea trattenendo il calore. Il suo spessore può variare in base alla età dell'animale e alle condizioni ambientali in cui quest'ultimo vive; inoltre, essendo costituito da sostanze ricche di grassi, riveste un importante ruolo di sostentamento alimentare e di riserva energetica nel caso in cui le risorse di cibo scarseggino (Blix, 2016).



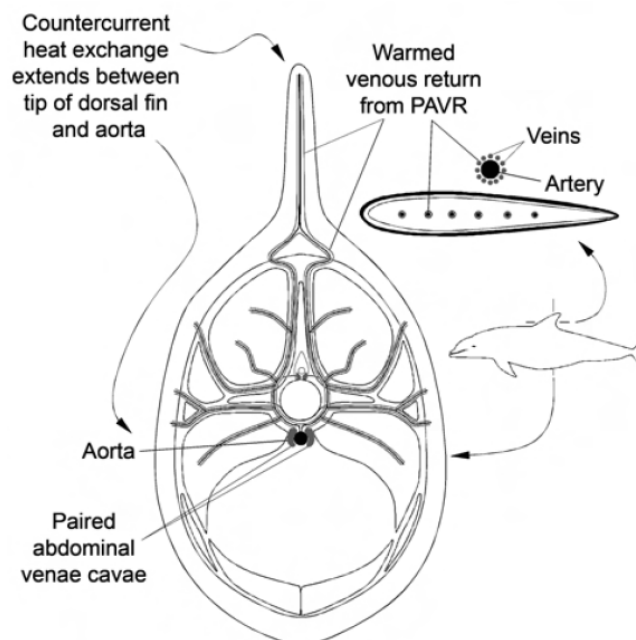
**Figura 1.4** - Sezioni laterale e frontale dello strato di *blubber* (Rommel *et al.*, 2006).

Un altro metodo per ridurre la dispersione di calore è l'utilizzo di strutture vascolari specializzate, situate nelle estremità del corpo (pinna dorsale, pinne pettorali e *flukes*)<sup>1</sup>, che fungono da scambiatori di calore controcorrente. Questi sistemi

---

<sup>1</sup> Le pinne dei cetacei sono maggiormente soggette alla dispersione termica in quanto non sono isolate dal *blubber* e sono caratterizzate da una superficie relativamente ampia. Al contrario, Elsner *et al.* (1974) hanno osservato che le pinne di un cetaceo tenuto fuori dall'acqua si surriscaldano rispetto alla pelle del resto del corpo, in quanto l'animale tenta di scaricare il calore in eccesso attraverso queste appendici.

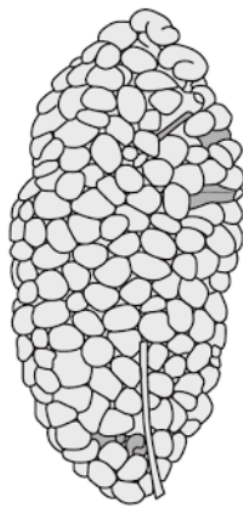
vascolarizzati sono conosciuti come PAVR (*peri-arterial venous retia*) e ciascuno di essi è costituito da una rete di vene disposte attorno ad una grossa arteria centrale (Figura 1.5). Il sangue arterioso caldo che fluisce verso le appendici scorre vicino alle vene che fanno ritorno al cuore: si crea così un gradiente termico che permette il trasferimento del calore al sangue freddo venoso e il mantenimento del calore corporeo (Scholander & Schevill, 1955). In alcune situazioni, invece, l'animale ha bisogno di dissipare il calore in eccesso per evitare il surriscaldamento: in questo caso il flusso sanguigno attraverso queste reti viene bypassato, permettendo la dispersione termica dalle appendici verso l'ambiente esterno (Meagher *et al.*, 2002).



**Figura 1.5** - Rappresentazione del sistema di scambio di calore controcorrente di *Tursiops truncatus* (Rommel *et al.*, 2006).

Anche la forma affusolata del corpo e le appendici ridotte sono ulteriori meccanismi che consentono la regolazione termica: rispetto agli animali terrestri, infatti, il rapporto superficie/volume dei cetacei è minimizzato e questo la superficie esposta all'acqua fredda. Questo è quanto sta alla base della regola di Allen (Calow, 1998), una teoria ecologica applicata anche all'uomo, secondo la quale per gli organismi che vivono in climi freddi è vantaggioso possedere estremità più corte per conservare energia e calore.

Un altro fattore ambientale da tenere in considerazione e al quale i cetacei si sono dovuti adattare nel corso dell'evoluzione è la salinità, il cui valore medio è di 35‰ (Castro & Huber, 2010). Vivendo in un ambiente ipertonico, questi animali hanno dovuto sviluppare dei meccanismi fisiologici adatti a conservare acqua dolce e ad evitare la disidratazione; ad esempio, possiedono un rene altamente funzionale (Figura 1.6) che non ha omologhi nei mammiferi terrestri (ad eccezione di orsi e lontre), in quanto è caratterizzato da centinaia di lobi, chiamati reniculi (Bester, 1975; Vardy & Bryden, 1981).



**Figura 1.6** - Raffigurazione del rene plurilobato dei cetacei (Slijper, 1979).

Rispetto al rene monolobato degli animali terrestri tale struttura anatomica, che ad un'analisi macroscopica risulta essere simile ad un grappolo d'uva, permette una maggior capacità di filtrazione del sangue, sebbene secondo Ortiz (2001) questo non garantisca necessariamente la produzione di un'urina molto concentrata, in quanto comunemente pinnipedi e cetacei non bevono acqua di mare. E' più probabile che la maggior funzionalità del rene dei cetacei sia correlata alle intermittenti perfusioni di sangue che ricevono durante le fasi di immersione ed emersione (Hedges *et al.*, 1978).

#### 1.2.4 Metabolismo energetico

L'organismo animale mette in atto una serie di reazioni chimiche per degradare la materia organica e ricavare energia. Una fonte immediata di energia è rappresentata dal glucosio, che subisce una serie di reazioni chimiche e viene convertito a piruvato. Se tale processo avviene in condizioni aerobiche il piruvato si ossida con produzione finale di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, mentre l'energia che viene liberata durante queste reazioni è usata per produrre adenosina trifosfato (ATP); l'ossidazione completa di una molecola di glucosio corrisponde alla produzione di 36 molecole di ATP (Kooyman & Ponganis, 1997; Roskoski, 1997).

Invece, un cetaceo in immersione (e quindi in apnea) deve ricavare l'energia necessaria tramite un metabolismo di tipo anaerobico: in assenza di ossigeno la degradazione del glucosio è incompleta e il piruvato viene convertito in lattato, con la produzione netta di 2 molecole di ATP (Kooyman & Ponganis, 1997), ovvero solo 1/18 di quella ricavata in presenza di un accettore di elettroni quale è l'ossigeno.

Con una tale quantità energia disponibile è impensabile che in immersione questi animali riescano a nuotare continuamente in quanto l'acido lattico, che viene prodotto in condizioni ipossiche per l'aumento della CO<sub>2</sub> nel sangue, tende ad accumularsi nei muscoli determinando il cosiddetto "sforzo muscolare"; inoltre, tale composto risulta essere tossico e l'organismo è in grado di tollerarne solo una quantità limitata prima che si creino danni ai tessuti (Costa, 2007).

Tuttavia, questi animali sono in grado di immergersi per lungo tempo fino a raggiungere anche elevate profondità e ciò è reso possibile da un'alta capacità di immagazzinare l'ossigeno nei muscoli: in questi tessuti, infatti, la concentrazione di mioglobina (Mb), la proteina responsabile del trasporto di O<sub>2</sub>, risulta essere 10-30 volte maggiore rispetto a quella dei mammiferi terrestri (Costa, 2007; Ponganis, 2011). Un altro adattamento riscontrato solamente in questi animali è la presenza di due ulteriori proteine *carrier*, neuroglobine e citoglobine, situate nella corteccia cerebrale e che proteggono l'encefalo da condizioni anossiche (Williams *et al.*, 2008).

Anche la temperatura è una variabile che influenza l'utilizzo delle riserve d'ossigeno: infatti, Scholander *et al.* (1942) hanno condotto un esperimento di immersione forzata sulla foca comune (*Phoca vitulina*), dimostrando che con la

diminuzione della temperatura corporea si assiste ad una riduzione del metabolismo basale del 50% (ipometabolismo).

Per quanto riguarda l'acido lattico, allo scopo di contrastare il suo effetto tossico sono presenti diversi meccanismi fisiologici. Uno di questi è l'alta concentrazione di enzimi glicolitici come la lattato deidrogenasi (LDH) che migliora la capacità dei tessuti di processare questo composto (Costa, 2007). Inoltre, quando l'animale si trova in profondità subisce una vasocostrizione e questo processo ha un effetto ritardante sull'azione dell'acido lattico: quando questo viene rilasciato nel sangue i livelli crescenti di CO<sub>2</sub> innescano un riflesso incondizionato che indurrebbe a respirare, di conseguenza l'apnea diventerebbe difficile da mantenere; con la vasocostrizione, invece, l'acido lattico è trattenuto a livello muscolare e non entra in circolazione (Michael Pannenton, 2013).

Grazie a questi meccanismi compensatori, quindi, i cetacei sono in grado di estendere la durata dell'apnea. Quando l'animale si immerge può utilizzare la respirazione aerobica grazie alle riserve di O<sub>2</sub> senza accumulare una quantità significativa di acido lattico, fino a quando entra in gioco il metabolismo anaerobio: tale intervallo di tempo è definito come *aerobic dive limit* (ADL) (Kooyman *et al.*, 1980; Tyack *et al.*, 2006) o *diving lactate threshold* (Butler & Jones, 1997).

### **1.2.5 Apparato respiratorio**

Il sistema respiratorio è certamente uno tra gli apparati dell'organismo dei cetacei che ha subito più adattamenti alla vita acquatica, allo scopo di mantenere un'apnea prolungata e di sopportare la pressione dell'acqua sovrastante. Prima di analizzare nel dettaglio gli adattamenti anatomici e fisiologici di tale sistema è necessario comprendere gli effetti idrostatici a cui va incontro un corpo immerso nell'acqua.

Il valore di pressione alla superficie del mare risulta essere pari ad 1 atmosfera (1 atm = 1 kg/cm<sup>2</sup>). È noto che un organismo in immersione è sottoposto ad un incremento di pressione di un'unità atmosferica ogni 10 metri di profondità, pertanto la pressione totale risultante a 10 m sarà di 2 atm e a 20 m di 3 atm.

A tale aumento di pressione è proporzionalmente associata la diminuzione del volume degli spazi aerei in quanto i gas, contrariamente ai liquidi, sono comprimibili. Quindi, per esempio, un animale con capacità polmonare di 10 L sulla

superficie subirà un dimezzamento del volume dei polmoni ad una pressione pari a 2 atm e una riduzione di 1/3 a 3 atm. Questo è dimostrato dalla legge di Boyle, secondo la quale un volume di aria in immersione diminuisce e la pressione aumenta fino a raggiungere un equilibrio con l'ambiente circostante (Costa, 2007):

$$P_1 * V_1 = P_2 * V_2.$$

Di conseguenza ad una certa profondità il volume dell'aria sarà così ridotto per effetto della compressione da causare il collasso dei polmoni: ad esempio, per il tursiope (*Tursiops truncatus*) tale punto critico è stato calcolato essere a 70 metri (Ridgway & Howard, 1979), che corrispondono ad un valore di pressione pari a 8 atm.

Al contrario, la solubilità di un gas aumenta in modo proporzionale alla pressione, con il risultato che questo viene assorbito dai tessuti in quantità sempre maggiori secondo un gradiente di diffusione. Circa il 79% dell'aria che respiriamo è composta da azoto: un subacqueo che ritorna in superficie dopo una prolungata e profonda immersione avrà dei livelli molto alti di N<sub>2</sub> disciolto nei propri tessuti e dovrà effettuare una lenta e cauta risalita per evitare che la rapida decompressione causi la supersaturazione dei tessuti e la formazione di bolle d'aria. Questo fenomeno è noto come “sindrome da decompressione” (DCS) e può determinare la morte per embolia gassosa; tuttavia, questa può essere facilmente evitata dai subacquei quando la loro velocità di riemersione non supera quella delle bolle d'aria prodotte dalla fase di espirazione (Hooker *et al.*, 2011).

Inoltre, gas come l'ossigeno e l'azoto causano un effetto intossicante sotto pressione, conosciuto come narcosi da gas. Questo effetto narcotico provoca uno stato euforico, causa allucinazioni e dipende dalla concentrazione del gas e dalla profondità raggiunta: è stato stimato che l'O<sub>2</sub> diventa tossico ad una profondità pari a 66 m (Wilmshurst, 1998).

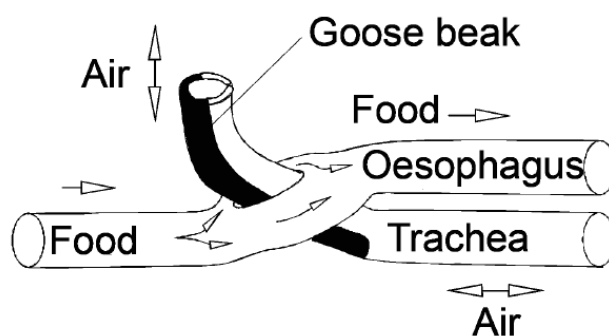
Un'altra conseguenza della pressione sui tessuti è la cosiddetta sindrome nervosa da alta pressione (HPNS), che è stata osservata avere un effetto diretto sul sistema nervoso umano: essa si manifesta sotto forma di tremori a 150 m e di convulsioni a 500 m. Tuttavia, questa patologia non è stata finora riscontrata nei *deep-divers* quindi non vi sono prove che dimostrino che questi animali ne risentano o se



abbiano sviluppato meccanismi fisiologici in grado di contrastarla (Costa, 2007; Ponganis, 2011).

Vediamo ora come si è evoluto l'apparato respiratorio dei cetacei in risposta alle problematiche appena descritte. Le cavità nasali sono migrate sulla sommità della testa fino a formare un'apertura, definita sfiatatoio (*blowhole*), singolo negli odontoceti e bipartito nei mysticeti. L'inspirazione avviene in superficie attraverso lo sfiatatoio che si apre e si chiude tramite un tappo nasale per azione di muscoli volontari; è, infatti, l'animale che decide quando respirare, al contrario di quanto accade per i mammiferi terrestri (Bagnoli *et al.*, 2011; Cagnolaro *et al.*, 2015). Una volta in immersione, lo sfiatatoio viene chiuso per impedire l'ingresso di acqua nelle cavità aeree e dando inizio all'apnea.

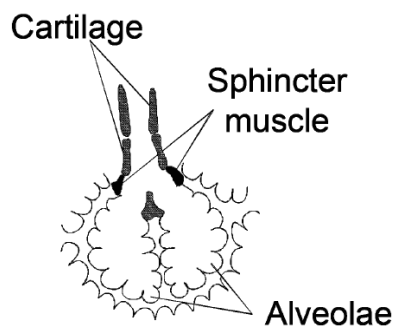
La laringe è caratterizzata da una struttura particolare, chiamata "a becco d'oca" o condotto ariteno-epiglottideo (Cagnolaro *et al.*, 2015), in quanto è piegata quasi ad angolo retto per permettere il collegamento fra lo sfiatatoio e la trachea che è posizionata orizzontalmente; inoltre, è completamente separata dalla faringe circostante per evitare che potenziali residui di cibo finiscano nelle vie aeree (Figura 1.7). Questo isolamento permette all'animale di ingoiare le prede senza dover far ritorno in superficie, rendendo l'attività di foraggiamento più efficiente (MacLeod *et al.*, 2007).



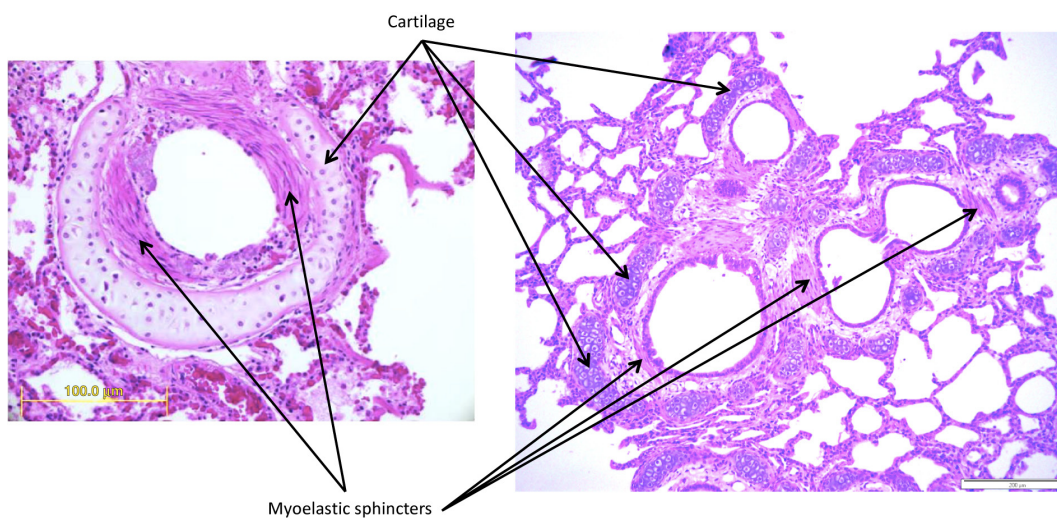
**Figura 1.7** - Rappresentazione della struttura anatomica delle vie aeree superiori e dell'esofago di un cetaceo (Rommel *et al.*, 2006).

Anche la trachea, come il collo, è molto corta (qualche cm di lunghezza) e questo fattore permette la riduzione dello spazio morto anatomico. È caratterizzata da un ampio lume ed è irrobustita da numerosi anelli cartilaginei, il cui numero è specie-

specifico, anastomizzati fra loro ad intervalli irregolari da sfinteri mioelastici (Figure 1.8 e 1.9); questa struttura si prolunga fino alle vie aeree più piccole (bronchioli e alveoli), permettendo la chiusura graduale del passaggio d'aria fino al collasso polmonare durante la fase di discesa (Cagnolaro *et al.*, 2015). Nella sottomucosa tracheale sono presenti delle lacune venose innervate che funzionano da tessuto erettile e contribuiscono a restituire al lume della trachea la sua forma originale durante la risalita in superficie (Cozzi *et al.*, 2016).



**Figura 1.8** - Rappresentazione anatomica della struttura rinforzante delle vie aeree inferiori nei cetacei, costituita dagli anelli cartilaginei e dagli sfinteri muscolari (Rommel *et al.*, 2006).



**Figura 1.9** - Fotografie al microscopio degli sfinteri mioelastici nella sottomucosa dei bronchioli di *Stenella coeruleoalba* (a sinistra) e *Tursiops truncatus* (a destra). Barre di scale: 100 µm (sinistra), 200 µm (destra) (Cozzi *et al.*, 2017).

I polmoni dei cetacei sono posti dorsalmente al diaframma e si trovano in posizione orizzontale; si distinguono da quelli degli altri mammiferi terrestri poiché non sono

suddivisi in lobi e sono privi di segmentazione. Sono generalmente piccoli e molto elastici, il che permette il collasso polmonare dovuto all'effetto pressorio, accompagnato dalla presenza di una cavità toracica molto flessibile (cfr. par. 1.2.2). Tali caratteristiche favoriscono uno scambio gassoso in modo rapido ed energico (Cagnolaro *et al.*, 2015) per permettere una completa ossigenazione del sangue: con un singolo respiro, infatti, *T. truncatus* è in grado di rinnovare fino al 90% dell'aria nei polmoni, al contrario dell'uomo e degli altri mammiferi terrestri che ne rinnova solo il 10-20% (Berta *et al.*, 2015).

L'immersione in apnea dei cetacei rappresenta un vantaggio rispetto a quella compiuta da un normale subacqueo, in quanto permette loro di mantenere bassi i livelli dei gas ispirati, riducendo così il rischio di andare incontro ad una delle patologie precedentemente elencate. La quantità di aria presente nei polmoni all'inizio dell'immersione è irrilevante a fornire ossigeno all'organismo, dato che questi animali hanno sviluppato altri meccanismi di immagazzinamento di O<sub>2</sub> (cfr. par. 1.2.4); si ritiene, infatti, che la fase di inspirazione serva più che altro al raggiungimento di un assetto neutro durante il nuoto e alla produzione di suoni. Inoltre, la chiusura graduale degli sfinteri muscolari comprime l'aria e la fa fuoriuscire dagli alveoli fino alle vie aeree superiori, la cui struttura cartilaginea non consente la diffusione gassosa nel sangue: in questo modo vengono minimizzati i rischi legati all'accumulo di N<sub>2</sub> (Berta *et al.*, 2015).

L'apnea dei cetacei si mantiene anche grazie ad una bassa sensibilità all'ipercapnia (aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> e ioni H<sup>+</sup> nel sangue) e alla mancanza di contrazioni diaframmatiche: il riflesso incondizionato che ci porta a riprendere a respirare dopo aver trattenuto il fiato sembra mancare in questi animali, portandoli ad avere un maggior controllo della respirazione (Berta *et al.*, 2015).

Inoltre, gli intervalli di superficie, ovvero il tempo di recupero fra due immersioni, sono generalmente brevi rispetto a quelli necessari ai subacquei; si ritiene che la produzione di sostanze surfattanti nei polmoni di questi animali favorisca il recupero alveolare causato dai continui collassi in seguito ad immersioni ripetute (Spragg *et al.*, 2004; Costa, 2007; Ponganis, 2011).

### 1.2.6 Apparato cardiocircolatorio

Non si può parlare dell'ossigeno senza trattare anche il sistema responsabile del suo trasporto, costituito dalla pompa cardiaca e da una rete complessa di vasi sanguigni. Il funzionamento dell'apparato circolatorio dei cetacei è analogo a quello degli altri mammiferi: il sangue venoso ricco di CO<sub>2</sub>, proveniente dalla circolazione sistemica, raggiunge l'atrio destro del cuore attraverso la vena cava, viene spinto nel ventricolo destro dalla valvola tricuspide e poi nell'arteria polmonare; qui il sangue viene ossigenato e ripassa per il cuore attraverso la vena polmonare, prima nell'atrio sinistro e poi, tramite la valvola mitrale, nel ventricolo sinistro che lo immette nella circolazione sistemica (Curtis & Barnes, 2009).

Dal punto di vista macroscopico il cuore è simile a quello dei mammiferi terrestri, sebbene si presenti più largo e piatto a causa della forma del torace e della pressione che subisce in immersione (Bisaillon *et al.*, 1987). Le dimensioni possono variare in base alla specie (nei mysticeti può raggiungere grandezze notevoli; Cagnolaro *et al.*, 2015), sebbene il rapporto tra il peso del cuore e quello corporeo rimane generalmente costante: è stato stimato che il cuore costituisce lo 0.93% del peso nel tursiope, lo 0.6% nei delfini in generale e lo 0.7-0.8% nel capodoglio (Slijper, 1979).

L'importanza di questo apparato risiede nella sua capacità di modificare il flusso sanguigno come risposta adattativa all'apnea, che rappresenta l'inizio di una serie di reazioni a carico dei sistemi cardiovascolare e respiratorio durante un'immersione: l'insieme di questi meccanismi compensatori è conosciuto con il nome di "riflesso di immersione" (*diving reflex* o *diving response*; Michael Panneton, 2013).

Durante l'intervallo di nuoto superficiale, prima dell'immersione, il battito cardiaco dell'animale è accelerato, solitamente compreso nell'intervallo fra 120 e 150 bpm: si ritiene che una tale tachicardia sia correlata alla massimizzazione dell'*output* cardiaco e ad una rapida ossigenazione dei tessuti (Ponganis, 2011; Williams *et al.*, 1999). Durante la fase di apnea si assiste ad una graduale riduzione della frequenza cardiaca (bradicardia), associata all'aumento della profondità, e quindi del flusso sanguigno. Per mantenere la pressione sanguigna costante ed assicurare un'apnea prolungata, infatti, buona parte del sangue viene indirizzato all'encefalo e agli

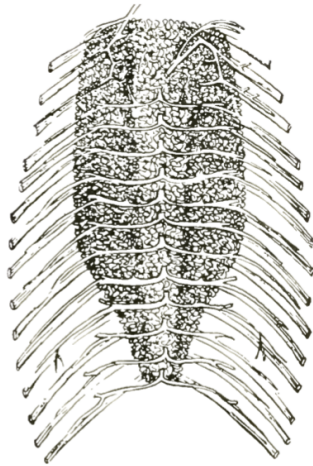
organi toracici (cuore e polmoni), i quali possiedono una bassa capacità anaerobica<sup>2</sup> (Kooyman *et al.*, 1981), mentre vi è una vasocostrizione periferica (ischemia selettiva)<sup>3</sup> degli altri tessuti. Questo ha come risultato una riduzione metabolica in quanto l'attività di molti organi viene ridotta, in particolare quella di reni e fegato (Costa, 2007).

L'aumento del volume sanguigno nel torace evita il collasso irreversibile di cuore e polmoni (il sangue, in quanto liquido, è incomprimibile), mentre il cedimento delle coste (cfr. par. 1.2.5) permette che parte del sangue confluisca nelle cosiddette *retia mirabilia*. Le reti mirabili vengono generalmente definite come delle “*strutture complesse in cui un singolo vaso (generalmente un'arteria) si ramifica in un numero di vasi più piccoli, che infine si ricostituiscono in un singolo vaso più grande (o in alcuni vasi), che è in effetti la continuazione diretta dell'arteria che ha generato la rete.*” (Cagnolaro *et al.*, 2015). Contrariamente a quanto si evince da questa definizione, tuttavia, le reti mirabili non sono da considerarsi dei semplici capillari, poiché sono caratterizzate da una parete relativamente spessa. Il termine “rete mirabile” deriva dal latino e sta ad indicare il fatto che queste sono molto sviluppate nei cetacei odontoceti, in particolare nelle focene (Slijper, 1979); sono state ritrovate anche nei ruminanti, dove svolgono il ruolo di fornire sangue all'encefalo, ma sono assenti nell'uomo, contrariamente a quanto asserito da Galeno, uno dei primi studiosi ad aver trattato tale argomento. Generalmente assenti nella regione caudale, sono collocate sotto la colonna vertebrale toracica (Figura 1.10) e all'interno del canale vertebrale, dove circondano il midollo spinale (Cozzi *et al.*, 2016).

---

<sup>2</sup> Tuttavia, sono state osservate estese riserve di glicogeno nel cuore di due specie di foca (*Pusa hispida* e *Pagophilus groenlandicus*), il che suggerisce che il tessuto cardiaco di questi animali abbia una capacità anaerobica maggiore rispetto ai mammiferi terrestri (Pfeiffer & Viers, 1995).

<sup>3</sup> E' per questo motivo che, in un subacqueo in immersione, le prime parti del corpo che si raffreddano sono mani e piedi.



**Figura 1.10** - Rappresentazione delle reti mirabili toraciche di un delfino comune (*Delphinus delphis*) (Slijper, 1979).

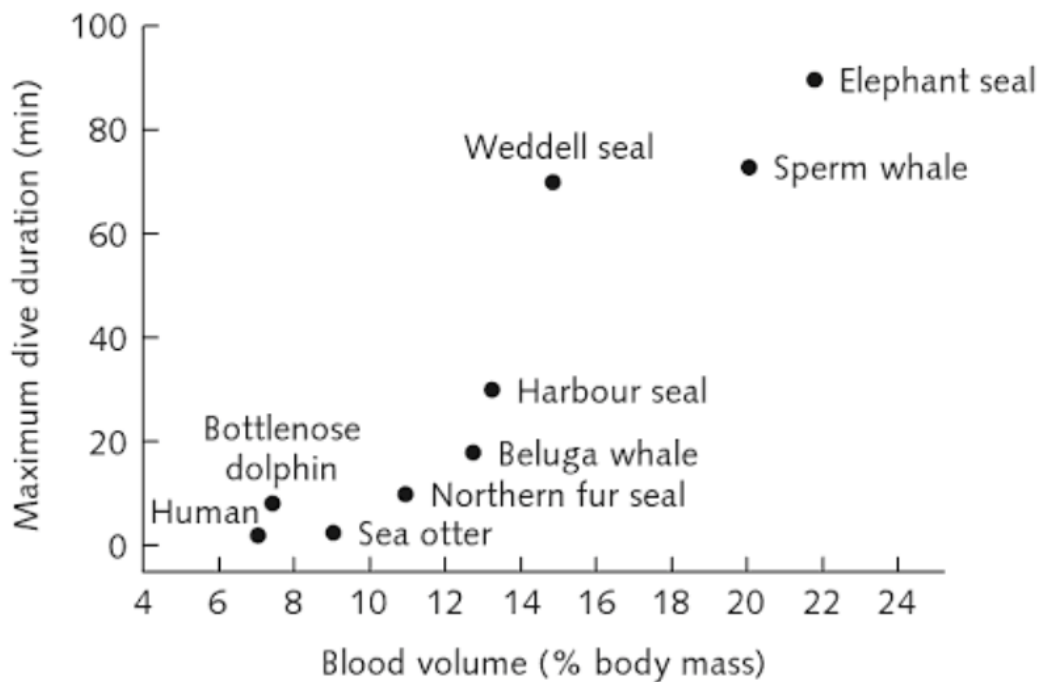
Secondo la suddivisione di Ask-Upmark (1935) posso essere distinte in tre categorie: rete mirabile arteriosa (oggetto di questa tesi), venosa e mista (rete mirabile artero-venosa). La funzione della prima è quella di serbatoio di sangue ossigenato come supporto agli organi principali durante l'immersione (Berta *et al.*, 2015); la bradicardia comporta una riduzione del volume sanguigno circolante all'interno dell'organismo: come conseguenza vi è una minor irrorazione ai tessuti, che viene però compensata dall'aggiunta della quota di sangue data da queste reti. In questo modo viene garantito un apporto continuo di ossigeno ai due organi che necessitano di un'irrogazione minima, soprattutto l'encefalo: infatti, contrariamente alla maggior parte dei mammiferi terrestri, uomo incluso, l'arteria carotidea interna raggiunge la cavità timpanica e l'occhio senza essere connessa al cervello, il cui rifornimento di sangue è permesso proprio dalla presenza delle reti mirabili cervicali (Cozzi *et al.*, 2016).

Un altro aspetto da considerare è la presenza di milze accessorie, la cui funzione è tuttora oggetto di dibattito: secondo De Oliveira e Silva *et al.* (2014) questi piccoli dischi potrebbero svolgere un ruolo complementare di riserva di sangue e fungere, quindi, da organi di supporto all'ossigenazione. A sostegno di tale ipotesi risultano importanti due aspetti: le ridotte dimensioni della milza principale, che costituisce solo lo 0.2% del peso corporeo (Slijper, 1958), e la presenza cospicua di questi

organi secondari soprattutto in specie di grandi dimensioni e in grado di compiere immersioni ad alte profondità.

In tutti i pinnipedi e in alcune specie di cetacei, inoltre, è stato osservato un incremento del diametro dell'aorta ascendente del 30-40%, che prende il nome di bulbo o arco aortico. Si ritiene che vi sia una correlazione fra le dimensioni di questa espansione e le abitudini di immersione delle varie specie, in quanto quelle di profondità presentano un bulbo più grande di quello delle specie che solitamente vivono più in superficie. La sua funzione è quella di incrementare la perfusione ai polmoni nella fase intervallare fra un'immersione e l'altra e di mantenere alta la pressione sanguigna durante l'apnea.

In generale, quindi, tutte le caratteristiche finora descritte garantiscono a questi animali un elevato volume di sangue ossigenato che gli permette di restare più a lungo in immersione. E' evidente che esiste una correlazione positiva fra il quantitativo di sangue circolante nell'organismo e la durata dell'immersione (Figura 1.11): un volume sanguigno maggiore, infatti, corrisponde ad un maggiore trasporto di O<sub>2</sub> e, di conseguenza, ad un'apnea prolungata; il volume ematico nei mammiferi marini spesso supera il 12% del peso corporeo, mentre è di circa il 7% nell'uomo e negli altri mammiferi terrestri (Cagnolaro *et al.*, 2015). Questo è dovuto alle alte concentrazioni di emoglobina (Hb) nel sangue, sebbene si ritenga che l'affinità di questa proteina per l'ossigeno non sia significativamente diversa da quella dei mammiferi terrestri (Ponganis, 2011).

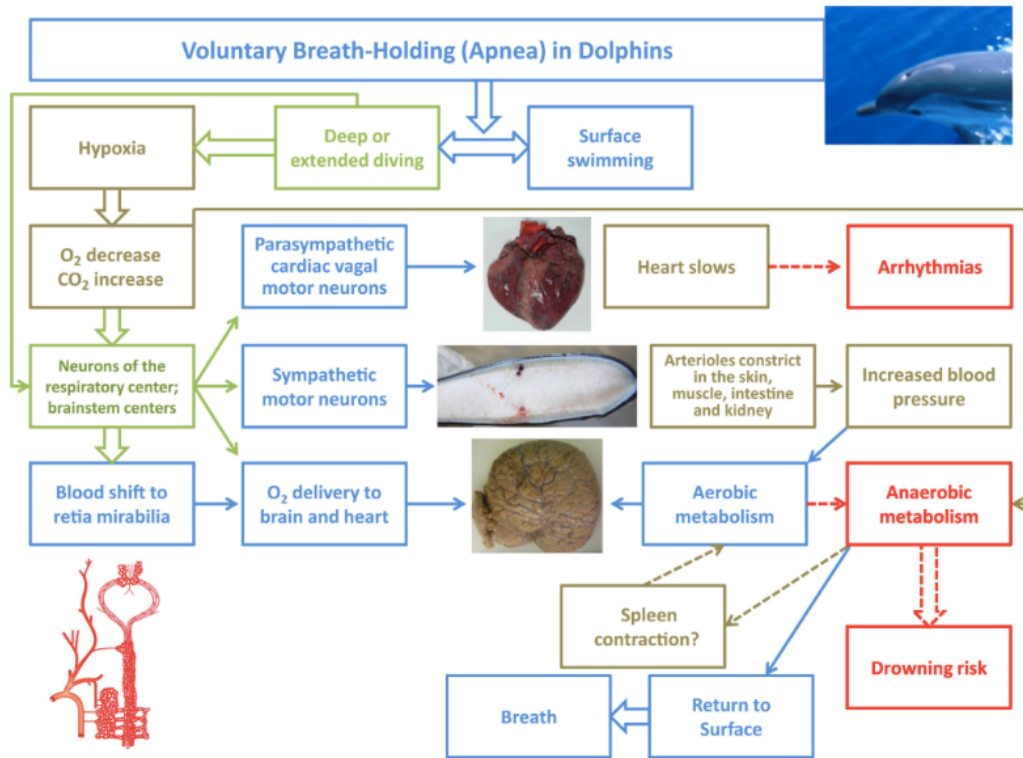


**Figura 1.11** - Rappresentazione grafica della relazione fra il volume sanguigno (espresso come percentuale del peso corporeo) dell'uomo e di alcuni mammiferi marini e la durata dell'immersione (Berta *et al.*, 2015).

Per quanto riguarda il sistema venoso di queste reti, è stata riscontrata l'assenza di valvole (probabilmente il sangue può scorrere in entrambe le direzioni) e di strati muscolari (Cozzi *et al.*, 2016). Un'importante caratteristica è la presenza di seni nel fegato, che costituiscono la principale fonte di sangue venoso di ritorno al cuore (Ponganis, 2011). La funzione di queste lacune epatiche verrà trattata in seguito (cfr. "Discussione").



In Figura 1.12 è riportato uno schema riassuntivo dei meccanismi fisiologici del *diving reflex* finalizzati a minimizzare il consumo di O<sub>2</sub> durante l'apnea.



**Figura 1.12** - Rappresentazione schematica del funzionamento del *diving reflex* di un delfino in immersione (Cozzi *et al.*, 2017).

### 1.3 Specie oggetto di studio: *Ziphius cavirostris*

L'animale oggetto di questo studio è lo zifio (*Ziphius cavirostris*), un cetaceo appartenente alla famiglia Ziphiidae, che comprende 21 specie raggruppate in 6 generi (Mead, 2009; Rommel *et al.*, 2006). E' l'unica specie appartenente al genere *Ziphius* (dal greco ξίφος, "spada") ed è la più diffusa e conosciuta tra le altre della sua famiglia (Cresswell *et al.*, 2007; Rommel *et al.*, 2006), sebbene si abbiano ancora poche informazioni a causa degli scarsi avvistamenti e delle elevate profondità in cui vive. I dati che si possiedono, infatti, derivano per lo più dal ritrovamento di individui morti per spiaggiamento. La scoperta di questo animale risale al 1804, a seguito della raccolta di un campione parziale di cranio su una costa francese (Heyning & Mead, 2009).



**Figura 1.13** - Fotografia di un esemplare maschio di *Ziphius cavirostris*. Vengono messi in evidenza la coppia di denti, caratteristica tipica dei maschi, e i segni sul dorso dell'animale, provocati dai morsi durante le lotte intrasessuali.  
 Fonte: Todd Pusher / NPL, [www.bbc.com/earth/story/20150115-extreme-divers-defy-explanation](http://www.bbc.com/earth/story/20150115-extreme-divers-defy-explanation). Modificato da Camilla Benigno.

**Tabella 1.1** - Classificazione scientifica di *Ziphius cavirostris*.

Fonte:

[www.animaldiversity.org/accounts/Ziphius\\_cavirostris/](http://www.animaldiversity.org/accounts/Ziphius_cavirostris/).

<b>Dominio</b>	<b>Eukaryota</b>
<b>Regno</b>	<b>Animalia</b>
<b>Phylum</b>	<b>Chordata</b>
<b>Subphylum</b>	<b>Vertebrata</b>
<b>Classe</b>	<b>Mammalia</b>
<b>Ordine</b>	<b>Cetacea</b>
<b>Sottordine</b>	<b>Odontoceti</b>
<b>Famiglia</b>	<b>Ziphiidae</b>
<b>Genere</b>	<b><i>Ziphius</i></b>
<b>Specie</b>	<b><i>Z. cavirostris</i> (G. Cuvier, 1823)</b>

### 1.3.1 Morfologia e identificazione

Lo zifio possiede un corpo siluriforme, caratteristica che lo contraddistingue dalla forma più armoniosa delle altre famiglie di cetacei. La lunghezza media di un individuo adulto è 6.1 m (Heyning, 2002), mentre quella alla nascita è 2.7 m (Heyning & Mead, 2009).

Il capo viene comunemente descritto come quello di un'oca, in quanto è piccolo e compresso lateralmente, mentre il profilo della bocca è curvato verso l'alto e presenta un marcato prognatismo mandibolare (Cagnolaro *et al.*, 2015): questa peculiarità giustifica il nome del gruppo a cui appartiene, *beaked whales* ("balene con il becco"). Lo sfiatatoio è a forma di mezzaluna con la concavità rivolta in avanti.

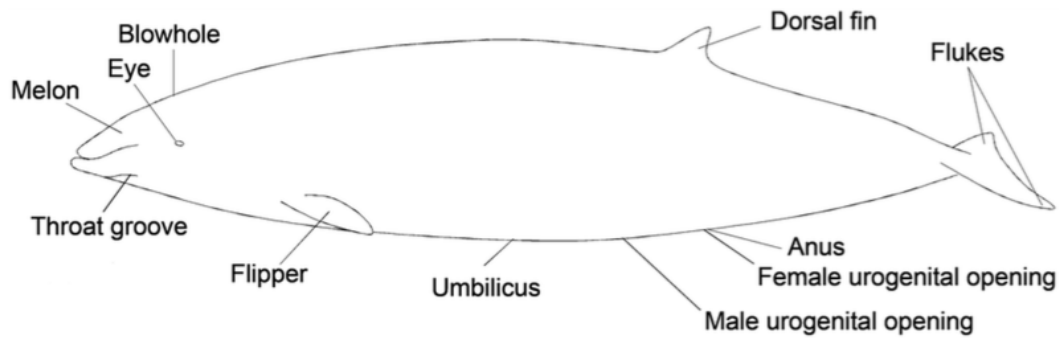
La gola presenta un paio di solchi a forma di V, il cui vertice è rivolto anteriormente, che servono all'espansione della cavità boccale durante l'ingestione di prede di grandi dimensioni (Heyning & Mead, 2009).

Le pinne pettorali sono corte (10-11% della lunghezza del corpo) e sono inserite in depressioni che ne aumentano l'aderenza al tronco durante il nuoto e, quindi, favoriscono l'idrodinamicità (Cagnolaro *et al.*, 2015). La pinna dorsale è triangolare, non falcata, ed è posizionata a circa 2/3 della lunghezza del corpo, in coincidenza con la fine della zona addominale, relativamente lunga, e l'inizio della coda, più corta. Quest'ultima è piuttosto larga e manca del seno interlobale tipico nei cetacei, elemento utilizzato per il riconoscimento delle specie (Mead, 2009).

Benchè appartenente al sottordine degli odontoceti, tale specie è caratterizzata da una dentatura ridotta: gli esemplari maschi adulti, infatti, posseggono un unico paio di denti posti sulla mandibola inferiore, che sporgono verso l'alto quando la bocca è chiusa, mentre le femmine e i maschi immaturi hanno perso tutti i denti funzionali e presentano solo un paio di denti vestigiali. La loro funzione è legata alla competizione intrasessuale nei maschi, comportamento testimoniato dalle cicatrici che sono ben visibili sul corpo (Heyning & Mead, 2009). Caratteristici sono anche i segni lasciati dai morsi degli squali stampino (*Isistius brasiliensis*), utilizzati negli studi di foto-identificazione (Rosso *et al.*, 2011).

In questa specie il dimorfismo sessuale non è particolarmente evidente, in quanto la forma e la taglia sono le stesse per entrambi i sessi; tuttavia, un elemento di riconoscimento, oltre alla presenza di denti e cicatrici nei maschi, è rappresentato

dal pattern di colorazione della livrea: il corpo dei maschi è generalmente grigio scuro e la testa presenta una gradazione bianca che si estende lungo la schiena con l'aumentare dell'età, mentre il colore nelle femmine tende a variare da grigio scuro a rosso-marrone (Heyning & Mead, 2009).



**Figura 1.14** - Morfologia esterna di *Ziphius cavirostris* (Rommel *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Ecologia e comportamento

Per quanto riguarda la dieta dello zifio, le analisi dei contenuti stomacali hanno rilevato che questa specie è prevalentemente teutofaga, ovvero si nutre di molluschi cefalopodi come calamari e seppie, ma occasionalmente anche di pesci e crostacei (Santos *et al.*, 2001). Il ritrovamento di resti di granchi, inoltre, indica un foraggiamento di tipo bentonico (Ohizumi *et al.*, 2003). Questo suggerisce un'alimentazione opportunistica di questi animali, che si nutrono di quello che riescono a catturare in base alla profondità d'immersione.

L'assenza di denti funzionali non consente la masticazione delle prede, che vengono bloccate con le mascelle e ingoiate per intero; questa modalità di ingestione è facilitata dalle scanalature presenti sulla gola (cfr. par. 1.3.1) che ne permettono l'espansione per facilitare la deglutizione, soprattutto quando si nutrono di grandi prede (Heyning & Mead, 2009).

Dai pochi studi riguardanti la biologia riproduttiva di tale specie (Omura *et al.*, 1955; Mead, 1984) emerge che i maschi diventano sessualmente maturi quando raggiungono 5.50 m di lunghezza, mentre le femmine devono raggiungere i 5.80 m.

L'età massima raggiunta risulta essere di 36 anni per i maschi e di 30 per le femmine (Mead, 1984).

Grazie all'utilizzo del D-TAG, una tecnica di marcatura non invasiva che consiste in un piccolo registratore che aderisce al dorso dell'animale tramite ventose, è stato possibile ottenere dati di bioacustica. *Ziphius cavirostris* inizia ad emettere dei *click* ad alta frequenza ad una profondità media di 475 m, probabilmente per evitare di essere individuato da predatori come *Orcinus orca* (Tyack *et al.*, 2006); tali suoni si intensificano quando l'animale giunge più in profondità, allo scopo di ecolocalizzare le proprie prede. Durante la risalita, invece, la produzione di suoni termina ad una profondità media di 850 m e l'animale risale in superficie senza emettere segnali (Johnson *et al.*, 2004).

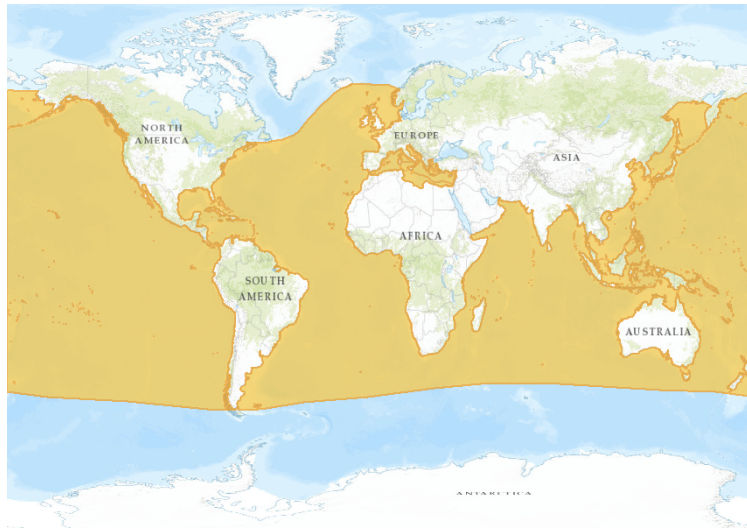
Poche informazioni si hanno sull'organizzazione sociale di questa specie e i rari avvistamenti indicano che la dimensione dei gruppi varia fra 1 e 12 individui (Cresswell *et al.*, 2007; Walker & Cresswell, 2008).

Il nuoto in superficie è solitamente lento e caratterizzato da un'emersione parziale, dove sono visibili solo una piccola parte della testa e del dorso; la pinna caudale viene raramente fatta uscire dall'acqua. In poche occasioni sono stati osservati degli individui nell'atto di compiere dei salti, uscendo completamente fuori dall'acqua (Cagnolaro, 2015).

Le interazioni con l'uomo sono molto rare poiché gli avvistamenti in campo non sono frequenti, data la tendenza di questa specie a nuotare ad alte profondità e ad evitare il contatto con le imbarcazioni. Anche il loro soffio non è sempre visibile in quanto raggiunge il metro d'altezza ed è leggermente inclinato in avanti, sebbene risulti più intenso nella prima emersione in seguito ad un'apnea prolungata (Cagnolaro *et al.*, 2015; Heyning & Mead, 2009).

### 1.3.3 Distribuzione e conservazione

Le conoscenze riguardo alla distribuzione di questa specie sono fornite dai luoghi di ritrovamenti delle carcasse spiaggiate, pertanto questo tipo di informazione può risultare affetta da *bias*. I dati (Heyning, 1989) indicano che *Z. cavirostris* è la specie più cosmopolita fra gli zifidi ed è presente in tutti gli oceani, ad eccezione delle acque polari (Figura 1.15).



**Figura 1.15** - Distribuzione globale di *Ziphius cavirostris*. Fonte: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

Anche nel Mar Mediterraneo la specie è ampiamente diffusa, mentre in Italia gli spiaggiamenti più frequenti si verificano lungo le coste del Mar Ligure e del Mar Ionio (Cagnolaro *et al.*, 2015).

Tecniche di *tagging* ed analisi dei contenuti stomacali hanno consentito la localizzazione degli habitat di preferenza e delle profondità raggiunte dallo zifio, il quale vive in oceano aperto e ha una predilezione per aree di profondità superiore ai 1000 m e habitat di scarpata continentale profonda (ad esempio, *canyon* sommersi). Un recente studio (Schorr *et al.*, 2014) ha registrato dei valori di immersione mai osservati fino a quel momento, confermando che *Z. cavirostris* detiene entrambi i record di durata d'immersione (137.5 min) e di profondità (2992 m): per tale motivo viene considerato il *deep-diver* per eccellenza e di notevole interesse scientifico.

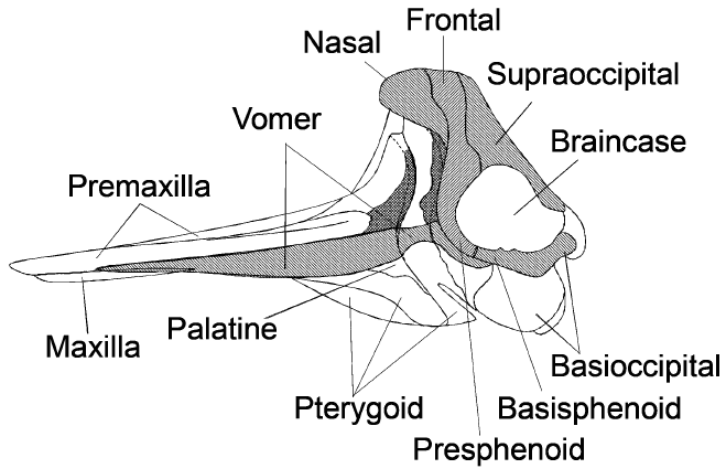
Il numero di ritrovamenti di esemplari spiaggiati è il più alto fra tutte le specie di zifidi, quindi evidentemente questo animale non è così raro come originariamente si credeva (Heyning & Mead, 2009). Secondo il sito della International Union for Conservation of Nature (IUCN, [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)), le stime di abbondanza si aggirano intorno ai 100.000 esemplari, pertanto *Z. cavirostris* è stato classificato come specie “di minima preoccupazione” nella Red List (Taylor *et al.*, 2008).

Le cause più frequenti di mortalità sono di origine antropica: oltre alle catture accidentali e intenzionali di pesca, anche l’esposizione alle onde emesse dai sonar durante esercitazioni militari ha degli effetti negativi su questi animali. L’analisi post-mortem di alcuni esemplari ritrovati, il cui spiaggiamento è risultato coincidere sia temporalmente che geograficamente con operazioni di sonar navali, ha rivelato la presenza di lesioni dei tessuti normalmente associate alla formazione di emboli nell’uomo e nelle cavie da laboratorio (Fernández *et al.*, 2005). Tuttavia, non è ancora chiaro se tali spiaggiamenti siano causati dall’azione diretta delle onde a media frequenza sui tessuti, oppure dall’influenza di questi suoni che vanno ad interferire e modificare il loro comportamento di emersione, o ancora da un loro effetto combinato (Houser *et al.*, 2001). Ulteriori studi e monitoraggi sono necessari per poter mitigare l’impatto acustico e ridurre l’esposizione di questi animali ai suoni prodotti dalle attività umane (Johnson *et al.*, 2004).

#### **1.3.4 Adattamenti anatomici e fisiologici**

La peculiarità di questa specie e che le ha conferito il nome *cavirostris* è la presenza di una cavità, situata sulla sommità del cranio dei maschi adulti, anteriormente rispetto alle narici. Le ossa del cranio (Figura 1.16) sono densamente ossificate e questo espediente anatomico ha probabilmente lo scopo di renderlo più robusto e resistente durante i combattimenti intrasessuali dei maschi (Heyning & Mead, 2009). E’ stato inoltre dimostrato (Cozzi *et al.*, 2010) che il terzo intermedio del rostro degli zifidi è più denso rispetto alle altre parti, al contrario di quanto avviene nei delfinidi; tale particolarità è probabilmente legata all’uso del rostro come una sorta di zavorra, facilitando la discesa in acque profonde. Questa caratteristica, insieme al fatto che complessivamente lo scheletro dello zifio ha un peso relativo inferiore (2.37 %) rispetto a quello di molti altri cetacei (3.5-5%), porta ad uno

sbilanciamento in avanti dell'animale, agevolando un affondamento passivo durante la discesa angolare (de Buffrènil & Casinos, 1995; Cozzi *et al.*, 2010).

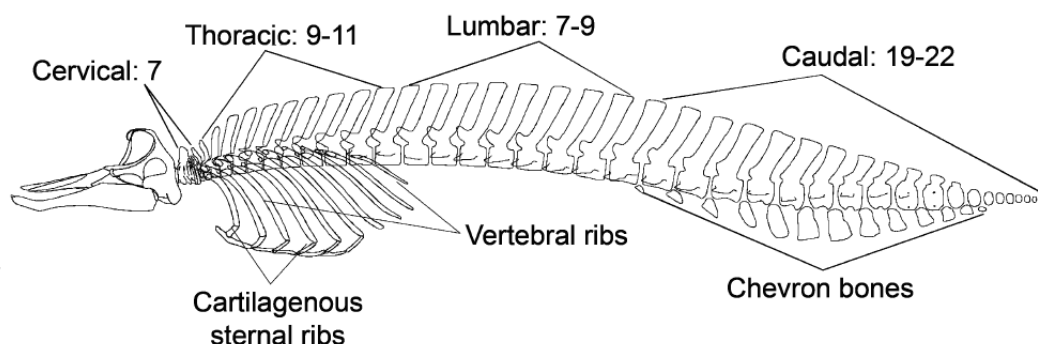


**Figura 1.16** - Raffigurazione del cranio di *Ziphius cavirostris* (Rommel *et al.*, 2006).

A differenza dello sterno del tursiopo che è composto da 3-4 sternebre, quello dello zifio ne presenta 5-6. Questa differenza morfologica potrebbe risultare determinante durante i cambiamenti subiti dalla gabbia toracica in immersione; tuttavia, sono necessari ulteriori studi in questo ambito soprattutto perché non si hanno ancora informazioni riguardo alla profondità alla quale avviene il collasso polmonare (Rommel *et al.*, 2006).

Le caratteristiche della colonna vertebrale non si discostano molto da quelle degli altri cetacei in generale, sebbene vi siano delle piccole differenze numeriche rispetto a *T. truncatus* (Rommel *et al.*, 2006): nello zifio le prime quattro vertebre cervicali sono fuse fra loro, le regioni toracica e lombare sono più corte, mentre quella caudale presenta una lunghezza maggiore (Figura 1.17), per un totale di circa 46-47 vertebre.





**Figura 1.17** - Rappresentazione dello scheletro di *Ziphius cavirostris* (Rommel *et al.*, 2006).

Dal punto di vista anatomico gli adattamenti che sono stati in precedenza descritti per i cetacei in generale possono essere estesi anche a *Z. cavirostris*, sebbene ben poco si sappia riguardo al funzionamento di alcuni meccanismi compensatori.

Ad esempio, in assenza di dati sul metabolismo di questa specie, è stata proposta un'approssimazione per il calcolo dell'ADL utilizzando i valori misurati su un pinnipede di profondità, la foca di Weddell (*Leptonychotes weddellii*); conoscendo la capacità portante di ossigeno di quest'ultima, pari a  $93 \text{ ml O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$  (Davis & Kanatous, 1999) e le masse corporee ( $M_b$ ) delle due specie considerate, 2000 kg per lo zifio e 330 kg per la foca (Davis & Kanatous, 1999; Mead, 1989), è stato stimato il valore di ADL per *Z. cavirostris* tramite la seguente formula:

$$ADL_{\text{beaked}} = ADL_{\text{Weddell}} * (M_{b,\text{Weddell}}/M_{b,\text{beaked}})^{-0.25}.$$

Ciò che è risultato da questa stima è che il tasso metabolico di immersione dello zifio è pari al 64% di quello del pinnipede, a causa della taglia dimensionale maggiore del cetaceo. Questo si traduce in un ADL pari ad un intervallo di tempo di 33 minuti, circa la metà del tempo di foraggiamento che è stato osservato in questa specie; ciò implica che questo animale necessita di un tempo di recupero prolungato in superficie per compensare l'elevato debito di ossigeno (Tyack *et al.*, 2006).

Dalle analisi necroscopiche è emerso che *Z. cavirostris*, in quanto specie di profondità, possiede una massa polmonare minore rispetto alle famiglie di Delphinidae e Phocoenidae; di conseguenza, è caratterizzato da una capacità di

immagazzinamento dell'aria ridotta che gli consente di minimizzare ulteriormente il rischio di assorbimento di azoto, sebbene la sua struttura alveolare si presenti più ramificata rispetto a quella delle specie di superficie (Figura 1.18), indice di una migliore capacità di diffusione gassosa nel sangue (Berta *et al.*, 2015).



**Figura 1.18** - Rappresentazione della struttura alveolare di *Ziphius cavirostris* (Berta *et al.*, 2015).

Con così poco ossigeno disponibile, tuttavia, è impensabile che un mammifero sia in grado di mantenere un'apnea superiore alle due ore, raggiungendo quasi i 3000 m di profondità; pertanto, l'adattamento fisiologico più importante da considerare è da ricercarsi nell'apparato cardiocircolatorio e nelle modalità di irrorazione del sangue sviluppate da questo animale nel corso dell'evoluzione.

#### **1.4 Obiettivo dello studio**

Questo elaborato ha come scopo investigare gli adattamenti a livello anatomico e fisiologico dell'animale modello *Ziphius cavirostris*, in particolare per quanto riguarda le modalità di trasporto di ossigeno e la perfusione sanguigna ai diversi comparti dell'organismo, meccanismi che contribuiscono alla marcata capacità di apnea di questa specie ancora poco conosciuta.

Lo studio verrà articolato nelle seguenti fasi:

- analisi microscopica delle reti mirabili per ottenere una stima della quantità di sangue circolante all'interno di questi vasi;
- simulazione tramite un modello Excel di un bilancio emo-dinamico per lo studio della fisiologia dell'immersione.

Questi tesi, inoltre, si pone l'obiettivo di estendere lo stesso modello simulativo utilizzato da Brocca (2016) su *Tursiops truncatus* ed è il primo studio sulla specie *Ziphius cavirostris* finalizzato alla comprensione della sua fisiologia di immersione.

## 2. MATERIALI E METODI

Per questo studio sono stati utilizzati dei campioni tissutali di *Ziphius cavirostris* già presenti nella Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo (per maggiori informazioni si rimanda all'Allegato 6.1) a cura dell'Università degli Studi di Padova.

### 2.1 Campioni utilizzati

Il ritrovamento di esemplari spiaggiati di *Z. cavirostris* non avviene di frequente, quindi è molto difficile avere un elevato numero di campioni a disposizione. A conferma di ciò, per l'analisi istologica sono stati presi in esame i campioni di un solo esemplare, l'unico di cui è stato possibile reperire i tessuti all'interno della Banca.

Di seguito sono riportate le informazioni ricavate dalla scheda relativa a tale individuo.

**Individuo:** ID 376

**Specie:** *Ziphius cavirostris*

**Sesso:** M

**Lunghezza (m):** 3.05

**Peso (kg):** -

**Località di ritrovamento:** Lampezia (CS)

**Data primo rilevamento:** 02.11.2015

## **2.2 Preparazione dei campioni**

I tessuti analizzati sono stati prelevati direttamente dalla Banca, in quanto già inclusi in blocchetti di paraffina. Per la descrizione delle tecniche preliminari di fissaggio ed inclusione si rimanda a Brocca (2016) e al protocollo di Muzi & Bologna (1999).

In seguito ad un breve raffreddamento dei blocchetti in criostato, il taglio dei campioni è stato effettuato tramite un microtomo a rotazione, uno strumento che permette di ottenere delle sezioni sottili dello spessore desiderato; nel nostro caso sono stati ricavati dei campioni con spessore pari a 5  $\mu\text{m}$ .

Dopo essere state poste in acqua fredda, le sezioni sono state lasciate galleggiare per qualche minuto in acqua calda alla temperatura di 39°C: tale procedura permette la distensione della paraffina e, quindi, la possibilità di effettuare una buona analisi del tessuto durante la fase di osservazione al microscopio. Infine, sono state raccolte con dei vetrini porta-oggetto di tipo tespato e lasciate raffreddare, prima su una piastra riscaldata a 37°C e poi a temperatura ambiente overnight, per poi procedere alla colorazione dei tessuti.

## **2.3 Analisi istologica**

I campioni biologici non possono essere analizzati al microscopio senza venire prima sottoposti ad un processo di colorazione, poiché le diverse componenti cellulari dei tessuti a fresco risulterebbero troppo omogenee e impossibili da distinguere.

La procedura di colorazione più comune negli studi istologici è quella con ematossilina-eosina (abbreviata in EE) che si basa sulla capacità di questi due coloranti di differenziare le strutture cellulari, a causa della loro diversa affinità per gli elementi endocellulari, e viene interamente effettuata sotto una cappa aspirante. L'ematossilina è una sostanza basica di colore blu-viola che tende a legarsi alle strutture cellulari con carica negativa come gli acidi nucleici che compongono il DNA, i quali sono basofili e si trovano a livello del nucleo. Al contrario dell'ematossilina, l'eosina è una sostanza acida di colore rosso-rosato che ha

affinità per le componenti cellulari con carica positiva, colorando le componenti citoplasmatiche acidofile.

In Tabella 2.1 vengono riportate le varie fasi di “sparaffinatura”, ovvero la rimozione della paraffina tramite scale di xiloli e di alcoli, e di colorazione a cui sono stati sottoposti i vetrini.

**Tabella 2.1** - Protocollo utilizzato in questo studio per la colorazione dei campioni tissutali.

<b>Sostanza</b>	<b>Tempo</b>	<b>Funzione</b>
Scala ascendente di xiloli	5 minuti ciascuno	Eliminazione paraffina
Scala discendente di alcoli	3 minuti ciascuno	Idratazione
Acqua distillata	Pochi secondi	Risciacquo
Ematossilina di Harris	5 minuti	Colorazione
Acqua corrente	5 minuti	Eliminazione residui colore
Alcool acidulato HCl 1%	Pochi secondi	Riduzione effetto colorante
Acqua corrente	5 minuti	Risciacquo
Acqua distillata	Pochi secondi	Risciacquo
Eosina	30 secondi	Colorazione
Scala ascendente di alcoli	3 minuti ciascuno	Disidratazione
Scala ascendente di xiloli	5 minuti ciascuno	Chiarificazione

Si è infine passati alla fase finale di montaggio: ciascun tessuto è stato coperto con una goccia di balsamo a base di xilene, che funge da collante per i vetrini copri-oggetto, i quali sono stati posti velocemente, avendo cura che non si creassero bolle d'aria. Infine, i vetrini sono stati lasciati ad asciugare sotto cappa per una notte.

Per maggiori dettagli sulla preparazione delle soluzioni utilizzate e sulla metodica appena descritta si rimanda al protocollo in Allegato 6.2.

## 2.4 Acquisizione delle immagini

L'acquisizione delle immagini dei vetrini sottoposti a colorazione è avvenuta tramite l'utilizzo del D-Sight (Figura 2.1), un microscopio digitale automatico che crea delle scansioni in alta qualità dei vetrini a diversi ingrandimenti e permette una loro analisi computerizzata per mezzo del software D-Sight Viewer, sviluppato da A. Menarini Diagnostic e scaricabile dal sito [www.dsight.eu](http://www.dsight.eu).

Tutte le scansioni sono state effettuate ad ingrandimento 20x.



**Figura 2.1** - Microscopio digitale D-Sight. Fonte: [www.dsight.eu](http://www.dsight.eu).

## 2.5 Volume sanguigno della rete mirabile midollare

I vetrini digitali ottenuti sono stati sottoposti ad analisi tramite l'utilizzo di ImageJ ([www.imagej.nih.gov/ij/](http://www.imagej.nih.gov/ij/)), un software sviluppato dal National Institute of Health (NIH), allo scopo di ricavare delle misure di superfici. Tuttavia, si è avuto un riscontro negativo dai tessuti campionati in quanto la maggior parte delle cavità presenti non erano da considerarsi dei vasi sanguigni, poiché mancanti della tipica parete vascolare. Inoltre, il campionamento dei tessuti è stato fatto a livello del cranio dell'animale, pertanto i pochi vasi presenti non erano rappresentativi della zona di interesse, ovvero il midollo spinale.

Per ovviare al problema e raggiungere lo scopo di questa parte di analisi, ovvero ottenere una stima del valore volumetrico delle reti mirabili midollari di *Z. cavirostris*, sono state prese in esame le vertebre di tre esemplari. Lo scheletro di

uno di questi (ID 217) appartiene alla Banca Tessuti di Padova, mentre gli altri due (MSNM Ma4903 e MSNM Ma4905) fanno parte della collezione del Museo Civico di Storia Naturale di Milano.

I dettagli riguardanti questi individui sono riassunti in Tabella 2.2.

**Tabella 2.2** - Informazioni relative agli esemplari di *Ziphius cavirostris*, i cui scheletri sono stati utilizzati in questo studio.

<b>Individuo</b>	<b>ID 217</b>	<b>MSNM Ma4903</b>	<b>MSNM Ma4905</b>
<b>Specie</b>	<i>Ziphius cavirostris</i>	<i>Ziphius cavirostris</i>	<i>Ziphius cavirostris</i>
<b>Sesso</b>	F	F	F
<b>Lunghezza (m)</b>	4.25	4.71	3.30
<b>Località</b>	Monasterace (RC)	San Remo (IM)	Foxi Lioni, Tertenia (OG)
<b>Data primo rilevamento</b>	19.01.2012	18.05.1983	10.02.1987
<b>Numero vertebre</b>	-	6+1 C, 9 D, 11 L, 19 Ca (46)	43

Le colonne vertebrali sono state ricomposte come si può vedere in Figura 2.2 e per ogni vertebra campionata sono state misurate lunghezza, altezza e larghezza del canale vertebrale (Figura 2.3).

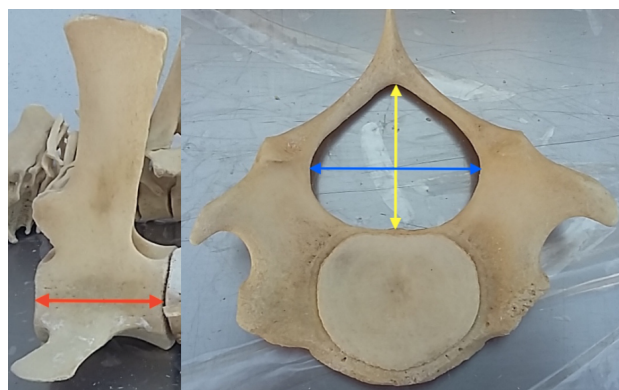




**Figura 2.2** - Colonna vertebrale di MSNM Ma4905 (foto di Camilla Benigno).

Per motivi legati alla tempistica, per l'individuo ID 217 è stata fatta una selezione di vertebre da misurare. Per la precisione sono state campionate tre vertebre per ciascuna delle quattro sezioni della colonna (cervicale, toracica, lombare e caudale), avendo cura di selezionare una vertebra all'inizio della sezione, una centrale e una alla fine, per un totale di 12 vertebre campionate (se si considerano le prime tre cervicali fuse come un'unica vertebra).

Invece, per quanto riguarda gli scheletri di Milano è stata usata una metodica più accurata, utilizzando tutte le vertebre disponibili e misurando le tre grandezze sia sul lato anteriore che su quello posteriore, da cui poi ricavare un valore medio. Inoltre, è stato usato un calibro elettronico che ha permesso di ottenere delle misure più precise rispetto ad un semplice metro manuale.



**Figura 2.3** - Due vertebre appartenenti allo scheletro di ID 217, in cui vengono evidenziati i punti dove sono state effettuate le misurazioni di lunghezza (in rosso), altezza (in giallo) e larghezza (in blu) del canale vertebrale (foto e modifiche di Camilla Benigno).

Una volta ricavate tutte le misure necessarie, i dati sono stati riportati in un foglio Excel e per ogni vertebra è stata calcolata la superficie del canale utilizzando la formula per il calcolo dell'area di un'ellisse:

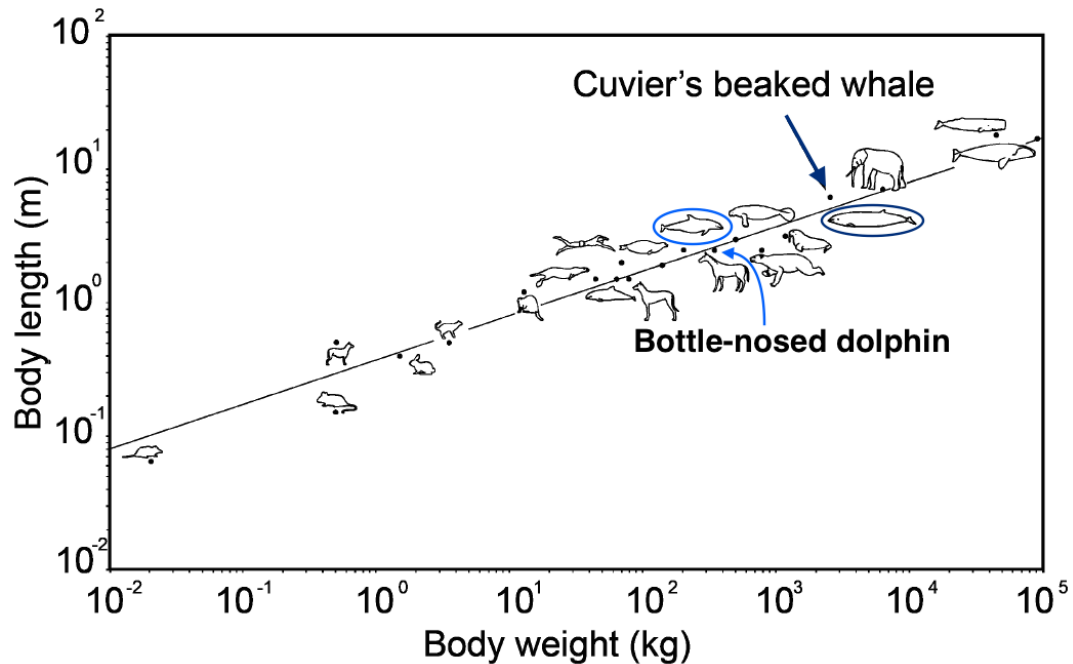
$$A = (\text{semiasse maggiore} * \text{semiasse minore}) * \pi.$$

Il semiasse maggiore è rappresentato dalla metà della larghezza, il semiasse minore dall'altezza e il valore di  $\pi$  è pari a 3.14. Dalle singole superfici è stato ricavato il valore medio, il quale è stato poi moltiplicato per la lunghezza totale della colonna vertebrale allo scopo di ottenere il volume totale del canale vertebrale per ogni individuo. Il volume è stato, quindi, calcolato approssimando la superficie ellittica reale del canale ad una circolare; inoltre, poiché lo spazio occupato dal canale nelle vertebre caudali era di dimensioni molto ridotte, queste non sono state tenute in considerazione nel calcolo delle superfici e dei volumi.

Arrivati a questo punto, partendo dal presupposto che la relazione lunghezza-peso dello zifio è maggiore di quella di un tursiope (Rommel *et al.*, 2006), ci aspettiamo che i volumi del suo canale vertebrale e, di conseguenza, delle sue reti mirabili midollari rispettino tale proporzione. Pertanto, sono stati utilizzati i dati relativi a *Tursiops truncatus* (Brocca, 2016) per ricavare una stima del volume di sangue che scorre nelle reti di *Z. cavirostris* ed è stata impostata la seguente proporzione:

$$\text{Canale tursiope} : \text{Canale zifio} = \text{Sangue tursiope} : \text{Sangue zifio}$$

Nell'equazione sono stati inseriti i valori volumetrici medi del canale vertebrale e del sangue dei tre tursiopi analizzati da Brocca (2016) e la media aritmetica dei volumi del canale vertebrale dei tre esemplari di zifio, pertanto l'incognita da ricavare risulta essere il volume di sangue dello zifio.



**Figura 2.4** - Rappresentazione grafica della relazione allometrica fra lunghezza e peso per alcune specie di mammiferi, sia marini che terrestri. Viene evidenziato il confronto fra *Z. cavirostris*, in blu, e *T. truncatus*, in azzurro (Rommel *et al.*, 2006; modificato da Camilla Benigno).

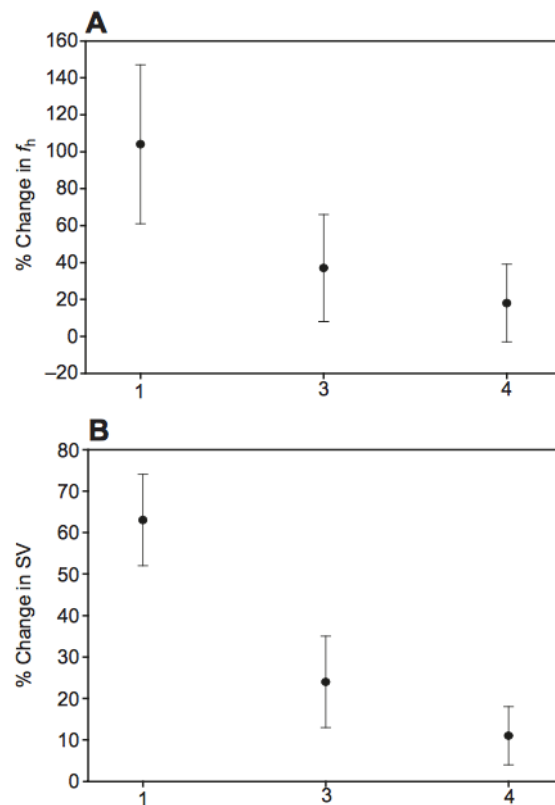
## 2.6 Elaborazione del foglio di calcolo Excel

Il passaggio successivo al calcolo dei volumi è stato quello di elaborare una simulazione della distribuzione del sangue all'interno dell'organismo di *Z. cavirostris*. Non essendoci dati in bibliografia per quanto riguarda l'*heart rate* (HR) e lo *stroke volume* (SV), ovvero l'eiezione cardiaca ad ogni battito, di questa specie, sono stati usati come punto di partenza i valori di HR e SV relativi a *T. truncatus*, utilizzati anche da Brocca (2016) e precedentemente calcolati da Miedler *et al.* (2015). La simulazione è stata sviluppata in tre passaggi:

1. Calcolo della correlazione tra HR e SV per ogni unità di tempo (1 minuto);
2. Simulazione delle condizioni fisiologiche in superficie, in fase di pre-immersione;
3. Simulazione delle condizioni fisiologiche e del progressivo rallentamento di HR durante l'immersione.

### 2.6.1 Correlazione tra *heart rate* e *stroke volume*

Nel 2015 Miedler *et al.* hanno condotto un esperimento per misurare *heart rate*, *stroke volume* e *output* cardiaco in 13 esemplari adulti di *T. truncatus* sotto sforzo, utilizzando un elettrocardiogramma transtoracico. Con i dati ricavati hanno elaborato graficamente la variazione percentuale di HR e SV a diversi intervalli di tempo (a 1, 3 e 4 minuti dopo l'inizio dell'attività fisica), come riportato in Figura 2.5.



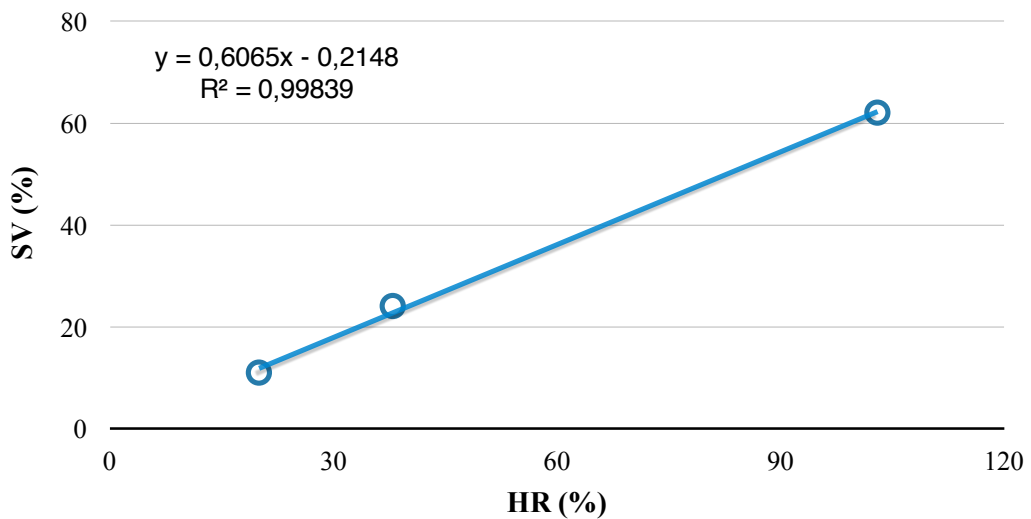
**Figura 2.5** - Variazione percentuale di *heart rate* (A) e di *stroke volume* (B) dopo 1, 3 e 4 minuti dall'inizio dell'attività fisica (Miedler *et al.*, 2015).

Tali variazioni sono espresse a partire da una condizione di *resting* (minuto 0), ovvero quando in media l'*heart rate* dell'animale è di circa 41 bpm e non vi è nessun aumento dello *stroke volume*. Le due variabili sono state messe in relazione e la loro correlazione è rappresentata in Tabella 2.3 e nel Grafico 2.1.

**Tabella 2.3** - Correlazione tra *heart rate* (%) e *stroke volume* (%) in relazione al tempo.

Tempo (min)	HR (%)	SV (%)
1	103	62
3	38	24
4	20	11

**Grafico 2.1** - Rappresentazione grafica della correlazione tra *heart rate* (%) e *stroke volume* (%) in relazione al tempo.



Essendo noti i valori di *heart rate* e di *stroke volume* in condizione di riposo (41 bpm e assenza di incremento di SV) e conoscendo le variazioni percentuali di HR sotto sforzo, riportate in Tabella 2.3, è stato possibile calcolare i valori reali di *heart rate*, espresso come battiti al minuto (bpm), mentre quelli di *stroke volume* sono

stati mantenuti in forma di variazione percentuale. La formula utilizzata per il calcolo è la seguente:

$$\mathbf{HRn \text{ (bpm)} = 41 + (41 * HRn/100),}$$

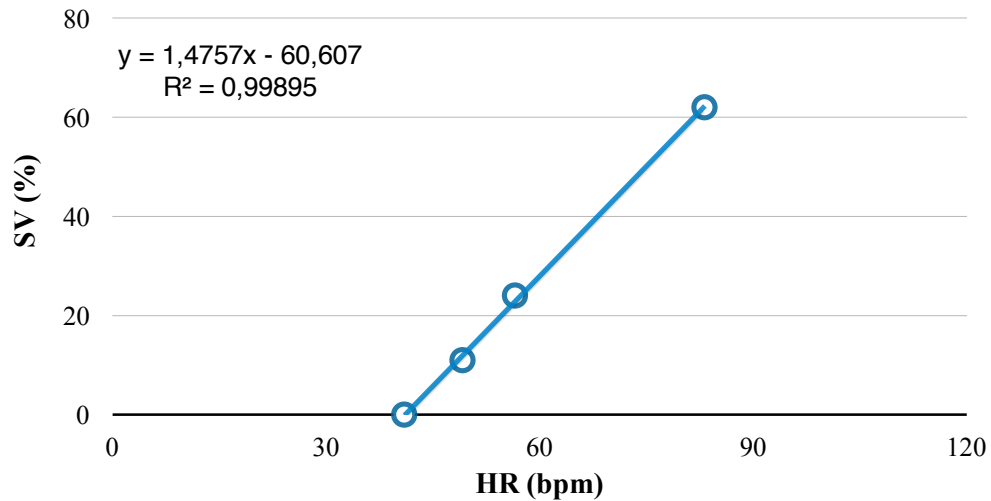
dove  $n$  rappresenta il l'intervallo di tempo  $n$ -esimo al quale è stato calcolato *l'heart rate* reale.

I risultati sono di seguito riportati in Tabella 2.4 e nel Grafico 2.2.

**Tabella 2.4** - Correlazione tra *heart rate* (bpm) e *stroke volume* (%) in relazione al tempo.

Tempo (min)	HR (bpm)	SV (%)
0	41	0
1	83.23	62
3	56.58	24
4	49.2	11

**Grafico 2.2** - Rappresentazione grafica della correlazione tra *heart rate* (bpm) e *stroke volume* (%) in relazione al tempo.



Dalla rappresentazione grafica (Grafico 2.2) si ottiene una retta, la cui equazione è  $y = 1.4757x - 60.607$ , con uno scarto quadratico medio (o deviazione standard) pari a 0.999 (che è indice di una buona precisione), dove la variabile indipendente “X” rappresenta l’*heart rate*, mentre la variabile dipendente “Y” indica lo *stroke volume*. Sostituendo all’incognita “X” dell’equazione i valori di *heart rate* da 100 bpm a 10 bpm, riducendo ogni step di 10 bpm, otteniamo i corrispondenti valori percentuali di variazione dello *stroke volume* rispetto alla condizione zero di riposo (Tabella 2.5).

**Tabella 2.5** - Valori percentuali di variazione dello *stroke volume* in base ai diversi valori di *heart rate*.

HR (bpm)	SV (%)
100	86.96
90	72.21
80	57.45
70	42.69
60	27.94
50	13.18
40	-1.58
30	-16.34
20	-31.09
10	-45.85

E' stato così esplicitato lo *stroke volume* in relazione alla diminuzione del numero di battiti e, quindi, alla profondità raggiunta dall'animale. In questo modo si è potuto procedere con i due step successivi, ovvero la simulazione del nuoto in superficie e in immersione.

### **2.6.2 Simulazione delle condizioni di superficie e d'immersione**

In questa fase dell'analisi il lavoro è stato svolto in due passaggi distinti, con lo scopo di determinare:

1. Il calcolo del volume totale di sangue circolante all'interno dell'organismo di *Z. cavirostris* e lo *stroke volume*;
2. Il bilancio sanguigno, ovvero la distribuzione del sangue attraverso i vari compartimenti.



### 2.6.2.1 Calcolo dei volumi

Partendo dal peso dell'individuo è stato possibile stabilire il volume totale di sangue dell'animale e lo *stroke volume*, ovvero la quantità circolante per unità di tempo (1 minuto). Non essendo disponibile il valore di peso di nessuno dei soggetti fin qui considerati (ID 217, ID 376, MSNM Ma4903 e MSNM Ma4905), è stato utilizzato quello di un altro individuo registrato nella Banca Tessuti, le cui informazioni sono di seguito riportate.

**Individuo:** ID 103

**Specie:** *Ziphius cavirostris*

**Sesso:** F

**Lunghezza (m):** 6.8

**Peso (kg):** 3254

**Località:** Irto (CR)

**Data di primo rilevamento:** 01.12.2011

**Condizioni:** morto da poco

Utilizzando i valori di lunghezza e peso di ID 103 e la lunghezza nota degli altri tre individui, con una semplice proporzione sono state ricavate delle stime di peso, di cui è stato calcolato il valore medio (Tabella 2.6), che è stato usato come riferimento per i calcoli successivi.

**Tabella 2.6** - Esemplari di *Ziphius cavirostris* utilizzati in questo studio e relativi pesi. I valori apostrofati sono stati ricavati tramite proporzione e sono, quindi, delle stime.

Soggetto	Peso (kg)
ID 103	3254
ID 217	2034*
ID 376	1460*
MSNM Ma4903	2254*
MSNM Ma4905	1580*
<b>Media</b>	<b>2116</b>

E' stato, quindi, ricavato il volume del sangue, sapendo che il suo peso rappresenta il 7.4% del peso corporeo (Reynolds & Rommel, 1999) e correggendo il risultato tenendo conto della densità del sangue rispetto all'acqua, considerata pari a 1.06 kg/L (Cutnell & Johnson, 1998).

Una volta determinato il volume sanguigno totale presente all'interno dell'organismo, è stato calcolato lo *stroke volume* (L/min), basandosi ancora una volta sui dati relativi a *T. truncatus* forniti da Miedler *et al.* (2015), secondo i quali lo *stroke volume* di un animale a riposo è pari a  $0.788 \pm 0.135$  mL per ogni kg di peso corporeo.

L'equazione risultante è la seguente:

$$\text{Stroke volume (mL/min)} = (\text{SV a riposo} + \text{incremento \% SV}) * \text{HR.}$$

Applicando alla formula i valori relativi alle condizioni superficiali, ovvero tenendo conto dell'incremento percentuale di *stroke volume* sotto sforzo dato da un *heart rate* di 100 bpm (+86.96%), precedentemente calcolato e riportato in Tabella 2.5, ciò che si ottiene è:

$$\text{Stroke volume (mL/min)} = 0.788 \text{ mL/kg} + (0.788 \text{ mL/kg} * 0.8696) * 100.$$

E' stato così ricavato il quantitativo di sangue che circola in un minuto in un animale in condizioni di superficie.

E' stato calcolato un ulteriore valore, ovvero il rapporto fra lo *stroke volume* e il volume di sangue circolante al minuto all'*heart rate* di 100 bpm. Qualora questo rapporto risultasse essere maggiore di 1, questo significherebbe che ogni minuto il volume di sangue circola più di una volta; al contrario, se risultasse essere inferiore ad 1, implicherebbe che solo una parte del sangue viene messo in circolo. In una situazione in cui il rapporto fosse pari a 1, vorrebbe dire che il volume di sangue viene fatto circolare solo una volta.

### 2.6.2.2 Bilancio sanguigno

Ottenuti i valori dei volumi, si è passati alla fase finale dell'analisi, necessaria a determinare come tale quantità di sangue si distribuisca tra i diversi comparti dell'organismo dell'animale in condizioni di nuoto superficiale, secondo la cosiddetta perfusione minima. Questa è la quantità minima necessaria che deve essere perfusa dal corpo ad un determinato tessuto per permetterne il funzionamento.

Anche in questo caso, non essendoci dati su *Z. cavirostris*, è stato necessario fare riferimento a quelli relativi a *T. truncatus* e, in caso di mancata disponibilità di questi, a quelli di fisiologia umana. I valori sono stati in seguito corretti da Brocca (2016).

I comparti per i quali è stato possibile stabilire dei valori di perfusione minima sono: encefalo, apparato digerente, fegato, cuore, polmoni, rene, apparato scheletrico, *blubber* e cute, apparato muscolare. A questi è stata aggiunta un'ulteriore sede di allocamento, costituita dalle reti mirabili, le quali rappresentano una quota incognita nell'equazione di bilancio idrodinamico, rappresentata in Tabella 2.7.

**Tabella 2.7** - Equazione di bilancio idrodinamico.

Volume circolante =	Encefalo
	Apparato digerente
	Fegato
	Cuore
	Polmoni
	Rene
	Apparato scheletrico
	<i>Blubber</i> + cute
	Apparato muscolare
	<b>Reti mirabili</b>

Ciò che si propone di fare utilizzando questa equazione è, quindi, di determinare la distribuzione dei volumi di un animale durante il nuoto superficiale, in fase di pre-immersione, e di valutare eventuali eccessi o deficit di sangue circolante.

I valori relativi ai dati fisiologici utilizzati nell'analisi e i loro riferimenti bibliografici sono riportati in Tabella 2.8.

**Tabella 2.8** - Parametri base in un tursiope durante la fase di nuoto superficiale. I valori sono stati calcolati a partire da dati bibliografici.

<i>Heart rate</i>	100 bpm		<b>Bibliografia</b>
<i>Stroke volume</i>	0.788 mL/kg + 62%		Miedler <i>et al.</i> , 2015
<b>Comparto</b>	<b>% peso corporeo</b>	<b>mL/100g</b>	
Sangue	7.4	-	Reynolds & Rommel, 1999
Encefalo	0.8 <sup>4</sup>	50	Cozzi (unpublished); Hall, 2010
Apparato digerente	3.36	70	Slijper, 1979; Tomilin, 1967; Klinke <i>et al.</i> , 2012
Fegato	2.2	30	Slijper, 1979; Klinke <i>et al.</i> , 2012
Cuore	0.93	70	Slijper, 1979; Hall, 2010
Polmoni <sup>5</sup>	3.5	25	Slijper, 1979; Hall, 2010
Rene	1.1	360	Slijper, 1979; Hall, 2010
Apparato scheletrico	16	3	Slijper, 1979; Hall, 2010
<i>Blubber</i> + cute	30.9	3	Tomilin, 1967; Hall, 2010
Apparato muscolare	36	10 <sup>6</sup>	Ponganis, 2015; Jobsis <i>et al.</i> , 2001

<sup>4</sup> Il valore viene considerato come una media unitaria per i tursiopi adulti.

<sup>5</sup> Il dato è riferito al circolo bronchiale.

<sup>6</sup> Valore ricavato da studi sulla foca comune (*Phoca vitulina*) (Jobsis *et al.*, 2001).

In base a quanto riportato da Brocca (2016) sono stati necessari ulteriori passaggi per il calcolo del peso dell'intestino. Per maggiore chiarezza si riporta quanto è stato descritto in "Materiali e metodi": "[...] essendo nota la sua lunghezza, dopo il decesso dell'animale, espressa come percentuale rispetto alla lunghezza corporea (tenendo però conto del rilassamento post-mortale della muscolatura liscia intestinale, il quale causa un allungamento del tratto di circa il 200-300%) sia per il capodoglio sia per il tursiope (Slijper, 1979) ed essendo note le lunghezze corporee medie delle due specie, ma essendo noto il peso del pacchetto intestinale solamente nel capodoglio (Tomilin, 1967), è stato possibile impostare una proporzione che ha permesso di esprimere il peso del pacchetto intestinale del tursiope come percentuale rispetto alla lunghezza corporea.

Dopo aver quindi proceduto al calcolo del peso del pacchetto intestinale per 10 tursiopi della Banca Tessuti, di cui era noto il peso totale, si è potuto stimare con una buona correlazione che il peso del pacchetto intestinale nel tursiope sia circa il 3,36% del peso corporeo (Tabella 7).

Per ogni organo od apparato è stato calcolato quindi l'afflusso sanguigno minimo in base al peso."

Tali valori sono relativi alla situazione di nuoto superficiale, prima che l'animale si immerga.

Il passaggio successivo è stato quello di simulare come il volume del sangue si ridistribuisca nei vari compartimenti durante l'immersione e, quindi, in presenza del *diving reflex*.

La condizione di immersione è stata simulata attraverso progressive diminuzioni dell'*heart rate* da 100 bpm a 10 bpm, riducendola di 10 bpm ad ogni step, riportando per ogni fase il valore di *stroke volume* a riposo (uguale per tutti gli step), la variazione (incremento o decremento) percentuale di *stroke volume* e il volume di sangue circolante al minuto nell'organismo, ricavato tramite l'equazione per il calcolo dello *stroke volume* (cfr. "Calcolo dei volumi").

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Volume sanguigno della rete mirabile midollare

Dai dati ottenuti dalle vertebre dei tre esemplari di *Ziphius cavirostris* è stato possibile ricavare una stima del volume del canale vertebrale per ciascun animale. In Tabella 3.1 sono riportati i valori di lunghezza della colonna vertebrale, della superficie media e del volume del canale di ogni campione; è stato, inoltre, calcolato un valore volumetrico medio del canale vertebrale.

**Tabella 3.1** - Valori di lunghezza della colonna vertebrale, della superficie media e del volume del canale vertebrale dei tre esemplari di *Z. cavirostris*, per i quali è stato calcolato il volume medio del canale.

	<b>ID 217</b>	<b>MSNM Ma4903</b>	<b>MSNM Ma4905</b>
<b>Lunghezza (dm)</b>	23.9	20.03	11.26
<b>Superficie media (dm<sup>2</sup>)</b>	0.17	0.14	0.06
<b>Volume (dm<sup>3</sup>)</b>	4.02	2.86	0.67
<b>Media volume (dm<sup>3</sup>)</b>	<b>2.52</b>		

Tale valore medio è stato inserito nella proporzione per calcolare il volume di sangue contenuto nelle reti mirabili midollari dello zifio, ottenendo così la seguente equazione:

$$1.18 : 2.52 = 0.17 : X$$

1.18 e 0.17 rappresentano i valori medi calcolati rispettivamente per il volume del canale vertebrale e il sangue nelle reti mirabili midollari di *Tursiops truncatus* (Brocca, 2016). Il valore incognito, ovvero il volume di sangue contenuto nelle reti mirabili midollari dello zifio, è risultato essere pari a 0.36 dm<sup>3</sup>.

### 3.2 Distribuzione del sangue in superficie e in immersione

Vengono riportati i risultati ottenuti dalla simulazione elaborata con l'utilizzo del foglio Excel, con la quale è stato possibile calcolare il quantitativo di sangue circolante nell'organismo di *Z. cavirostris* e descrivere come si distribuisce il sangue nei diversi compartimenti.

#### 3.2.1 Calcolo dei volumi

Partendo dal peso medio corporeo calcolato sono stati ricavati il volume totale del sangue circolante all'interno dell'organismo, che è risultato essere pari a 147.72 L, e lo *stroke volume* ad un *heart rate* di 100 bpm (in condizioni di nuoto superficiale) del valore di 311.74 L/min. L'equazione è stata poi applicata anche agli altri step d'immersione ottenendo, quindi, i volumi di sangue circolanti nell'organismo ogni minuto a diverso *heart rate*.

In Tabella 3.2 sono riportati tutti i valori di variazione ottenuti per i diversi step d'immersione.

**Tabella 3.2** - Valori di variazione dello *stroke volume*, espressa sia in percentuale che in L/min.

HR (bpm)	SV a riposo	Variazione di SV (%)	Stroke volume (L/min)
100	0.788 * peso corporeo	86.96	311.74
90		72.21	258.41
80		57.45	210.1
70		42.69	166.58
60		27.94	128.06
50		13.18	94.38
40		-1.58	65.63
30		-16.34	41.87
20		-31.09	22.98
10		-45.85	9.03

Per quanto riguarda il rapporto fra lo *stroke volume* e il volume di sangue circolante al minuto, questo è risultato essere pari a 1.99, il doppio rispetto ad un mammifero terrestre a riposo (Brocca, 2016): essendo tale valore maggiore a 1, è evidente che nell'arco di un minuto il volume di sangue viene fatto circolare più di una volta. In particolare, questo indica che uno zifio, per ogni unità di tempo, è in grado di far circolare due volte il proprio volume di sangue, aumentando così la quantità di sangue che va ad irrorare i polmoni e ottenendo una massimizzazione della sua ossigenazione.

### **3.2.2 Bilancio sanguigno**

A questo punto, grazie all'equazione del bilancio idrodinamico, è stato indagato come il sangue viene distribuito nei compartimenti dell'organismo durante i vari step d'immersione, a diverso *heart rate*.

Per prima cosa, utilizzando i dati bibliografici relativi al tursiope (cfr. Tabella 2.8) e il peso medio stimato di uno zifio (2116 kg), è stato possibile ricavare il peso e i volumi d'irrorazione minimi di ciascun comparto a 100 bpm (quindi in condizioni di nuoto superficiale).

Il peso dei singoli compartimenti è stato calcolato tramite una semplice proporzione: ad esempio, il peso encefalico rappresenta lo 0.8% di quello corporeo, pertanto in uno zifio di 2116 kg la massa del cervello risulterà essere pari a 16.9 kg. Moltiplicando poi questo valore per quello dell'irrorazione minima ricavata dalla bibliografia è stato possibile ottenere il volume di irrorazione minima del comparto d'interesse.

I valori calcolati per tutti i distretti dell'organismo sono riportati in Tabella 3.3.



**Tabella 3.3** - Peso (in % e in kg), irrorazione minima, espressa in (L/min)\*kg, e volume di irrorazione minimo (prodotto di peso ed irrorazione minima) per ciascun comparto dell'organismo. I dati relativi ad encefalo e cuore sono evidenziati in giallo, in quanto i loro volumi d'irrorazione a 100 bpm vengono mantenuti fissi per tutti gli step d'immersione.

<b>Comparto</b>	<b>Peso (%)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Irrorazione minima [(L/min)*kg]</b>	<b>Volume irrorazione minimo (L/min)</b>
<b>Encefalo</b>	0.8	16.9	0.5	8.46
<b>Apparato digerente</b>	3.3	68.9	0.7	48.88
<b>Fegato</b>	2.2	46.6	0.3	13.96
<b>Cuore</b>	0.9	19.7	0.7	13.77
<b>Polmoni</b>	3.5	74.1	0.3	18.51
<b>Rene</b>	1.1	23.3	3.6	83.79
<b>Apparato scheletrico</b>	16	338.6	-	10.15
<b>Blubber + cute</b>	30.9	653.8	-	19.61
<b>Apparato muscolare</b>	36	761.8	0.1	76.17

Le quote di sangue destinate ad encefalo e cuore sono state poste come fisse e mantenute costanti nei calcoli per tutti gli step d'immersione a diverso *heart rate*. A questo punto, sottraendo la somma dei singoli volumi d'irrorazione dal valore assunto dallo *stroke volume* a 100 bpm, si è ottenuta la quota ignota che è stata assegnata alle reti mirabili, pari a 18.4 L/min.

La quota di sangue di reti mirabili è stata considerata fissa all'interno dell'equazione durante tutte le fasi di immersione: queste, infatti, sono da considerarsi delle riserve di sangue, il cui flusso viene fatto rallentare all'interno dei vasi sanguigni. In questo modo si ritiene che l'animale possa attingere da queste “bombole” di ossigeno in situazioni di necessità.

Inoltre, sono stati calcolati la diminuzione percentuale dello *stroke volume*, ovvero di quanto si riduce la circolazione rispetto alle fasi precedenti, e il deficit di sangue per ciascuno step, ad eccezione della fase di nuoto superficiale, dove entrambi le variabili assumono valore nullo.

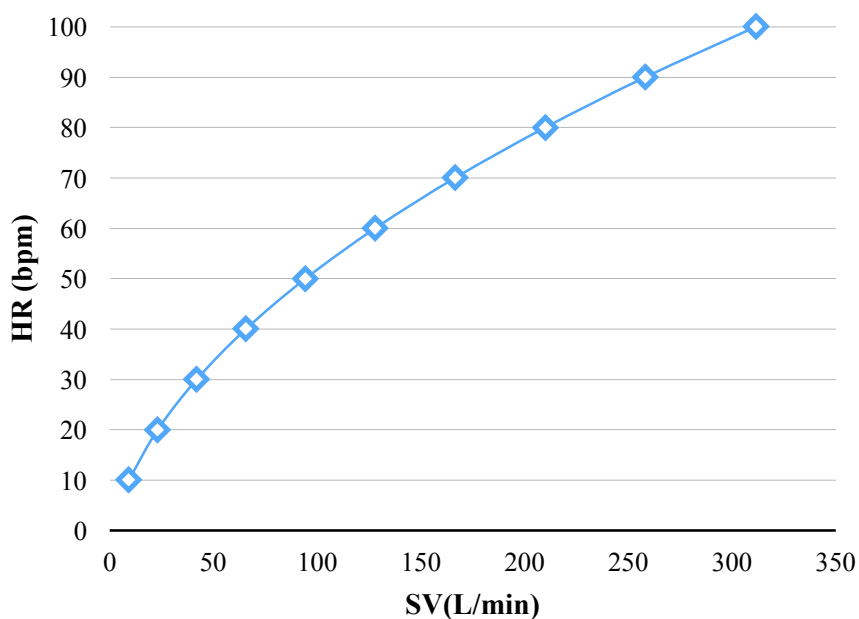
In Tabella 3.4 vengono riportati tutti i valori calcolati in questa fase dell'analisi.

**Tabella 3.4** - Distribuzione del volume sanguigno durante le diverse fasi d'immersione, a causa della riduzione dell'*heart rate*. Il volume d'irrorazione minimo è dato dalla somma delle quote fisse di sangue che irrorano encefalo e cuore riportate in Tabella 3.3. In rosso è evidenziato il valore di *heart rate* al quale si ipotizza entrino in gioco le reti mirabili.

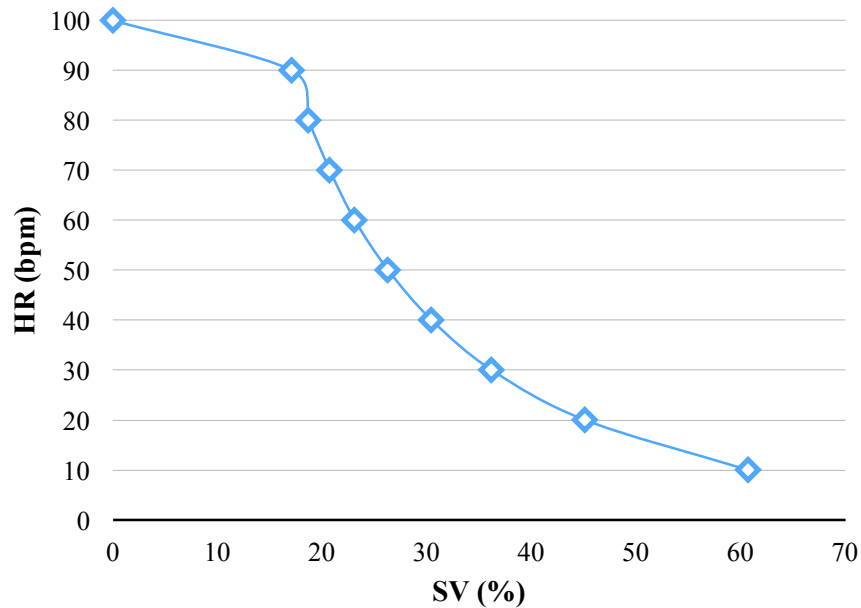
<b>HR (bpm)</b>	<b>SV (%)</b>	<b>Stroke volume (L/min)</b>	<b>Volume d'irrorazione minimo (L/min)</b>	<b>Reti mirabili (L/min)</b>	<b>Riduzione stroke volume (%)</b>	<b>Deficit sangue (L/min)</b>
100	86.96	311.74	22.23	18.40	0	0
90	72.21	258.41	22.23	18.40	17.10	-53.32
80	57.45	210.10	22.23	18.40	18.70	-101.65
70	42.69	166.58	22.23	18.40	20.72	-145.18
60	27.94	128.06	22.23	18.40	23.11	-183.68
50	13.18	94.38	22.23	18.40	26.30	-217.36
40	-1.58	65.63	22.23	18.40	30.46	-246.11
30	-16.34	41.87	22.23	18.40	36.20	-269.87
20	-31.09	22.98	22.23	18.40	45.12	-288.76
10	-45.85	9.03	22.23	18.40	60.70	-302.71

Come si evince dai risultati ottenuti dalla simulazione e dai Grafici 3.1 e 3.2, ad una graduale diminuzione dell'*heart rate* e, quindi, all'aumentare della profondità raggiunta corrispondono una riduzione dello *stroke volume* e un aumento del deficit di sangue. A 40 bpm, addirittura, la diminuzione percentuale dello *stroke volume* assume un valore negativo. Si nota come fino ai 20 bpm lo *stroke volume* (22.98 L/min) sia sufficiente a mantenere l'afflusso di sangue minimo ad encefalo e cuore (22.23 L/min) mentre, una volta raggiunti i 10 bpm, la situazione diventa critica, in quanto il volume di sangue pompato dal cuore al minuto (9.03 L) non garantisce più il mantenimento dell'irrigazione minima a tali comparti.

**Grafico 3.1** - Rappresentazione grafica della variazione dello *stroke volume* (in L/min) a diversi livelli di *heart rate*.



**Grafico 3.2** - Rappresentazione grafica della variazione percentuale dello *stroke volume* a diversi livelli di *heart rate*.



Per *T. truncatus* sono documentati livelli di *heart rate* inferiori a 20 bpm (Elsner *et al.*, 1966; Ridgway, 1976), pertanto si ritiene che in queste condizioni entrino in gioco le reti mirabili, le cui riserve sono state mantenute intatte fino a questo punto, svolgendo un ruolo di supporto all'ossigenazione degli organi principali. Poiché un animale come *Z. cavirostris* raggiunge profondità maggiori di un tursiope e potrebbe, quindi, presentare un numero minore di battiti al minuto, è logico supporre che tale meccanismo compensativo valga anche per questa specie, ipotesi supportata anche dal quantitativo stimato di sangue contenuto nelle reti mirabili. In questo caso il valore di *heart rate* a 10 bpm rappresenta, quindi, la soglia limite alla quale il sangue che viene pompato non è più l'unica fonte di ossigeno per quei comparti dell'organismo che devono mantenere un livello di irrorazione sanguigna minima costante, ovvero encefalo e cuore. In queste condizioni, pertanto, l'apporto sanguigno delle reti mirabili è fondamentale per la sopravvivenza dell'animale. Tuttavia, se simuliamo le condizioni di immersione tramite la riduzione dell'*heart rate* a 5 e 1 bpm (Tabella 3.5), possiamo notare che in entrambi i casi lo *stroke volume* è troppo ridotto per potersi sommare alla quota data dalle reti e compensare

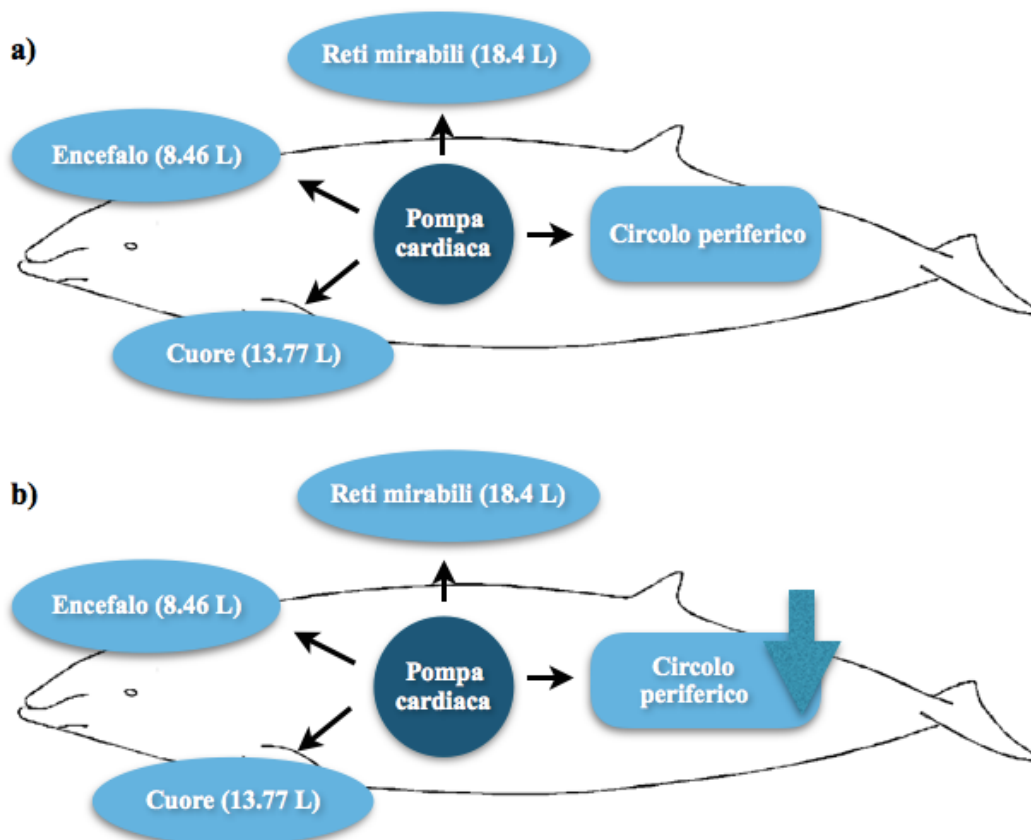
così il deficit di sangue. Inoltre, ad 1 bpm il volume di sangue pompato è quasi prossimo allo zero e il deficit sanguigno è pressoché pari allo *stroke volume* a 100 bpm.

**Tabella 3.5** - Simulazione della distribuzione sanguigna a 5 e 1 bpm.

<b>HR (bpm)</b>	<b>SV (%)</b>	<b>SV (L/min)</b>	<b>Volume d'irrorazione minimo (L/min)</b>	<b>Reti mirabili (L/min)</b>	<b>Riduzione <i>stroke volume</i> (%)</b>	<b>Deficit sangue (L/min)</b>
5	-53.23	3.41	22.23	18.4	85.17	-308.33
1	-59.13	0.68	22.23	18.4	97.03	-311.06

E' evidente, quindi, che una volta al di sotto di un determinato *heart rate* la nostra simulazione non è più in grado di descrivere il funzionamento del bilancio sanguigno all'interno dell'organismo di *Z. cavirostris*. Vi sono però dei fattori di cui bisogna tenere conto, i quali potrebbero aver influenzato i nostri risultati (cfr. "Discussione").

**Figura 3.1** - Schematizzazione della distribuzione del volume sanguigno in uno zifio in condizioni di nuoto superficiale (a) e in immersione (b). La freccia sta ad indicare che quando l'animale nuota in profondità il flusso sanguigno del circolo periferico si riduce a causa della vasocostrizione, mentre l'irrorazione ai due comparti principali e la quota data dalle reti rimangono costanti.



## 4. DISCUSSIONE

I prerequisiti sui quali si è retta tutta la fase analitica di questo studio (calcolo volumetrico e bilancio) sono il peso dell'animale (che permette di calcolare volume sanguigno e *stroke volume*) e l'*heart rate* (che insieme all'incremento percentuale dello *stroke volume* consente di simulare le condizioni di immersione).

Ciò che è emerso è che le reti mirabili svolgono un ruolo di apporto all'ossigenazione degli organi principali e che la relazione esistente fra la massa corporea e il volume sanguigno dello zifio è un elemento fondamentale per la comprensione della fisiologia di questa specie.

Di seguito vengono discussi in modo più dettagliato i risultati ottenuti per avere una visione globale delle informazioni che sono state ricavate dall'analisi dei dati.

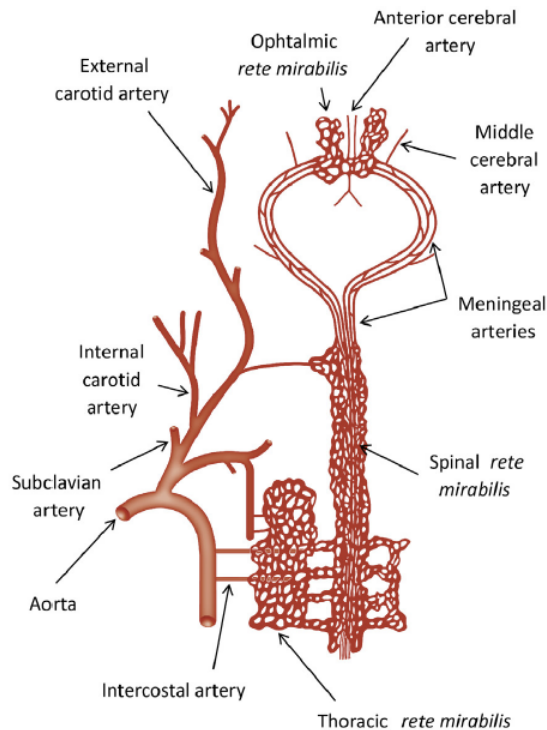
### 4.1 Volume sanguigno delle reti mirabili midollari

I campioni tissutali di *Ziphius cavirostris* in nostro possesso non ci hanno consentito, per qualità del tessuto e quantità, di ricavare informazioni dirette sulla struttura delle reti vascolari di utilità per l'elaborazione dei dati. Tuttavia, siamo stati in grado di reperire alcuni scheletri di zifio e ricavarne misure che sono state poi usate per operare un confronto con i dati relativi a *Tursiops truncatus*, risultato di uno studio precedente (Brocca, 2016).

Ciò che ci aspettavamo di trovare dalla proporzione fra i volumi del canale vertebrale e dei vasi sanguigni delle due specie (cfr. par. 2.5) era un maggior quantitativo di sangue rispetto al tursiope, viste le notevoli dimensioni del canale vertebrale dello zifio (rapporto lunghezza-peso maggiore), dato del resto intuitivo anche a seguito della semplice visualizzazione della preparazione anatomica. In effetti il valore medio dei tre campioni di zifio è risultato essere pari a  $2.52 \text{ dm}^3$ , mentre la media volumetrica degli esemplari di tursiope è di  $1.18 \text{ dm}^3$ . Ne consegue che la stima di sangue presente nelle reti mirabili midollari dello zifio è pari a  $0.36 \text{ dm}^3$  (0.36 L), poco più del doppio del volume stimato per *T. truncatus* (0.17 L). Ciò è coerente con l'ipotesi secondo la quale questi vasi sanguigni contengano una quantità di sangue tale da mantenere un'irrorazione continua ai compartimenti



principali dell'organismo (encefalo e cuore) durante la vasocostrizione del circolo periferico.



**Figura 4.1** - Rappresentazione dell'apporto sanguigno all'encefalo di un tursiopo, dove si possono osservare anche le reti mirabili toraciche e spinali (Cozzi *et al.*, 2017).

#### 4.2 Bilancio emo-dinamico

Un elemento fondamentale su cui si è basata tutta la nostra simulazione è il peso medio di *Z. cavirostris*, pari a 2116 kg; anche in questo caso si tratta di un valore che è il risultato di una stima (cfr. par. 2.6.2.1). Con una tale massa corporea ciò che ci si aspettava di ottenere è un volume ematico totale cospicuo, dato che il peso sanguigno in un cetaceo rappresenta il 7.4% di quello corporeo (Reynolds & Rommel, 1999). In base a questi dati e ai risultati ottenuti si è potuto calcolare che un esemplare di zifio di medie dimensioni possiede 148 litri di sangue.

Nell'intervallo di tempo di un minuto questo volume ematico, alle condizioni di nuoto in superficie a 100 bpm, viene fatto circolare due volte, al contrario di quanto accade nei mammiferi terrestri: infatti, è risultato che il rapporto fra tale valore e lo

*stroke volume* (pari a 311.74 L a 100 bpm) è circa 2. In questo modo è evidente come un animale come *Z. cavirostris* sia in grado di sfruttare il battito cardiaco per aumentare l'ossigenazione del sangue, facilitando la perfusione dei tessuti.

Si sottolinea che in questa fase non è stata tenuta in considerazione la capacità di espansione del ventricolo sinistro: infatti, ad un maggior volume della camera ventricolare corrisponde un aumento volumetrico del sangue che viene pompato dal cuore ad ogni battito e questo fattore potrebbe influire sui nostri calcoli. Si tenga però conto che lo spessore notevole delle pareti ventricolari del cuore dello zifio testimoniano una grande potenza ma indicano anche un certo limite fisico nella possibilità di espansione.



**Figura 4.2** - Cuore di zifio adulto (per concessione personale di Cozzi B).

Con l'equazione del bilancio emo-dinamico si è potuto ricavare (per semplice differenza matematica) una stima della quota di sangue data dalle reti mirabili, pari ad un volume che supera i 18 litri<sup>7</sup>. Questo dato si distanzia molto dal valore

---

<sup>7</sup> Si ricordi a questo proposito, per meglio inquadrare il dato, che l'intero volume ematico di un uomo di circa 80 kg è intorno ai 6 litri.

ricavato per il tursiope (Brocca, 2016), nelle cui reti è stato calcolato scorrere quasi 1/9 (1.96 L) del sangue di *Z. cavirostris*.

Come già precedentemente affermato, tale valore è stato mantenuto fisso per tutta la simulazione delle condizioni di immersione, così come l'irrorazione minima ai due organi principali. Al contrario, con la riduzione graduale dell'*heart rate* e, quindi, con la diminuzione dello *stroke volume*, si assiste ad una diversa distribuzione del flusso sanguigno verso gli altri apparati. Ad esempio, a 90 bpm è stata calcolata una riduzione del 17% dello *stroke volume*: di conseguenza vi sarà una vasocostrizione periferica corrispondente a tale percentuale e quindi organi splanchnici (apparato digerente, fegato e rene), *blubber*, cute, apparato scheletrico e muscolare riceveranno il 17% di sangue in meno, e così via per ciascuno step d'immersione<sup>8</sup>.

Pertanto, in presenza del *diving reflex*, l'organismo di questo animali va incontro ad un rallentamento metabolico (quasi una sorta di paradossale *stand by*), dove attività come la digestione e l'escrezione vengono limitate per compensare la diminuita ossigenazione. Per i muscoli, che risulterebbero quindi quasi esclusi dal circolo sanguigno, una perfusione minima viene comunque mantenuta (Ridgway & Howard, 1979). La funzionalità muscolare si mantiene anche grazie alla presenza di mioglobine a maggior affinità per l'ossigeno<sup>9</sup> (Meir *et al.*, 2008), che permettono di tollerare un maggior intervallo di tempo in apnea senza eccessivo accumulo di acido lattico durante il nuoto (ADL prolungato).

Tuttavia, quando il valore di *heart rate* si avvicina o raggiunge i 10 bpm si nota che il solo apporto della pompa cardiaca (9.03 L) non è sufficiente a mantenere l'irrorazione minima all'encefalo e al cuore (22.23 L – si veda a questo proposito la Tabella 3.3): è qui che entra in gioco la quota data dalle reti mirabili, calcolata essere pari a 18.4 L.

---

<sup>8</sup> Si ricorda comunque che il calcolo della vascolarizzazione renale è approssimativo e qui viene approssimato per semplificazione. Tuttavia il metabolismo renale di queste specie potrebbe richiedere, di default, un maggiore volume di perfusione nell'unità di tempo.

<sup>9</sup> La maggior quantità *carrier* della mioglobina presente nell'apparato muscolare dei mammiferi marini rispetto a quelli terrestri consente comunque *performance* muscolari impegnative (per esempio la spinta in risalita) anche in queste condizioni.

Va però precisato che tali vasi sanguigni non sono da considerarsi delle vere e proprie riserve (come nel caso delle milze accessorie), bensì svolgono un ruolo di buffer pressorio, in quanto il sangue al loro interno viene fatto scorrere in modo continuo e rallentato. Le cause che stanno alla base di questo rallentamento del flusso sono da ricercarsi sia nella diminuzione dell'*heart rate* sia nelle caratteristiche strutturali di queste reti; infatti, per la legge di Poiseuille, la velocità del flusso ( $Q$ ) di un liquido che scorre all'interno di un tubo (o dei vasi sanguigni, come in questo caso) è proporzionale alla pressione ( $p$ ) e al diametro del condotto ( $r$ ), mentre è inversamente proporzionale alla lunghezza ( $l$ ) e alla viscosità del fluido stesso ( $\eta$ ):

$$Q = [\Delta p * (r^4 / l \eta) * (\pi / 8)] \text{ (Schmidt-Nielsen, 1997).}$$

Pertanto, in seguito al collasso polmonare e all'incameramento del sangue nelle reti, quest'ultime indirizzano il flusso verso i due compartimenti d'interesse mantenendo un andamento lento e costante, relativamente ritmico e privo di interruzioni. La ritmicità e la spinta ematica in uscita dalle reti mirabili avviene sulla base di alcune costanti ineluttabili: ad ogni *downstroke* della pinna caudale aumenta la pressione endo-addominale, il che comporta (per le caratteristiche strutturali del comparto peritoneale dei cetacei) una spinta in avanti che si risolve in un aumento della convessità del diaframma verso la cavità toracica. Tale incremento della convessità diaframmatica aumenta a sua volta la pressione intratoracica in un ambiente ora rigido durante la discesa per via della compressione esercitata dalla pressione idrostatica sulle coste estremamente flessibili. L'impossibilità, in queste condizioni, di contro-espandere il torace ha come unica conseguenza possibile una spinta del sangue presente nelle camere cardiache e, nel caso di nostro interesse, verso le reti mirabili che rappresentano la via di uscita obbligata. Poiché le stesse reti mirabili hanno una relativa capacità intrinseca di espansione, data dalla loro natura elastica vascolare, ma si trovano in un ambiente chiuso a volume massimo costante (il canale vertebrale), il sangue che affluisce alle reti proveniente dal torace non può che essere forzatamente convogliato verso le reti mirabili generatrici del circolo arterioso cerebrale; nei cetacei tali reti sostituiscono le funzioni che nei mammiferi terrestri (uomo compreso) sono svolte dalle arterie carotidi interne (che nei cetacei si obliterano intorno alla nascita).

Riducendo ulteriormente l'*heart rate* fino a 5 bpm la nostra simulazione non è più in grado di spiegare il meccanismo compensatorio delle reti mirabili, poiché la somma della loro quota di sangue (18.4 L) con quella dello *stroke volume* a tale valore di *heart rate* (3.41 L) non sostiene un'irrorazione minima sufficiente ai due distretti principali (22.23 L). Dato che valori intorno (o addirittura inferiori) a 5 bpm sono plausibili per questa specie è necessario tenere in considerazione altri elementi che consentano di spiegare il bilancio ematico, l'ossigenazione e il mantenimento del metabolismo. In questo momento non è possibile identificare questi fattori, non solamente all'interno del presente impianto di tesi, ma anche nel panorama più vasto della letteratura relativa: molti autori arrivano ad ipotizzare un meccanismo di metabolismo anaerobico per spiegare il mantenimento delle funzioni cerebrali incluse quelle cognitive. Si può ritenere che in ogni caso le reti mirabili contribuiscano al meccanismo e il loro apporto riduca il gap esistente o almeno riconosciuto tra quanto si ritiene necessario e quanto è effettivamente possibile calcolare.

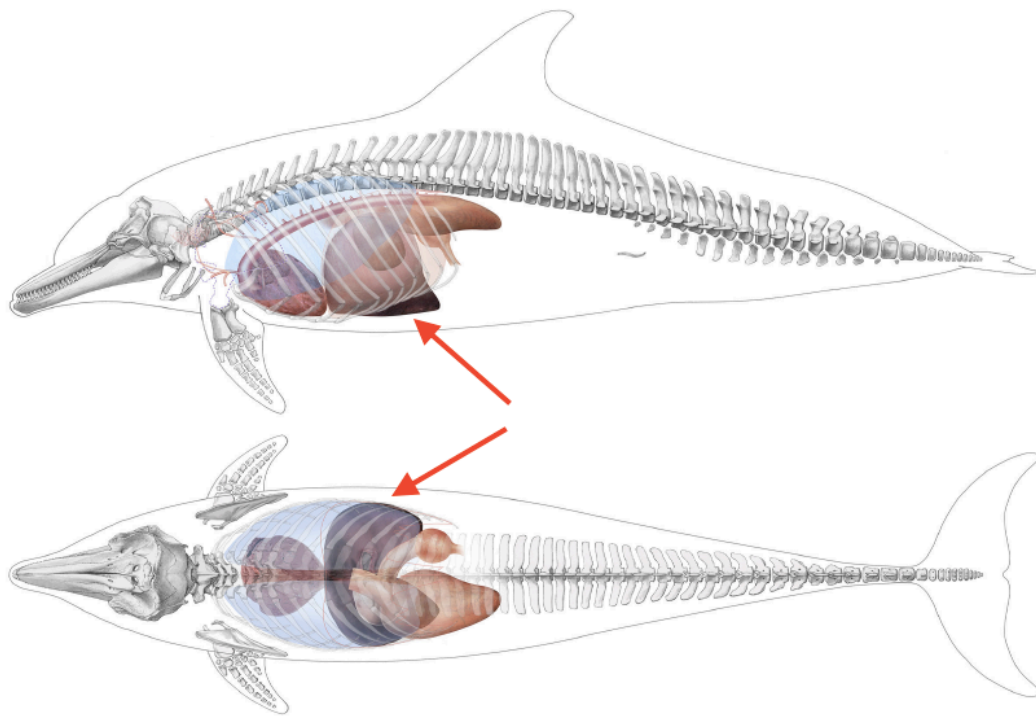
Come già anticipato nel capitolo precedente, bisogna anche tenere conto di alcuni fattori che potrebbero aver influenzato i nostri risultati; ad esempio l'utilizzo di dati relativi al tursiope, che si è rivelato necessario per ricavare delle stime, non essendoci purtroppo riferimenti *completi* sullo zifio. Come si è detto potrebbero esistere ulteriori meccanismi compensatori oltre a quelli finora indagati, i quali necessitano di futuri approfondimenti e studi.

Qui si sottolinea a questo riguardo il ruolo svolto dai seni epatici nel flusso sanguigno. È possibile che le ampie lacune venose che nei cetacei sostituiscono, aumentandone di molto la capacità, i seni epatici tipici di alcuni Cetartiodattili terrestri (ad es. il bovino) raccolgano il sangue venoso proveniente dai diversi tessuti all'interno degli strati immediatamente profondi alla parte più convessa della faccia diaframmatica del fegato. Quando l'animale riemerge<sup>10</sup> si assiste ad una distensione degli organi data dalla decompressione: il rilassamento del diaframma produce moderata compressione epatica che induce l'uscita del sangue venoso dalle

---

<sup>10</sup> Oppure durante il temporaneo *upstroke*, cioè il movimento all'in su della pinna caudale.

lacune e la sua ri-emissione nel circolo sanguigno per tornare ai polmoni ed essere riossigenato.



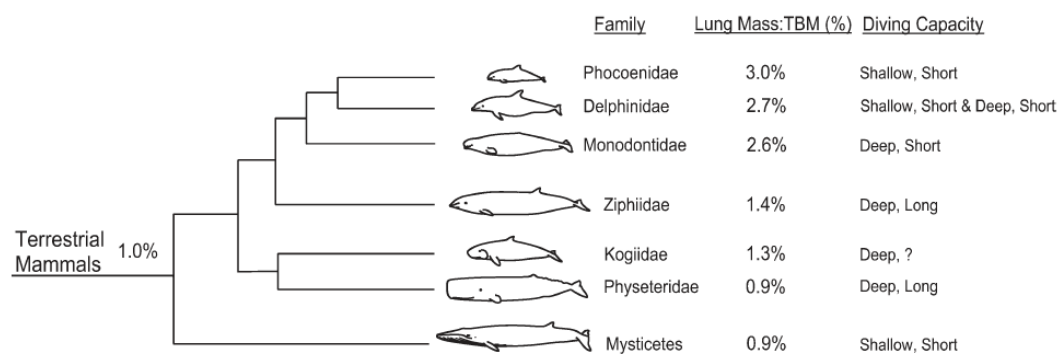
**Figura 4.3** - Visione laterale e dall'alto degli organi toracici in *T. truncatus*, dove viene messa in evidenza la posizione del fegato (Cozzi *et al.*, 2017; modificato da Camilla Benigno).

#### 4.3 Ulteriori adattamenti e prospettive future

Una tematica che non è stata presa in considerazione in questo studio, concentratosi sulla fluidodinamica, è quella dei rischi legati all'assorbimento dei gas. Un animale come *Z. cavirostris*, che è in grado di raggiungere quasi 3000 m di profondità per alimentarsi dei cefalopodi che costituiscono il cibo principale, è sottoposto a delle condizioni pressorie e ambientali normalmente incompatibili con la vita di un mammifero.

Abbiamo già discusso della natura tossica dell'ossigeno a 66 m di profondità e della patologia da decompressione causata dall'eccessivo assorbimento di azoto; alla base dello scambio gassoso tra alveoli polmonari e vasi sanguigni vi è la legge di Fick, secondo la quale il tasso di diffusione di un gas attraverso una membrana biologica dipende anche dallo spessore della barriera che li separa (Dejours, 1975).

Pertanto, l'assenza di scambi gassosi ad alte profondità è essenziale per la prevenzione di complicazioni di natura embolica (Ponganis, 2011). Un altro fattore che contribuisce a questo mancato scambio è la relazione esistente fra la massa corporea e quella polmonare: come si può osservare dalla Figura 4.4, infatti, i polmoni dei *deep-divers* sono più piccoli<sup>11</sup> poiché una minor capacità di immagazzinare aria è correlata ad una bassa probabilità di andare incontro a patologie da decompressione e narcosi. La maggior parte dell'ossigeno necessario al mantenimento dell'apnea è legato alle proteine *carrier* nel sangue e nei muscoli, di conseguenza l'aver una massa corporea elevata per un animale come *Z. cavirostris* rappresenta un notevole vantaggio rispetto alle specie di superficie (Pabst *et al.*, 1999; Ponganis *et al.*, 2003).



**Figura 4.4** - Rappresentazione schematica della relazione fra la massa corporea e il comportamento in immersione di alcune famiglie di cetacei con la loro capacità polmonare (Piscitelli *et al.*, 2010).

Questo è coerente con i dati ottenuti grazie al *tagging* di alcuni esemplari (Tyack *et al.*, 2006): infatti, è stato osservato che negli ultimi 100 m di risalita in superficie, dove la capacità di espansione dei gas è più rapida, la velocità del nuoto è spesso simile a quella esibita durante la discesa. Ciò suggerisce come questi animali non corrano il rischio di stress da decompressione ed embolia durante la normale attività d'immersione e che potrebbe esservi l'intervento di altri meccanismi compensatori.

<sup>11</sup> Si ricorda che il collasso polmonare avviene ad una profondità compresa tra i 50 e i 70 m dalla superficie del mare (Cozzi *et al.*, 2017).

Questo pattern comportamentale risulta pertanto in contrasto con l'ipotesi secondo cui una risalita lenta serve a ridurre i rischi legati ad una rapida decompressione, che è invece ciò che si verifica per un normale subacqueo.

Tuttavia, i ritrovamenti di carcasse spiaggiate di zifio, associate alla presenza di emboli gassosi nei tessuti, suggeriscono che la sindrome da decompressione si verifichi anche in questa specie (Jepson *et al.*, 2003); non è ancora chiaro se questa sia una diretta conseguenza degli effetti bioacustici dei sonar navali su questi animali (cfr. par. 1.3.3) in quanto vi è una forte necessità di ulteriori studi futuri, sia dal punto di vista anatomico che da quello comportamentale.

#### **4.4 Assunti e limiti dello studio**

E' importante ribadire che, data la forte carenza di dati sullo zifio, questo studio, per quanto esplorativo, presenta dei limiti. Per poter ottenere delle stime, infatti, sono stati fatti degli assunti, utilizzando dei valori relativi al tursiope, specie ampiamente più conosciuta e trattata in numerosi lavori.

Un altro aspetto da sottolineare è che per ottenere il valore del volume sanguigno delle reti mirabili (cfr. par. 3.1) sono state eseguite alcune correzioni preliminari. Per poter calcolare più facilmente i singoli volumi dei canali vertebrali è stato assunto che la forma del canale fosse elissoide, e non simile ad un tronco di cono come quella reale (dove la superficie delle due basi è diversa). Inoltre, i valori medi dei volumi del canale vertebrale e del sangue del tursiope che avevamo a disposizione erano stati calcolati utilizzando le vertebre cervicali, toraciche e lombari; pertanto, per standardizzare i nostri dati con quelli relativi al tursiope, anche nei nostri calcoli sono state considerate le vertebre delle tre regioni, sebbene nello zifio le reti mirabili midollari siano state trovate solo fino a metà del torace (Ross, 1989). Quest'ultimo aspetto è da tenere in considerazione, in quanto potrebbe essere causa di una sovrastima nei nostri risultati.



## 5. CONCLUSIONI

Il presente elaborato si pone come punto di partenza nello studio del ruolo delle reti mirabili di *Ziphius cavirostris*, specie la cui fisiologia è ancora largamente sconosciuta e sulla quale è necessario compiere futuri approfondimenti e ricerche. Contrariamente ad un animale come il tursiope, sul quale vi è la possibilità di ricavare dati *in vivo* e di compiere misurazioni di immersione in cattività, la raccolta di informazioni sullo zifio si limita ad analisi post-mortem su carcasse spiaggiate. Del resto, come riporta Mead (2009), i pochi esemplari ancora in vita che sono stati occasionalmente ritrovati spiaggiati e poi soccorsi non sono mai sopravvissuti al mantenimento in un ambiente controllato.

Pertanto, siamo pienamente consapevoli che i pochi campioni in nostro possesso e la carenza di dati bibliografici ci mettono nelle condizioni di fare solamente delle supposizioni e delle ipotesi sul ruolo e sulla regolazione delle reti mirabili: tuttavia, essendo questo il primo studio di tale portata su *Z. cavirostris*, non si esclude la possibilità di sviluppare ulteriori progetti allo scopo di implementare i nostri risultati. Infatti, sebbene il tema della problematica dello scioglimento dei gas non fosse oggetto di questa tesi, come già affermato, è auspicabile che esso venga per lo meno affrontato – se non risolto – in futuro. Non è ancora completamente chiaro come i cetacei siano in grado di tollerare condizioni ambientali normalmente incompatibili con la vita di un mammifero. Sarebbe a maggior ragione interessante condurre studi più approfonditi su queste specie e, in particolare, verificare allo stesso tempo se le reti mirabili svolgano ulteriori ruoli nella dinamica dei gas.

## 6. ALLEGATI

### 6.1 La Banca Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo



**Figura 6.1** - Homepage del sito online della Banca ([www.marinemammals.eu](http://www.marinemammals.eu)).

La Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo è un portale web che raccoglie tessuti provenienti da esemplari di cetacei spiaggiati lungo le coste italiane del Mediterraneo, grazie alla sinergia di diversi enti come l'Università di Padova, il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del territorio e del Mare, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e diverse associazioni italiane senza fini di lucro dedicate allo studio dei mammiferi marini.

Essa ha lo scopo di raccogliere e condividere informazioni riguardo diversi aspetti della biologia, genetica, anatomia, fisiologia, patologia ed etologia dei cetacei. Inoltre, promuove la conservazione e la protezione dei mammiferi marini che vivono nel Mediterraneo.

Tramite registrazione al sito [www.marinemammals.eu](http://www.marinemammals.eu) l'utente può usufruire dei vari servizi offerti dalla Banca, tra cui richiedere campioni di tessuti previa compilazione di un modulo elettronico firmato dal responsabile scientifico dell'indagine, che includa il titolo della ricerca in svolgimento, una sua breve descrizione, i propositi e le metodiche utilizzate.

## 6.2 Protocollo Ematossilina – Eosina

### Soluzioni

- A. Ematossilina di Harris: Ematossilina 2.5 g  
Alcool assoluto 25 ml  
Allume di potassio 50 g  
Acqua distillata 500 ml  
Sodio iodato 0.5 g  
Acido acetico glaciale 20 ml

Sciogliere l'ematossilina in alcool assoluto, aggiungere l'allume che è stato sciolto in acqua calda. Portare la miscela vicino al punto di ebollizione e aggiungere il sodio iodato. Raffreddare rapidamente e, quando la soluzione è sufficientemente fredda, aggiungere l'acido acetico.

- B. Eosina: Eosina 0.2 g  
Floxina 0.5 g  
Acqua distillata 40 ml  
Alcool 95° 160 ml

Dopo aver preparato la soluzione stock, aggiungere 600 ml di alcool 80° e 4 ml di acido acetico glaciale.

- C. HCl 1%

### Metodica

1. 5 minuti in xilolo 1;
2. 5 minuti in xilolo 2;
3. 5 minuti in xilolo 3;
4. 3 minuti in alcool 100°;
5. 3 minuti in alcool 100°;
6. 3 minuti in alcool 95°;
7. 3 minuti in alcool 70°;
8. Sciacquo in acqua distillata;
9. 5 minuti in ematossilina di Harris;
10. 5 minuti in acqua corrente;
11. Alcuni secondi in HCl 1%;

12. 5 minuti in acqua corrente;
13. Sciacquo in acqua distillata;
14. 30-40 secondi in eosina;
15. Scala ascendente degli calcoli;
16. Xiloli e montaggio.

### 6.3 Tabelle delle misure relative ai campioni di colonne vertebrali

**Tabella 6.1** - Misure relative alla colonna vertebrale del campione ID 217.

Vertebre	Altezza (mm)	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Superficie (mm <sup>2</sup> )
<b>C1 - C3</b>	60	80	45	3768
<b>C5</b>	55	55	10	2374,62
<b>C7</b>	60	65	10	3061,5
<b>T1</b>	55	70	35	3022,25
<b>T2</b>	40	30	100	942
<b>T3</b>	35	30	110	824,25
<b>L1</b>	30	25	110	588,75
<b>L2</b>	20	20	105	314
<b>L3</b>	20	15	105	235,5
<b>Ca1</b>	20	15	90	235,5
<b>Ca2</b>	10	15	65	117,75
<b>Ca3</b>	5	5	15	19,62

**Tabella 6.2** - Misure relative alla colonna vertebrale del campione MSNM Ma4903 (Vert. = Vertebre; Alt. = Altezza; Largh. = Larghezza; Sup. = Superficie; Lungh. = Lunghezza; Sup. media = Superficie media).

Vert.	Anteriore			Posteriore			Lungh. (mm)	Sup. media (mm <sup>2</sup> )
	Alt. (mm)	Largh. (mm)	Sup. (mm <sup>2</sup> )	Alt. (mm)	Largh. (mm)	Sup. (mm <sup>2</sup> )		
<b>C1-6</b>	50,21	55,45	2185,55	55,85	51,75	2268,83	73,45	2227,19
<b>C7</b>	54,08	59,69	2534,01	54,08	59,69	2534,01	11,12	2534,01
<b>T1</b>	50,38	66,55	2631,94	46,93	66,62	2454,28	27,99	2543,11

<b>T2</b>	52,58	68,01	2807,1 3	49,7 7	67,3	2629,37	42,27	2718,2 5
<b>T3</b>	49,41	69,13	2681,3 3	48,8 8	67,92	2606,14	51,95	2643,7 4
<b>T4</b>	50,05	63,53	2496,0 4	50,6 7	64,24	2555,21	64,56	2525,6 2
<b>T5</b>	48,92	68,24	2620,5 6	49,0 3	66,98	2577,96	59,92	2599,2 6
<b>T6</b>	51,66	58,31	2364,6 5	49,6 6	57,92	2257,9	69,26	2311,2 7
<b>T7</b>	47,55	48,05	1793,5 5	44,7 6	50,69	1781,07	77,72	1787,3 1
<b>T8</b>	48,02	37,84	1426,4	35,9	39,05	1100,49	86,24	1263,4 46
<b>T9</b>	49,01	34,17	1314,6 2	41,4 6	33,23	1081,51	93,94	1198,0 6
<b>L1</b>	42,31	30,72	1020,3 1	43,3 8	30,13	1026,02	99,38	1023,1 7
<b>L2</b>	40,64	30,32	967,28	30,6 4	28,09	675,63	107,67	821,45
<b>L3</b>	41,22	30,15	975,58	37,3 4	30,83	903,68	104,38	939,63
<b>L4</b>	39,49	27,76	860,55	29,9 6	27,31	642,29	111,95	751,42
<b>L5</b>	34,05	26,61	711,26	26,4 8	28,96	601,98	117,86	656,62 5
<b>L6</b>	36,09	27,83	788,44	24,6 3	28,41	549,29	116,23	668,87 6
<b>L7</b>	31,85	27,56	689,06	22,9 6	25,3	455,99	128,48	572,53
<b>L8</b>	30,17	25,89	613,16	25,5 9	23,19	465,84	134,71	539,5
<b>L9</b>	25,83	22,92	464,74	31,6 7	23,64	587,71	136,82	526,22
<b>L10</b>	22,89	19,97	358,83	17,2 1	22,95	310,05	141,28	334,44
<b>L11</b>	22,24	16,74	292,25	17,1 4	19,91	267,88	705	280,01
<b>Ca1</b>	19,29	14,94	226,23	13,7 9	16,33	176,77	144,87	201,59
<b>Ca2</b>	18,74	15,81	232,58	13,0 2	17,28	176,6	13,02	204,59
<b>Ca3</b>	14,11	11,08	122,72	14,9 2	15,54	182,01	138,31	152,36 6
<b>Ca4</b>	11,77	10,02	92,58	12,0 2	12,77	120,49	131,58	106,54
<b>Ca5</b>	11,33	10,53	93,65	9,6	11,87	89,45	117,91	91,55
<b>Ca6</b>	13,18	10,99	113,7	9,73	10,86	82,94	121,84	98,33

<b>Ca7</b>	12,26	10,34	99,51	11,7 4	7,46	68,75	115,79	84,13
<b>Ca8</b>	7,69	7,21	43,52	6,98	9	49,31	111,12	46,42
<b>Ca9</b>	11,12	10,58	92,35	4,86	6,28	23,96	97,08	58,15

**Tabella 6.3** - Misure relative alla colonna vertebrale del campione MSNM Ma4905 (Vert. = Vertebre; Alt. = Altezza; Largh. = Larghezza; Sup. = Superficie; Lungh. = Lunghezza; Sup. media = Superficie media).

Vert.	Anteriore			Posteriore			Lungh. (mm)	Sup. media (mm <sup>2</sup> )
	Alt. (mm)	Largh. (mm)	Sup. (mm <sup>2</sup> )	Alt. (mm)	Largh. (mm)	Sup. (mm <sup>2</sup> )		
<b>C1-3</b>	38,78	51,8	1576,9 1	45,26	45,94	1632,21	43,32	1604, 56
<b>T1</b>	39,02	42,58	1304,2 5	46,96	44,73	1648,91	46,16	1476, 58
<b>T2</b>	38,42	41,24	1243,7 9	42,72	46,11	1546,31	49,97	1395, 04
<b>T3</b>	34,84	32,53	889,67	40,89	36,74	1179,3	52,43	1034, 49
<b>T4</b>	35,94	34,52	973,91	35,67	31,89	892,95	53,88	933,4 3
<b>T5</b>	31,69	29,85	742,57	37,07	30,87	898,31	58,83	820,4 4
<b>T6</b>	34,82	30,75	840,51	35,71	30,23	847,42	56,06	843,9 6
<b>T7</b>	32,22	30,45	770,16	36,86	28,29	818,57	57,75	794,3 7
<b>T8</b>	31,42	27,78	685,18	36,5	30,33	869,03	60,12	777,1
<b>L1</b>	24,23	28,83	548,36 5	26,3	29,93	617,92	67,09	583,1 4
<b>L2</b>	22,69	25,15	447,96	29,32	25,19	579,78	69,67	513,8 7
<b>L3</b>	16,93	14,47	192,31	20,62	17,72	286,83	75,89	239,5 6
<b>L4</b>	13,65	9,98	106,94	12,4	11,7	113,88	74,85	110,4 1
<b>L5</b>	11,42	10,48	93,95	11,19	11,19	98,29	68,26	96,12
<b>L6</b>	8,13	8,13	51,88	7,93	7,93	49,36	63,6	50,62
<b>L7</b>	6,38	6,38	31,95	8,46	8,46	56,18	60,98	44,07

<b>L8</b>	9,2	9,2	66,44	8,87	8,87	61,76	66,47	64,1
<b>L9</b>	5,34	5,34	22,38	5,49	5,49	23,66	52,87	23,02
<b>L10</b>	4,07	4,07	13,04	4,51	4,51	15,97	47,75	14,48



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Ask-Upmark E (1935). The carotid sinus and the cerebral circulation. An anatomical, experimental, and clinical investigation, including some observations on the rete mirabile caroticum. *Acta Psychiatr. Neurol.* 6: 1–374.
2. Bagnoli P, Peruffo A, Costantino ML, Cozzi B (2011). The upper respiratory tract of dolphins. *Ital. J. Anat. Embryol.* 116(3): 159-164.
3. Berta A, Sumich J, Kovacs K (2015). *Marine Mammals: Evolutionary Biology* (Third Edition). Academic Press, San Diego, CA.
4. Bester MN (1975). The functional morphology of the kidney of the Cape fur seal, *Arctocephalus pusillus* (Schreber). *Madoqua Series II* 4: 69-92.
5. Bisailon A, Martineau D, St-Pierre M (1987). Anatomy of the heart of the beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Journal of Morphology.* 191(1): 89-100.
6. Blix A (2016). Adaptations to polar life in mammals and birds. *J. Exp. Biol.* 219(8): 1093-1105.
7. Brocca G (2016). Le reti mirabili dei cetacei. Un approccio biodinamico alla struttura e alle funzioni. Tesi di Laurea magistrale. Università degli Studi di Padova. AA 2015-2016. pp 1-125.
8. Butler PJ, Jones DR (1997). Physiology of diving of birds and mammals. *Physiol. Rev.* 77: 837-899.
9. Cagnolaro L, Cozzi B, Notarbartolo di Sciara G, Podestà M (2015). Fauna d'Italia. Mammalia IV. Cetacea. Calderini. pp 40-43, 185-196.
10. Calow P (1998). *The Encyclopedia of Ecology and Environmental Management*. Oxford, Blackwell Publishers.
11. Castro P, Huber ME (2010). *Marine Biology* (Eighth Edition). McGraw-Hill. pp 223-247.
12. Costa DP (2007). *Diving Physiology of Marine Vertebrates*. eLS.

13. Cozzi B, Mazzariol S, Podestà M, Zotti A (2009). Diving Adaptations of the Cetacean Skeleton. *The Open Zoology Journal*. 2(1): 34-42.
14. Cozzi B, Panin M, Butti C, Podestà M, Zotti A (2010). Bone Density Distribution Patterns in the Rostrum of Delphinids and Beaked Whales: Evidence of Family-Specific Evolutive Traits. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 293(2): 235-242.
15. Cozzi B, Huggenberger S, Oelschläger H (2017). Chapter 4: Diving: Breathing, Respiration, and the Circulatory System. In: *Anatomy of Dolphins. Insight into Body Structure and Function*. Academic Press. pp 91-131.
16. Cresswell G, Walker D, Pusser T (2007). *Whales & Dolphins of the North American Pacific: Including Seals and Other Marine Mammals*. WILDGuides Ltd. pp 104.
17. Curtis H, Barnes NS (2009). *Invito alla biologia*. Zanichelli.
18. Cutnell JD, Johnson KW (1998). *Physics (IV edizione.)* Wiley. pp 308.
19. Davis RW, Kanatous SB (1999). Convective oxygen transport and tissue oxygen consumption in Weddell seals during aerobic dives. *J. Exp. Biol.* 202: 1091-1113.
20. De Buffrènil V, Casinos A (1995). Observations histologiques sur le rostre de *Mesoplodon densirostris* (Mammalia, Cetacea, Ziphiidae): le tissu osseux le plus dense connu. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 16: 21–32.
21. Dejours P (1975). *Principles of Comparative Respiratory Physiology*. Amsterdam. Elsevier.
22. De Oliveira e Silva FM, Carvalho VL, Guimarães JP, Vergara-Parente JE, de Meirelles ACO, Marmontel M, Miglino MA (2014). Accessory spleen in cetaceans and its relevance as a secondary lymphoid organ. *Zoomorphol.* 133(3): 343-350.
23. Elsner R, Kenney DW, Burges K (1966). Diving bradycardia in the trained dolphin. *Nature*. 212: 407-408.

24. Elsner R, Pirie J, Kenney DD, Schemmer S (1974). Functional circulatory anatomy of cetacean appendages. In: Harrison RJ (ed.). *Functional Anatomy of Marine Mammals*, Volume 2. Academy Press, London. pp 143-159.
25. Fernández A, Edwards JF, Rodríguez F, Espinosa de los Monteros A, Herráez P, Castro P, Jaber JR, Martín V, Arbelo M. (2005). “Gas and fat embolic syndrome” involving a mass stranding of beaked whales (family *Ziphiidae*) exposed to anthropogenic sonar signals. *Vet. Pathol.* 42(4): 446-457.
26. Gray NM, Kainec K, Madar S, Tomko L, Wolfe S (2007). Sink or swim? Bone density as a mechanism for buoyancy control in early cetaceans. *Anat. Rec.* 290(6): 638-653.
27. Hall JE (2010). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (XII edizione). Saunders. U.S.A.
28. Hedges NA, Gaskin DE, Smith GJD (1978). Rencular morphology and renal vascular system of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* (L.). *Can. J. Zool.* 57: 868-875.
29. Heyning JE (1989). Cuvier’s beaked whale, *Ziphius cavirostris*. In: Ridgway SH, Harrison R (eds.). *Handbook of Marine Mammals* (Vol. 4). Academic Press, London. pp 289-308.
30. Heyning JE (2001). Thermoregulation in feeding baleen whales: Morphological and physiological evidence. *Aquat. Mamm.* 27(3): 284-288.
31. Heyning JE (2002). Cuvier’s Beaked Whale: *Ziphius cavirostris*. In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, CA. pp 305-307.
32. Heyning JE, Mead JG (2009). Cuvier’s Beaked Whale: *Ziphius cavirostris*. In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals* (Second Edition). Academic Press, San Diego, CA. pp 294-295.
33. Hooker SK, Fahlman A, Moore MJ, Aguilar de Soto N, Bernaldo de Quirós Y, Brubakk AO, Costa DP *et al.* (2011). Deadly diving? Physiological and

Behavioural Management of Decompression Stress in Diving Mammals. *Proceedings of the Royal Society B*. 279(1731): 1041-1050.

34. Houser DS, Howard R, Ridgway SH (2001). Can diving-induced tissue nitrogen supersaturation increase the chance of acoustically driven bubble growth in marine mammals? *J. Theor. Biol.* 213(2): 183-195.

35. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (2012). *Fisiologia* (III edizione). EdiSES-Napoli, Città di Castello.

36. Kooyman GL, Castellini MA, Davis RW (1981). Physiology of Diving in Marine Mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 43(1): 343-356.

37. Kooyman GL, Ponganis PJ (1997). The Challenges of Diving to Depth. *American Scientist*. 85: 530-539.

38. Kooyman GL, Wahrenbrock EA, Castellini MA, Davis RW, Sinnott EE (1980). Aerobic and anaerobic metabolism during voluntary diving in Weddell seals: evidence of preferred pathways from blood chemistry and behavior. *J. Comp. Physiol. B*. 138(4): 335-346.

39. Jepson P, Arbelo M, Deaville R, Patterson I, Castro P, Baker J, Degollada E, Ross H, Herráez P, Pocknell A, Rodríguez F, Howie F, Espinosa A, Reid R, Jaber J, Martin V, Cunningham A, Fernández A (2003). Gas-bubble lesions in stranded cetaceans. *Nature*. 425(6958): 575-576.

40. Jobsis PD, Ponganis PJ, Kooyman GL (2001). Effects of training on forced submersion responses in harbour seals. *J. Exp. Biol.* 204(22): 3877-3885.

41. Johnson M, Madsen PT, Zimmer WMX, Aguilar de Soto N, Tyack PL (2004). Beaked whales echolocate on prey. *Proc. R. Soc. London. B (Suppl.)* 271. pp S383-S386.

42. MacLeod C, Reidenberg J, Weller M, Santos M, Herman J, Goold J, Pierce G. (2007). Breaking symmetry: The marine environment, prey size, and the evolution of asymmetry in cetacean skulls. *Anat. Rec.* 290(6): 539-545.

43. Mead JG (1984). Survey of reproductive data for the beaked whales (Ziphiidae). In: Perrin WP, Brownell RL Jr, DeMaster DP (eds). *Reproduction in*

whales, dolphins and porpoises. Rep. Int. Whal. Commn. (special issue 6), pp 91–96.

44. Mead JG (1989). Beaked whales of the genus *Mesoplodon*. In: Ridgway SH, Harrison R (eds.). Handbook of Marine Mammals. London, Academic Press. pp 349-430.

45. Mead JG (2009). Beaked Whales, Overview (*Ziphiidae*). In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds.). Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition). Academic Press, San Diego, CA. pp 94-97.

46. Meagher EM, McLellan WA, Westgate AJ, Wells RS, Frierson D Jr, Pabst DA (2002). The relationship between heat flow and vasculature in the dorsal fin of wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. J. Exp. Biol. 205: 3475-3486.

47. Meir JU, Stockard TK, Williams CL, Ponganis KV, Ponganis PJ (2008). Heart rate regulation and extreme bradycardia in diving emperor penguins. J. Exp. Biol. 211: 1169-1179.

48. Michael Pannerton W (2013). The Mammalian Diving Response: An Enigmatic Reflex to Preserve Life? Physiology. 28(5): 284-297.

49. Miedler S, Fahlman A, Valls Torres M, Álvarez TÁ, Garcia-Parraga D (2015). Evaluating cardiac physiology through ecocardiography in bottlenose dolphins: using stroke volume and cardiac output to estimate systolic left ventricular function during rest and following exercise. J. Exp. Biol. 218(22): 3604-3610.

50. Muzi P, Bologna M (1999). Tecniche di immunoistochimica: un manuale operativo essenziale. Caleidoscopio italiano. 128. ISSN 0394 3291.

51. Ohizumi H, Kishiro T (2003). Stomach contents of a Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) stranded on the central Pacific coast of Japan. Aquat. Mamm. 29(1): 99-103.

52. Omura H, Fujino K, Kimura S (1955). Beaked whale *Berardius bairdi* of Japan, with notes on *Ziphius cavirostris*. Sci. Rep. Whales Res. Inst. 10: 89-132.

53. Ortiz RM (2001). Osmoregulation in marine mammals. *J. Exp. Biol.* 204: 1831-1844.
54. Pabst DA, Rommel SA, McLellan WA (1999). Functional anatomy of marine mammals. In: Reynolds III JE, Rommel SA (eds.). *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. pp 15-72.
55. Piscitelli MA, McLellan WA, Rommel SA, Blum JE, Barco SG, Pabst DA (2010). Lung size and thoracic morphology in shallow- and deep-diving cetaceans. *J. Morphol.* 271: 654-673.
56. Pfeiffer CJ, Viers VS (1995). Cardiac ultrastructure in the ringed seal, *Phoca hispida* and harp seal, *Phoca groenlandica*. *Aquat. Mamm.* 21:109-119.
57. Ponganis PJ (2011). Diving mammals. *Compr. Physiol.* 1: 517-535.
58. Ponganis PJ (2015). *Diving physiology of marine mammals and seabirds*. Cambridge University Press, Cambridge.
59. Ponganis PJ, Kooyman GL, Ridgway SH (2003). Comparative diving physiology. In: Brubakk A, Neuman TS (eds). *Bennett and Elliott's Physiology and medicine of diving*. Saunders Ltd., Edinburgh. pp 211-226.
60. Reynolds III JE, Rommel SA (1999). *Biology of marine mammals*. Smithsonian Institution Press. U.S.A.
61. Ridgway SH (1976). *Diving Mammals and Biomedical Research*. *Oceanus*. 19: 49-55.
62. Ridgway SH, Howard R (1979). Dolphin lung collapse and intramuscular circulation during free diving: evidence from nitrogen washout. *Science*. 203(4423): 1182-1183.
63. Romero A (2012): *When Whales Became Mammals: The Scientific Journey of Cetaceans From Fish To Mammals in the History of Science*. In: Romero A, Keith EO (eds). *New Approaches to the Study of Marine Mammals*. InTech.
64. Rommel SA, Costidis AM, Fernández A, Jepson PD, Pabst DA, McLellan WA, Houser DS, Cranford TW, van Helden AL, Allen DM, Barros NB (2006).

Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. *J. Cetacean Res. Manage* 7(3): 189-209.

65. Roskoski R Jr (1997). *Biochimica*. EdiSES - Napoli.
66. Ross GJB (1989). Ziphiidae. In: Walton DW, Richardson BJ (eds.). *Fauna of Australia*. Volume 1B Mammalia. AGPS Canberra.
67. Rosso M, Ballardini M, Moulins A, Würtz (2011). Natural markings of Cuvier's beaked whale *Ziphius cavirostris* in the Mediterranean Sea. *Afric. J. Mar. Sci.* 33(1): 45-47.
68. Santos MB, Pierce GJ, Herman J, López A, Guerra A, Mente E, Clarke, MR (2001). Feeding ecology of Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*): a review with new information on the diet of this species. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 81(4): 687-694.
69. Schmidt-Nielsen K (1997). *Animal Physiology: Adaptation and Environment* (Fifth Edition). Cambridge: Cambridge University Press.
70. Scholander PF, Irving L, Grinnell SW (1942). On the temperature and metabolism of the seal during diving. *J. Cell. Comp. Physical.* 19(1): 67-78.
71. Scholander PF, Schevill WE (1955). Counter-current vascular heat exchange in the fins of whales. *J. Appl. Phys.* 8: 279-282.
72. Schorr GS, Falcone EA, Moretti DJ, Andrews RD (2014). First Long-Term Behavioral Records from Cuvier's Beaked Whales (*Ziphius cavirostris*) Reveal Record-Breaking Dives. *PLoS ONE*. 9(3): e92633.
73. Slijper (1958). Organ weights and symmetry problems in porpoises and seals. *Archives Neerlandaises de Zoologie* 13: 97-113.
74. Slijper EJ (1979). *Whales* (Second Edition). Hutchinson, London.
75. Spragg RG, Ponganis PJ, Marsh JJ, Rau GA, Bernhard W (2004). Surfactant from diving aquatic mammals. *J. Appl. Physiol.* 96(5): 1626–1632.

76. Taylor BL, Baird R, Barlow J, Dawson SM, Ford J, Mead JG, Notarbartolo di Sciara G, Wade P, Pitman RL (2008). *Ziphius cavirostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T23211A9429826.
77. Thewissen JGM, Cooper LN, George JC, Bajpai S (2009). From Land to Water: the Origin of Whales, Dolphins, and Porpoises. *Evo Edu Outreach*. 2(2): 272-288.
78. Tomilin AG (1967). Mammals of the U.S.S.R. and adjacent countries. Israel program for Scientific Translations, Jerusalem.
79. Tyack PL, Johnson M, Soto NA, Sturlese A, Madsen PT (2006). Extreme diving of beaked whales. *J. Exp. Biol.* 209(21): 4238-4253.
80. Vardy PH, Bryden MM (1981). The kidney of *Leptonychotes weddellii* (Pinnipedia: Phocidae) with some observations on the kidneys of two other southern phocid seals. *J. Morphol.* 167(1): 13-34.
81. Walker D, Cresswell G (2008). Whales and Dolphins of the European Atlantic: The Bay of Biscay, English Channel, Celtic Sea and Coastal SW Ireland (Second Edition). WILDGuides. pp 38-39.
82. Williams TM, Haun JE, Friedl WA (1999). The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), part I: Balancing the demands of exercise for energy conservation at depth. *J. Exp. Biol.* 202: 2739-2748.
83. Williams TM, Zavanelli M, Miller MA, Goldbeck RA, Morledge M, Casper D, Pabst DA, McLellan W, Cantin LP, Kliger DS (2008). Running, swimming and diving modifies neuroprotecting globins in the mammalian brain. *Proc. R. Soc. B.* 275(1636): 751-758.
84. Wilmschurst P (1998). Diving and oxygen. *BMJ: British Medical Journal*. 317(7164): 996-999.



## 8. SITOGRAFIA

1. Animal Diversity Web:  
[www.animaldiversity.org/accounts/Ziphius\\_cavirostris](http://www.animaldiversity.org/accounts/Ziphius_cavirostris) (consultato il 12.09.2017)
2. Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo:  
[www.marinemammals.eu](http://www.marinemammals.eu) (consultato il 17.05.2017)
3. BBC Earth: [www.bbc.com/earth/story/20150115-extreme-divers-defy-explanation](http://www.bbc.com/earth/story/20150115-extreme-divers-defy-explanation) (consultato il 14.07.2017)
4. D-Sight: [www.dsight.eu](http://www.dsight.eu) (consultato il 28.07.2017)
5. ImageJ: [www.imagej.nih.gov/ij](http://www.imagej.nih.gov/ij) (consultato il 28.07.2017)
6. IUCN: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (consultato il 07.08.2017)
7. Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo (DBA): [www.atlanteanatcomp.unito.it](http://www.atlanteanatcomp.unito.it) (consultato il 12.09.2017)