



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
Facoltà di MEDICINA VETERINARIA
Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Citoarchitettura e caratteristiche neurochimiche
dell'archicorteccia del tursiope (*Tursiops truncatus*)

Relatore: Dott.ssa Antonella PERUFFO

Correlatori: Chiar.mo Prof. Bruno COZZI

Dott. Stefano MONTELLI

Laureando: Tiziano DOROTEA

N.Matr. 568294/MV

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

SOMMARIO

1.INTRODUZIONE	1
1.1 Sistematica	1
1.2 Caratteri morfologici dell'ordine dei Cetoartiodattili, sottordine Odontoceti	2
1.3 Caratteristiche morfologiche del teschio	3
1.4 Caratteristiche del Sistema Nervoso Centrale dei Cetacei	5
1.4.1 Volume dell'encefalo e girificazioni	5
1.4.2 Tratti distintivi delle strutture del Sistema Nervoso Centrale	7
1.5 Caratteristiche della corteccia cerebrale	10
1.5.1 Neocorteccia	10
1.5.2 Allocorteccia: Paleocorteccia e Archicorteccia	11
1.5.3 Laminazione della neocorteccia e suddivisione in lobi	12
1.5.4 Caratteristiche dell'allocorteccia: rinencefalo e lobo limbico	14
1.6 Caratteristiche del sistema limbico	17
1.7 Caratteristiche della formazione ippocampale	19
1.7.1 Settori della formazione ippocampale	20
1.7.2 Laminazione dell'ippocampo	22
1.7.3 Connessioni intrinseche ed estrinseche	24
1.7.4 Neurotrasmettitori nell'ippocampo	25
1.7.5 Tipi cellulari nell'ippocampo	26
2. Scopo della tesi	29
2.MATERIALI e METODI	31
2.1 Campionamento	31
2.2 Preparazione dei campioni per l'ottenimento delle sezioni istologiche	34
2.2.1 Protocollo di congelamento dei campioni	34
2.2.2 Taglio al criostato e allestimento vetrini	35
2.3 Colorazione istologica e analisi immunoistochimica	36
2.3.1 Colorazione di Nissl	36

2.3.2 Immunoistochimica	37
3.Osservazione vetrini e cattura immagini	42
3.RISULTATI	43
3.1 Valutazione della citoarchitettura della formazione ippocampale di tursiope (<i>T. truncatus</i>) in base alle colorazioni di Nissl	43
3.1.1 Fascia dentata	43
3.1.2 Ippocampo	46
3.1.3 Subiculum	54
3.2 Tipologie cellulari identificate nella formazione ippocampale	55
3.3 Indagine neurochimica	58
3.3.1 Parvalbumina	59
3.3.2 Calbindina	61
3.3.3 Calretinina	62
3.4 Caratterizzazione della distribuzione gliale nella formazione ippocampale	65
3.4.1 Marcaggi con metodo immunoenzimatico	65
3.4.2 Marcaggi in fluorescenza	68
4.DISCUSSIONE	69
5.BIBLIOGRAFIA	77

1. INTRODUZIONE

1.1 Sistematica

I Cetacei (come il delfino e l'orca), i Sirenidi (come il dugongo e il lamantino) e i Pinnipedi (come la foca e l'otaria) sono tre diversi gruppi di mammiferi placentati che si sono evoluti indipendentemente e adattati alla vita in ambiente acquatico (Rice, 2008).

I Cetacei sono stati inizialmente classificati come gruppo a sé stante; in seguito ad analisi morfologiche molecolari e biochimiche di fossili e specie viventi, sono stati inquadrati nel gruppo monofiletico dei Cetoartiodattili¹, ordine Cetacea.

L'ordine dei Cetacei è suddiviso in tre sottordini: Mysticeti, Odontoceti e Archeoceti. I Mysticeti includono 14 specie, divise in 4 famiglie, dotate di fanoni. Gli Odontoceti comprendono circa 74 specie divise in 10 famiglie e sono un gruppo molto eterogeneo per quanto riguarda le dimensioni e i caratteri morfologici del cranio, delle sacche aeree e del rostro, tutte queste specie possiedono denti. Gli Archeoceti sono oggi estinti, vivevano nell'Eocene (dai 55,8 ai 33,9 milioni di anni fa) e si distinguevano dai cetacei attuali per la presenza di narici (e non sfiatatoi) in posizione anteriore, e per la dentatura ancora parzialmente differenziata (Fordyce, 2008).

La specie oggetto di studio di questo lavoro di tesi è il tursiope (*Tursiops truncatus*), mammifero marino appartenente al sottordine degli Odontoceti, famiglia Delphinidae.

Il tursiope è senza dubbio il più conosciuto tra tutti i cetacei, è cosmopolita e si ritrova infatti nella maggior parte dei mari temperati e tropicali, sia in acque costiere che pelagiche. È riconoscibile per il corpo robusto, la pinna dorsale moderatamente incurvata, una colorazione dal grigio chiaro al grigio scuro con una fascia più chiara tra il melone e il corto rostro, anche la parte ventrale del corpo è più chiara; la lunghezza media dell'adulto va da 2,5 metri a circa 2,8 metri con variazioni dovute all'ambiente e alla temperatura delle acque (più l'acqua è fredda più sono grandi gli animali).

¹ Tra Cetacei e Artiodattili sono stati evidenziati molti caratteri sinapomorfi che hanno portato a definire questi due ordini come "fratelli" (sister groups in inglese) appartenenti al gruppo monofiletico dei Cetoartiodattili (sinapomorfi: "caratteri derivati", vale a dire condivisi da più gruppi. Avere caratteri sinapomorfi è indice di *monofilia*, cioè porta a considerare i membri di diversi gruppi come derivati da un unico antenato comune) (Forey *et al.*, 1993; LeDuc *et al.*, 1999; Thewissen *et al.*, 2001 e 2007).

Mediante l'analisi dei denti, condotta effettuando il conteggio degli strati di dentina e di cemento, è possibile determinare un'età approssimativa dei soggetti. Il tursiope può raggiungere e superare i 50 anni di età e le femmine sono mediamente più longeve dei maschi. La maturità sessuale è raggiunta tra i 5 e i 13 anni nella femmina, tra i 9 e i 14 nel maschio (Read *et al.*, 1993; Wells e Scott, 2008).

1.2 Caratteri morfologici dell'ordine dei Cetoartiodattili, sottordine Odontoceti

Gli Odontoceti sono omodonti, cioè provvisti di denti tutti uguali tra loro, caratteristica questa alla base della loro classificazione in un unico sottordine che ha invece un'elevata variabilità morfologica tra le specie che lo compongono.

Con il passaggio da una vita terrestre ad una esclusivamente acquatica, gli Odontoceti e più in generale tutti i Cetacei hanno subito nel corso dell'evoluzione una serie di adattamenti radicali nella conformazione morfologica dell'intero corpo.

Il corpo affusolato, idrodinamico, quasi completamente o totalmente glabro, la modifica degli arti anteriori, la notevole riduzione di quelli posteriori, lo sviluppo di una pinna caudale e una dorsale cartilaginee, l'isolamento termico garantito esclusivamente dal pannicolo adiposo sottocutaneo (*blubber*), lo sviluppo di alcune strutture particolari coinvolte nella ricezione o nell'emissione sonora², la presenza del "melone"³, struttura unica nel suo genere, non presente negli altri mammiferi, la profonda modificazione delle vie aeree superiori sono solo alcune modifiche a cui questi animali sono andati incontro per adattarsi al nuovo habitat (Cozzi, 2005; Soldevilla *et al.*, 2005; Bagnoli *et al.*, 2011; Butti *et al.*, 2011).

² Corpi adiposi sono presenti nelle cavità delle ossa mascellari, e hanno la funzione di canalizzare il suono in entrata verso i seni aerei che circondano l'orecchio medio.

³ Struttura caratterizzata da un complesso di tessuto connettivale denso e tessuto adiposo che ha la funzione di focalizzare il suono in uscita imprimendogli una direzione.

1.3 Caratteristiche morfologiche del teschio

Il teschio può essere diviso in due regioni topografiche: lo splancnocranio costituito da rostro e mandibola, e il neurocranio ovoidale che racchiude il cervello e sostiene il rostro.

La regione nasale é situata tra queste due componenti, nella parte mediale della testa. Durante la vita embrionale gli abbozzi di quelle che poi diventeranno le narici migrano dalla loro posizione originale (rostrale) nella parte centrale della testa orientandosi perpendicolarmente rispetto alla base del cranio.

La particolare conformazione del teschio, con una depressione sulla superficie dorsale, permette l'alloggiamento di alcune strutture particolari che vengono raggruppate nel "complesso epicranico" brevemente descritto di seguito. Dallo sfiatatoio le vie aeree subverticali passano nelle narici ossee situate al centro della depressione. Tre paia di sacchi aerei nasali comunicano con il tratto di passaggio delle vie aeree dallo sfiatatoio alla parte ossea: i sacchi vestibolari sono i più dorsali, subito sotto sono alloggiati i sacchi nasofrontali, infine i sacchi mascellari che si trovano dorsalmente alle ossa premaxillari, davanti alle coane. Il "melone", già descritto come struttura unica nel suo genere, è posizionato sopra al rostro e alla regione nasale davanti alle vie aeree verticali e per questo viene considerato componente del complesso epicranico.

L'orecchio presenta alcune particolarità legate alla percezione dei suoni in ambiente acquatico; le differenze maggiori riguardano il complesso bulla timpanica-petrosa, che è un'unità strutturale isolata composta dalle due principali ossa dell'orecchio in cui si localizzano le componenti dell'orecchio medio e interno. L'osso timpanico ha la caratteristica forma a bolla e l'osso petroso (o petroso) risulta in parte isolato dal resto del cranio per l'interposizione di tessuto connettivo denso e lasso, risultando in contatto diretto con l'osso squamoso (porzione del temporale) solo nella parte posteriore. L'intero complesso è inoltre circondato da seni aerei e da un plesso venoso ben sviluppato ed è sorretto da legamenti ben sviluppati che lo sospendono rispetto agli elementi ossei vicini. I seni aerei accessori del tubo faringo-timpanico sono complessi di sacchi aerei di cui la cavità dell'orecchio medio è il centro. Gli ossicini dell'orecchio medio hanno forma rotondeggiante e sono caratterizzati da un'elevata densità ossea (pachiosteosclerosi); la coclea è strutturalmente simile a quella degli altri mammiferi, mentre il sistema

vestibolare risulta ridotto o incompleto con canali semicircolari piccoli e sottili od occlusi (Rauschmann *et al.*, 2006; Sassu e Cozzi, 2007; Cozzi *et al.*, 2010).

Tutte le modifiche macroscopiche del teschio dei cetacei sono state definite da Miller (1923) nella “telescopia”, descritta nello specifico come il fenomeno di allungamento degli elementi rostrali (splancnocranio) e di spostamento dorso-rostrale degli elementi caudali. In altre parole, lo splancnocranio si allunga rostralmente ed il neurocranio subisce una compressione da cui, in veduta dorsoventrale, risulta più largo che lungo (Figura 1) (Miller, 1923; Rommel, 1990).

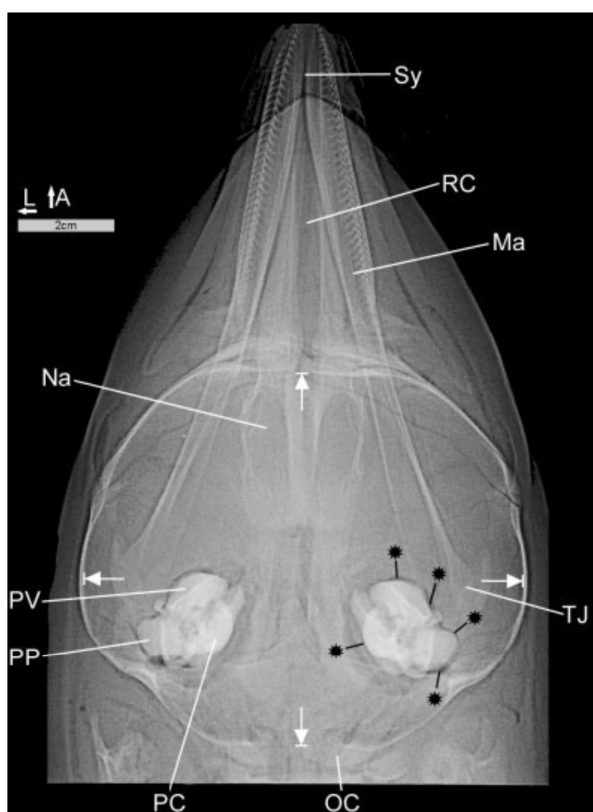


Figura 1: Radiografia digitale ad alta risoluzione di un cranio di neonato di *Stenella attenuata* (un odontoceta simile a *T. truncatus*), veduta dorsoventrale. Da notare i diametri del neurocranio, lo splancnocranio allungato e la maggior densità ottica di bulla (PP) e petroso (PV e PC) (Rauschmann *et al.*, 2006).

Le diverse ossa del cranio hanno subito notevoli modifiche nei Cetacei. Negli Odontoceti, più in specifico, le ossa premascellari e mascellari si sono allungate notevolmente a costituire il rostro e caudalmente vanno a sormontare e superare le ossa frontali, le ossa nasali sono vestigia poste nella depressione dorsale delle ossa frontali; a differenza dei Mysticeti dove l'osso mascellare si estende ventrocaudalmente, negli Odontoceti sia l'osso mascellare che premascellare si estendono più dorsocaudalmente (Rommel *et al.*, 2008).

1.4 Caratteristiche del Sistema Nervoso Centrale dei Cetacei

1.4.1 Volume dell'encefalo e girificazioni

Le modifiche subite dalle strutture ossee del cranio, unite agli adattamenti evolutivi fisiologici e comportamentali che il nuovo habitat ha portato, si manifestano in maniera marcata nell'organizzazione e specializzazione del Sistema Nervoso Centrale.

L'encefalo degli Odontoceti risulta di elevate dimensioni, sia in scala assoluta che relativa. Rispetto a quello umano che pesa circa 1.400 grammi, l'encefalo nei delfinidi può pesare dai 200 ai 2.000 grammi, nell'orca (*Orcinus orca*) e nel capodoglio (*Physeter macrocephalus*) si raggiungono valori compresi tra i 9.000 e i 10.000 grammi. Nel tursiope (*Tursiops truncatus*) l'encefalo pesa in media 1530-2030 grammi. In molte specie di Cetacei il rapporto tra peso dell'encefalo e peso del corpo (definito Quoziente di Encefalizzazione⁴) è migliore di quello delle scimmie antropomorfe con valori vicini a quelli riscontrati nell'uomo, confermando le notevoli dimensioni relative, oltre che assolute, dell'encefalo dei Cetacei.

Nel tursiope gli emisferi telencefalici sono voluminosi, arrotondati e alti⁵, con un profilo anteriore quasi piatto (Figura 2). In veduta ventrale l'encefalo ha una forma trapezoidale con il diametro trasverso maggiore di quello longitudinale, conseguenza questa del fenomeno della telescopia già citato parlando delle modifiche ossee nel teschio (Marino, 1998 e 2004; Cozzi, 2005; Oelschläger e Oelschläger, 2008).

Caratteristica peculiare dell'encefalo nei Cetacei è la complessità delle girificazioni della neocorteccia, una delle più elevate nei mammiferi, seconda solo a quella descritta nell'uomo, associata però a uno spessore esiguo della corteccia stessa (Rauschmann *et al.*, 2006).

⁴ Il Quoziente di Encefalizzazione (EQ) è un indice che quantifica quanto più grande o più piccolo sia un dato encefalo di animale in relazione al dato atteso per quell'animale di quella specifica taglia (dimensioni del corpo).

Se l'EQ è >1 l'encefalo è più grande di quel che ci si aspetta, se è <1 è più piccolo delle dimensioni attese.

⁵ Fenomeno del "towering": aumento insolito in senso dorsoventrale degli emisferi cerebrali accompagnato da un accorciamento in direzione rostrocaudale.

La caccia in ambiente acquatico, con la necessità quindi di inseguire le prede nelle tre dimensioni e l'intensificazione della comunicazione sociale e dei comportamenti locomotori complessi sono alcuni dei fattori che probabilmente hanno portato i Cetacei allo sviluppo di una superficie corticale così estesa al fine di "ricostruire" in qualche modo il nuovo ambiente di vita.

Le implicazioni ecofisiologiche e gli adattamenti strutturali del cervello sembrano riflettere in particolare la necessità di avere uno strumento uditivo funzionale in ambiente acquatico per l'ecolocalizzazione, la navigazione e la comunicazione.

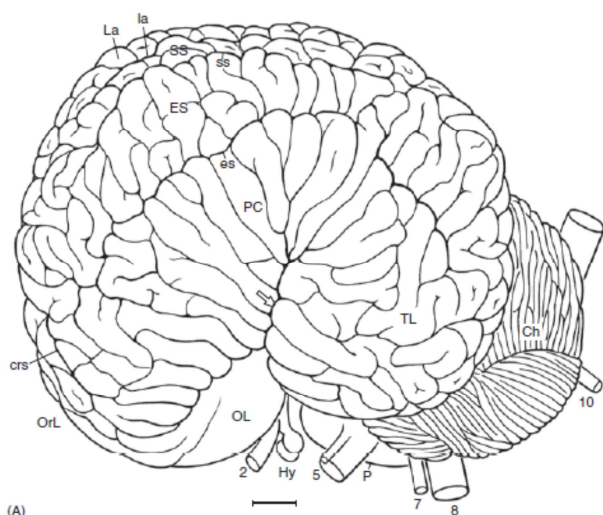


Figura 2: Encefalo di tursiopo (*T. truncatus*), veduta laterale. Si nota la particolare forma "a guantone da box" e l'elevata girificazione della corteccia (Oelschläger e Oelschläger, 2008).

Quindi, è probabile che il dover processare ed elaborare un'elevata mole di dati provenienti in primo luogo dal sistema acustico, ma anche da altri sistemi somatosensitivi e motori, abbia favorito la modificazione della corteccia cerebrale in una più sottile ma estremamente estesa materia corticale grigia con un'adeguata rete di connessioni (Oelschläger, 2008; Kern *et al.*, 2011).

1.4.2 Tratti distintivi delle strutture del Sistema Nervoso Centrale

In relazione al marcato aumento di volume della neocorteccia nei Cetacei anche i nuclei della base sono molto grandi; il talamo è ben sviluppato, specialmente il pulvinar che raggiunge i corpi genicolati laterale e mediale, quest'ultimo particolarmente sviluppato in relazione alle sue proiezioni nella corteccia acustica primaria e secondaria. L'amigdala è ben sviluppata, in particolare il nucleo laterale; il diencefalo è molto ampio e voluminoso; il complesso abenulare è grande, mentre manca la ghiandola pineale. La morfologia dell'ipotalamo è molto simile a quella degli altri mammiferi, anche se il corpo mamillare è abbastanza ridotto in relazione al minor sviluppo del fornice postcommisurale e al tratto mamillotalamico. Il cervelletto è molto grande con il verme infossato tra i due emisferi laterali, tra i suoi nuclei l'interposito (costituito da nucleo dell'embolo e nucleo globoso) è quello più rappresentato. Anche il ponte è ben rappresentato, il midollo allungato e il mesencefalo sono ripiegati, corti e spessi, risultando essere molto più voluminosi che negli altri mammiferi; i collicoli inferiori (caudali), legati a funzioni acustiche, sono più grandi di quelli superiori (rostrali).

Tutte le modifiche sopra elencate, sono dovute in parte alla correlazione di alcune di queste strutture con il sistema acustico e in parte all'aumento di dimensione di altri componenti implicati in diversi sistemi, in particolare il sistema trigeminale, i nuclei craniali premotori e motori del tegmento (Oelschläger e Kemp, 1998; Cozzi, 2005; Oelschläger e Oelschläger, 2008).

Anche il sistema ventricolare e le strutture di connessione interemisferiche hanno subito delle importanti modificazioni.

Il sistema ventricolare riflette il grado di sviluppo e differenziazione delle diverse parti del Sistema Nervoso Centrale nelle varie specie, e il diverso orientamento dell'asse cerebrale rispetto all'asse del corpo.

Il cambiamento delle dimensioni e della forma del sistema ventricolare dai mammiferi inferiori ai mammiferi più evoluti, riflette la generale mutazione e specializzazione dell'encefalo in risposta allo sviluppo di sistemi sensitivi e motori sempre più complessi nel corso dell'evoluzione. I mammiferi inferiori si interfacciano con l'ambiente principalmente attraverso il senso dell'olfatto, e questo si riflette nella predominanza delle

aree olfattorie dell'encefalo; salendo nella scala evolutiva gli emisferi telencefalici si espandono parallelamente ad un'aumentata importanza di vista e udito nella sopravvivenza. Queste modifiche si ripercuotono anche sul sistema ventricolare con un'espansione dei ventricoli laterali attraverso i corni inferiori, anteriori e posteriori all'interno delle porzioni di telencefalo sviluppate; nei Cetacei questo accade in particolare per il lobo temporale che in questi animali è voluminoso, corto e tozzo, con il corno inferiore del ventricolo laterale molto ampio; le strutture olfattorie al contrario sono molto ridotte o assenti (McFarland *et al.*, 1969).

La commissura anteriore non è ben rappresentata in conseguenza alla considerevole riduzione del sistema olfattivo. Infatti il corpo calloso, il principale collegamento tra la neocorteccia dei due emisferi, è piuttosto sottile se comparato alla massa totale dell'encefalo e questa riduzione non è compensata da altre strutture di connessione interemisferiche. Questo sembra essere giustificato dall'esistenza di una correlazione inversamente proporzionale tra connessioni e dimensioni dell'encefalo: in cervelli grandi, la densità neuronale della neocorteccia è inferiore e di conseguenza meno fibre nervose andranno a costituire il corpo calloso. Un'altra possibile spiegazione suggerisce una certa indipendenza tra i due emisferi con una percentuale minore di neuroni che stabiliscono connessioni interemisferiche⁶.

La commissura posteriore è al contrario ben sviluppata suggerendo la presenza di importanti connessioni dai nuclei del ponte e il cervelletto fino al talamo e ai nuclei pretettali controlaterali (Oelschläger e Oelschläger, 2008).

La marcata riduzione degli arti posteriori (residui pelvici) e le relative modifiche degli arti anteriori e di tutta la muscolatura assiale hanno portato a modifiche profonde nel sistema nervoso assiale con riduzione dei nervi spinali dorsali rispetto a quelli ventrali (Oelschläger e Kemp, 1998).

Per concludere il quadro delle modifiche che ha subito il Sistema Nervoso Centrale dei Cetacei e in particolare l'organizzazione delle varie strutture encefaliche, sottolineo di seguito alcune peculiari caratteristiche.

⁶ Studi dell'encefalogramma di delfini (*T. truncatus*) hanno riportato dati a sostegno di una certa indipendenza tra i due emisferi cerebrali, dimostrando che durante il sonno un emisfero mostrava onde rapide e a basso voltaggio (caratteristiche della veglia) mentre l'emisfero opposto mostrava onde lente e ad alto voltaggio (caratteristiche del sonno).

Introduzione

Nel mesencefalo si riconosce il nucleo ellittico, struttura di sostanza grigia probabilmente legata al controllo della muscolatura dei sacchi aerei nasali e presente in poche altre specie animali tra cui l'elefante asiatico (*Elaphans maximus*) e l'elefante africano (*Loxodonta africana*). La paleocorteccia è ridotta a causa della riduzione o scomparsa delle strutture olfattorie (bulbo olfattorio e tratto olfattorio). E' presente un lobo paralimbico che si sviluppa attorno al ben sviluppato lobo limbico, in posizione mediana in ciascun emisfero.

1.5 Caratteristiche della corteccia cerebrale

1.5.1 Neocorteccia

Come detto precedentemente una delle peculiarità dell'encefalo dei Cetacei è l'elevata complessità delle girificazioni della superficie cerebrale della neocorteccia accompagnata da uno spessore limitato della corteccia stessa che si attesta tra 1.2 e 1.85 millimetri nel tursiope (*T. truncatus*) contro i 2.63 millimetri nell'uomo. L'estensione della corteccia è comparabile a quella dei primati, ma, a differenza di questa, il I strato è relativamente spesso mentre il IV strato sembra essere assente o comunque difficile da distinguere chiaramente (si osserva la presenza di cellule granulari sparse in alcune aree cerebrali). Il risultato finale è una corteccia estesa ma sottile, caratterizzata inoltre da un'apparente "monotonia" nella conformazione degli strati che rimane la medesima in tutto l'encefalo.

Per queste ragioni l'encefalo dei Cetacei viene a volte definito come "un encefalo primitivo molto elaborato". Le caratteristiche morfologiche di un encefalo "primitivo" sono: la presenza di una scarsa cellularità delle lamine, il I strato spesso, presenza di neuroni piramidali nel II strato con proiezioni ad aree associative, una densa banda di grandi cellule piramidali riferito come strato IIIc/V, una scarsa granulazione dell'intera corteccia, il VI strato ben sviluppato (Glezer *et al.*, 1988).

L'organizzazione generale della corteccia cerebrale è comunque quella tipica dei mammiferi: si distinguono quindi una isocorteccia, isocortex o neopallium, e un'allocorteccia, allocortex o archipallium.

La maggior parte dell'isocortex è caratterizzata dall'aver sei strati⁷ riconoscibili con colorazioni istologiche tipo Nissl.

⁷ Solo due regioni dell'isocorteccia nell'adulto presentano una diminuzione o un aumento di questi strati: la corteccia frontale agranulare che manca del IV strato (strato granulare interno) che corrisponde alla corteccia motoria e la corteccia visiva primaria che mostra una chiara suddivisione del IV strato in tre ulteriori strati (IVa, IVb, IVc).

I sei strati riconoscibili sono: I.strato molecolare, II.strato granulare esterno, III.strato piramidale esterno, IV.strato granulare interno, V.strato piramidale interno, VI.strato delle cellule fusiformi.

1.5.2 Allocorteccia: Paleocorteccia e Archicorteccia

L'allocortex viene indicata generalmente come struttura trilaminare, ma ha un'organizzazione molto più variabile e può presentare struttura a bande di cellule singole fino a un'architettura complessa con più di dieci strati.

Secondo Filimonoff (1947) e Stephan (1975) l'allocortex dei mammiferi può essere suddivisa in paleocortex e archicortex.

La paleocortex comprende il bulbo olfattorio (primario e accessorio), la regione retrobulbare (o nucleo olfattorio anteriore), la regione peri-amigdaloidica, il tubercolo olfattorio, il setto (o regione settale), la banda diagonale e la regione prepiriforme. L'archicortex è costituita invece dalla formazione ippocampale, composta dal subiculum, dall'ippocampo e dalla fascia dentata. Inoltre si considerano come strutture di transizione facenti parte dell'archicorteccia anche il *præsubiculum*, *parasubiculum*, la corteccia entorinale, la corteccia retrospleniale, e la corteccia cingolata.

La parte rostrale dell'allocortex partecipa a funzioni olfattorie (viene indicata a volte con il termine "rinencefalo"), la parte più caudale e mediale fa parte invece del sistema limbico.

Le zone di transizione tra un tipo di corteccia e l'altro vengono indicate come *proisocortex* e *periallocortex* rispettivamente dal lato *isocortex* e *allocortex*, insieme possono essere

indicate come *mesocortex*. Filimonoff (1947) suddivide ulteriormente la *periallocortex* in *peripaleocortex*, comprendente la regione del claustrum, e *periarchicortex*, costituita da corteccia entorinale, *præsubiculare*, retrospleniale, e parte della corteccia cingolata (Figura 3) (Morgane e Jacobs, 1986; Zilles, 2004; Cozzi, 2005; Kern *et al.*, 2011; Butti *et al.*, 2011).

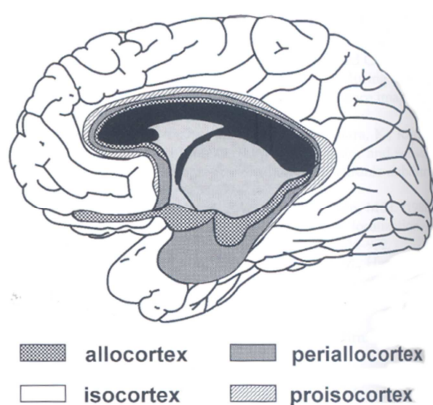


Figura 2: Veduta mediale dell'emisfero destro di un encefalo umano. Le principali suddivisioni della corteccia cerebrale (*isocortex*, *proisocortex*, *allocortex* e *periallocortex*) sono indicate con diversi colori. Modificato da Stephan 1975 (Zilles, 2004).

1.5.3 Laminazione della neocorteccia e suddivisione in lobi

Come detto sopra, i Cetacei mancano di un evidente IV strato della corteccia; nei mammiferi terrestri questo strato è quello che riceve primariamente le afferenze dal talamo (soprattutto nei primati) ed è costituito da piccoli neuroni multipolari. Nel tursiope sembra che queste afferenze talamocorticali arrivino in parte al I strato e in parte al III (Revishchin e Garey, 1991). Gli strati V e VI sono considerati sistema esecutivo, mentre il III presenta una densità neuronale elevata e per questo si attribuisce ad esso elevate capacità di connettività intrinseca. In altre parole il III strato può rappresentare un livello intermedio nei processi somatosensitivi e premotori utilizzando maggiormente connessioni orizzontali (trasmissione tangenziale) con altre aree corticali.

Il III e V strato della corteccia cerebrale degli Odontoceti sono i più sviluppati e sono costituiti da cellule piramidali di media grandezza, nel V strato sono inoltre presenti cellule piramidali molto grandi (cellule piramidali giganti). Il III strato può essere suddiviso in due (o tre) substrati: quello esterno costituito da cellule piramidali piccole e quello interno che è caratterizzato da cellule piramidali grandi, talvolta anche più voluminose di quelle del V strato, questi due strati a volte sono separati da uno strato acellulare.

Come l'organizzazione generale della corteccia, anche la suddivisione in lobi cerebrali dell'encefalo dei Cetacei è riconducibile al modello base dei mammiferi. Si distinguono un lobo frontale, uno parietale, uno occipitale, uno temporale e uno limbico, a cui si aggiunge il lobo paralimbico sempre in posizione mediale.

Esperimenti di elettrofisiologia hanno permesso di mappare la corteccia cerebrale nel tursiope (*T. truncatus*) individuando le diverse aree funzionali che risultano modificate rispetto alla classica disposizione ricostruibile nei mammiferi⁸: l'area motrice è situata nel lobo frontale, rostralmente al lobo paralimbico; l'area somatosensitiva si trova lateralmente e caudalmente all'area motrice separata da essa dal solco crociato, in posizione rostrale rispetto alle aree visiva ed acustica.

⁸ La mappatura corticale secondo Brodmann si basa su differenze citoarchitettoniche; nell'uomo sono state individuate 47 aree, queste vengono raggruppate in aree sensitive primarie (somatica, visiva, acustica), area motoria primaria, aree associative unimodali, aree associative multimodali.

Nel lobo temporale è localizzata la corteccia acustica che nei Cetacei è particolarmente sviluppata e si estende come ampia fascia dal vertice del lobo verso la parte caudale. Lateralmente a questa si distingue un'area acustica accessoria (indicata con "a.a." in Figura 4) mentre la corteccia visiva, molto meno rappresentata, si estende nella parte mediale dell'emisfero (Figura 4) (Oelschläger e Oelschläger, 2008; Zilles, 2004).

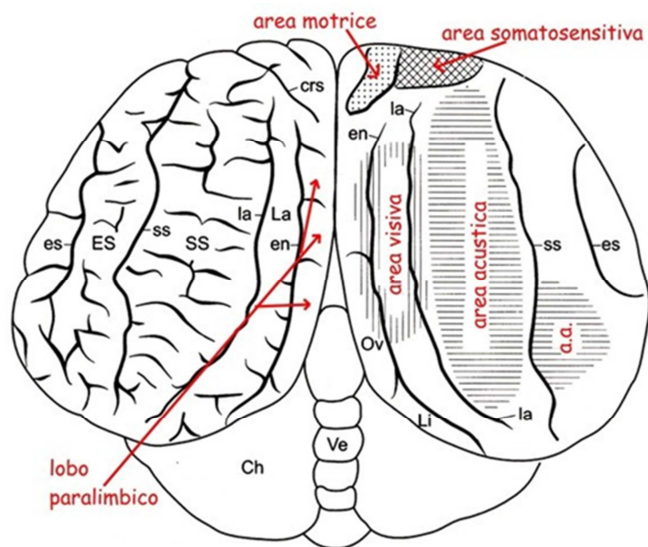


Figura 3: Aree corticali dell'encefalo di tursiopo (*T. truncatus*), veduta dorsale. Da notare la particolare posizione delle aree somatosensitiva e motrice e il notevole sviluppo dell'area acustica (Oelschläger e Oelschläger, 2008 modificato).

L'aumento o diminuzione delle aree cerebrali dipende dall'implicazione funzionale potenziale che esse hanno per l'organismo. Nel tursiopo (*Tursiops truncatus*) le strutture che aumentano sono la neocorteccia in generale e in particolare l'area acustica primaria e le aree acustiche secondarie, il ponte, il cervelletto, il pulvinar, il nucleo genicolato mediale, il mesencefalo e il midollo allungato. Tutte queste componenti neuronali risultano basilari per la sopravvivenza di questi animali in un ambiente particolare come è quello acquatico.

Al contrario il sistema olfattorio degli Odontoceti si presenta marcatamente ridotto ed anche il sistema limbico presenta alcune modifiche rispetto a quello dei mammiferi terrestri, mostrando vari gradi di sviluppo e differenziazione delle strutture che lo compongono.

1.5.4 Caratteristiche dell'allocorteccia: rinencefalo e lobo limbico

Per la sua elevata specializzazione e i suoi adattamenti e modifiche in relazione alla vita in ambiente acquatico, l'encefalo dei Cetacei risulta molto interessante soprattutto per la presenza di strutture rinencefaliche ben sviluppate, sia nell'archicortex sia nella paleocortex, in animali che sono obiettivamente microsmatici o anosmatici.

L'allocorteccia è la porzione filogeneticamente più antica del Sistema Nervoso Centrale e costituisce il sistema olfattorio e limbico. Più in particolare nella parte basale e rostrale degli emisferi telencefalici essa è costituita da paleocorteccia ed è implicata nella ricezione ed elaborazione degli stimoli olfattivi, è indicata anche come "rinencefalo". Nel corno inferiore del ventricolo laterale all'interno del lobo temporale essa è formata invece da archicorteccia, è principalmente rappresentata dalla formazione ippocampale e costituisce il centro del sistema limbico.

L'allocortex è caratterizzata da un minor numero di lamine della corteccia. Vengono infatti descritti solo tre strati (contro i sei della neocorteccia) che sono lo strato molecolare (I strato), lo strato cellulare (II strato) e lo strato polimorfo (III strato). Nelle aree di transizione si nota come il II strato dell'allocorteccia si differenzi nel II e III strato della neocorteccia e il III strato dell'allocorteccia si divide in V e VI. Il IV strato è rappresentato nelle aree di transizione da una lamina acellulare (*lamina dissecans*, vedi oltre) e rimane come tale o diventa difficile da distinguere nella neocorteccia.

Archicorteccia

Nella maggior parte dei mammiferi l'archicorteccia si estende ad arco lungo il bordo di ciascun emisfero cerebrale a stretto contatto con il corpo calloso, essa viene suddivisa in quattro settori denominati subcalloso, sopracallosa, retrospleniale e temporale (Figura 5).

Questi settori hanno uno sviluppo diverso nelle diverse specie: negli animali iperosmatici, come i roditori, l'ippocampo dorsale (sopracallosa) è ben sviluppato e differenziato, nei mammiferi microsmatici o anosmatici, come primati e cetacei (in particolare gli Odontoceti), è il settore temporale quello più sviluppato, mentre le altre aree risultano ridotte o rudimentali (Jacobs *et al.*, 1979; Oelschläger, 2008).

Il notevole sviluppo del lobo temporale provoca alcune modifiche nella disposizione delle strutture mediali olfattorie e limbiche. In particolare l'ippocampo, insieme alla fascia dentata, si trova ad essere ruotato di 90° in più rispetto a quanto accade nell'uomo e in altri mammiferi. Quindi nel tursiope (*T. truncatus*) l'ippocampo non si proietta nel ventricolo e la forma di quest'ultimo, in sezione coronale, risulta triangolare; inoltre il piano passante per il solco ippocampale, orizzontale nell'uomo, è quasi verticale nel tursiope. Questo avviene perchè in questa specie il notevole sviluppo degli emisferi si accompagna una relativa riduzione delle strutture ippocampali accentuando l'effetto finale (McFarland *et al.*, 1969).

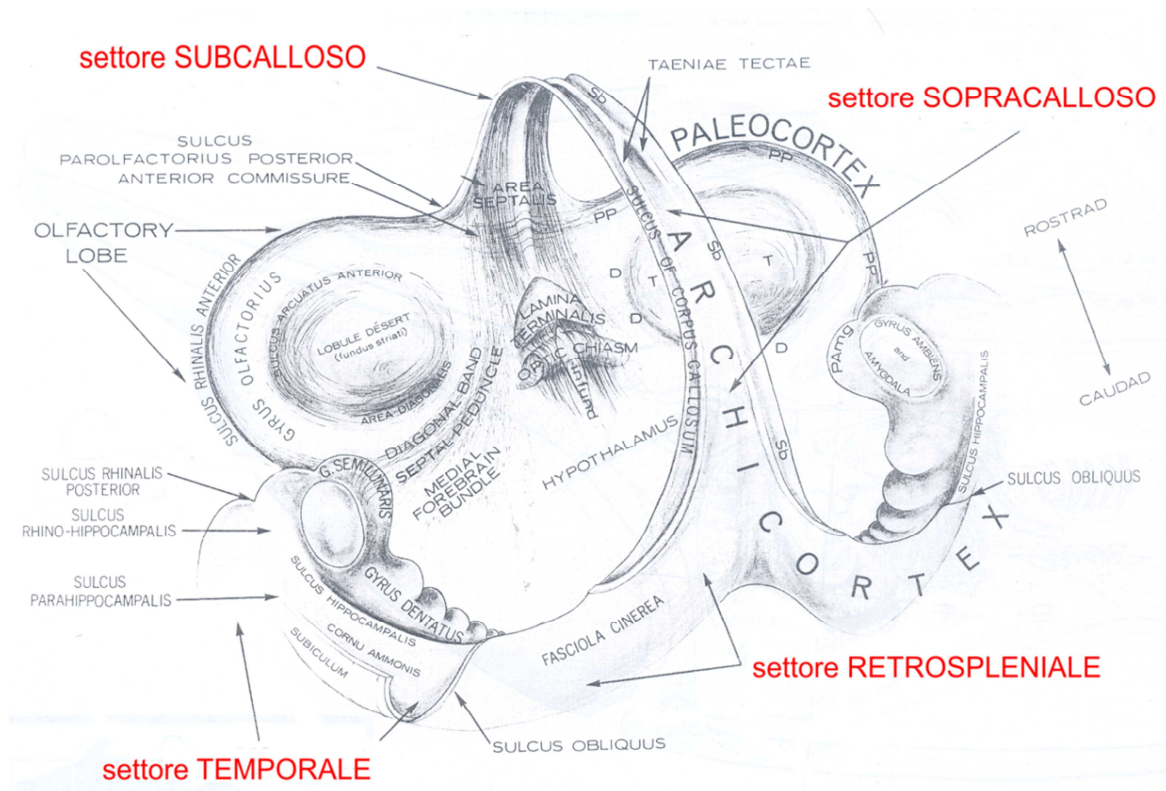


Figura 4: Disegno rappresentativo dei rapporti tra paleocorteccia e archicorteccia nell'encefalo di tursiope (*T. truncatus*) e della suddivisione dell'archicorteccia nei quattro settori: subcalloso, sopracallosa, retrospleniale e temporale. Veduta caudo-dorsale (Jacobs *et al.*, 1979 modificato).

Paleocorteccia

Nei Cetacei, come nei Primati, il lobo limbico non sembra avere diretta correlazione con l'olfatto; infatti, in comparazione ad altri grandi mammiferi, i vari componenti olfattivi sembrano essere molto ridotti o addirittura assenti negli Odontoceti, non mostrando né una parte olfattoria nelle prime vie aeree, né un bulbo e tratto olfattorio, mentre la parte centrale del sistema olfattorio risulta moderatamente sviluppata (Oelschläger, 2008).

Un'abbozzo di bulbo olfattorio è presente nella vita embrionale degli Odontoceti ma scompare negli stadi fetali successivi. Nell'adulto il nervo olfattorio e il bulbo olfattorio mancano completamente, il nucleo olfattorio anteriore e il nucleo del tratto olfattorio risultano vestigiali, il tubercolo olfattorio e la corteccia prepiriforme, come strutture olfattorie secondaria del sistema, sono presenti ed il primo risulta relativamente grande e prominente. Molto interessante è il nucleo terminale, o nervo terminale⁹, che nei delfini presenta il più alto numero di neuroni individuato nei mammiferi. Essendo questi animali microsmatici o anosmatici, la conclusione a cui sono giunti i ricercatori è che questo nucleo non abbia funzione olfattoria, piuttosto sia implicato in altre funzioni correlate alla sfera comportamentale riproduttiva, al controllo del flusso sanguigno al naso e alla base dell'encefalo, al mantenimento dell'epitelio delle vie aeree superiori e al controllo dell'emissione dei segnali sonar (Buhl e Oelschläger, 1986; Oelschläger e Kemp, 1998).

Gli altri componenti della paleocorteccia, quali la corteccia piriforme e la banda diagonale, sono moderatamente rappresentati, mentre il complesso dell'amigdala è marcatamente sviluppato. In contrasto con il nucleo del tratto olfattorio dell'amigdala, totalmente dipendente da input olfattivi, l'amigdala considerata nel suo complesso risulta ben sviluppata sia negli animali microsmatici che anosmatici indicando l'esistenza di input sia olfattivi sia di altra origine, in primis quelli acustici nei Cetacei.

⁹ Nervo strettamente associato al nervo olfattivo e vomeronasale nei mammiferi terrestri, si estende dall'area olfattiva all'encefalo anteriore. Le sue funzioni sono ancora incerte.

1.6 Caratteristiche del sistema limbico

Il sistema limbico, in base alle definizioni di FitzGerald (1992) e Zilles (2004), comprende il lobo limbico, alcuni nuclei sottocorticali come l'amigdala, l'ipotalamo, la formazione reticolare, il nucleo accumbens e alcune aree corticali quali la corteccia orbito-frontale e il polo temporale.

Il lobo limbico costituisce il bordo mediale di ciascun emisfero cerebrale, ha inizio dall'area paraolfattoria del Broca, incorpora l'intera corteccia cingolata e si estende attorno al corpo calloso fino all'uncus del giro ippocampale. Da qui, attraverso il giro ambiens, si unisce al giro trasverso dell'insula e si continua come giro trasverso orbitale del lobo frontale per riunirsi nuovamente all'area paraolfattoria e chiudere così l'anello di corteccia limbica.

Il lobo limbico così definito può essere suddiviso basandosi sull'organizzazione citoarchitettonica in due principali settori: il mediale o paraippocampale, e il laterale o orbitoinsulare.

La presenza di due profonde incisure longitudinali (solco limbico e solco paralimbico) all'interno del lobo limbico ne permettono la divisione in tre formazioni arcuate denominate, dal corpo calloso verso la superficie, lobo limbico, paralimbico e sopralimbico.

Il lobo limbico nel tursiope (*T. truncatus*) viene quindi individuato tra il solco rinale e il solco limbico, e dalle ramificazioni di quest'ultimo viene suddiviso in cinque lobuli: paraolfattorio, sopracallosa, retrospleniale, lobulo paraippocampale dorsomediale, lobulo insulare ventrolaterale. Il lobulo paraolfattorio e quello insulare sono uniti dal giro orbitale trasverso (Figura 6) (Morgane *et al.*, 1982).

Le varie strutture che costituiscono il sistema limbico hanno diversi gradi di sviluppo negli Odontoceti: l'ippocampo e il corpo mammillare sono piccoli e interconnessi con i controlaterali da un fornice sottile, i nuclei talamici anteriori e il complesso abenulare sono molto sviluppati rispetto ad altri mammiferi, l'amigdala è ben sviluppata.

In conclusione, il marcato sviluppo del lobo limbico con la presenza di un lobo paralimbico nei Cetacei, suggerisce una natura non-olfattoria di questo sistema in animali microsmatici o anosmatici (Oelschläger e Oelschläger, 2008).

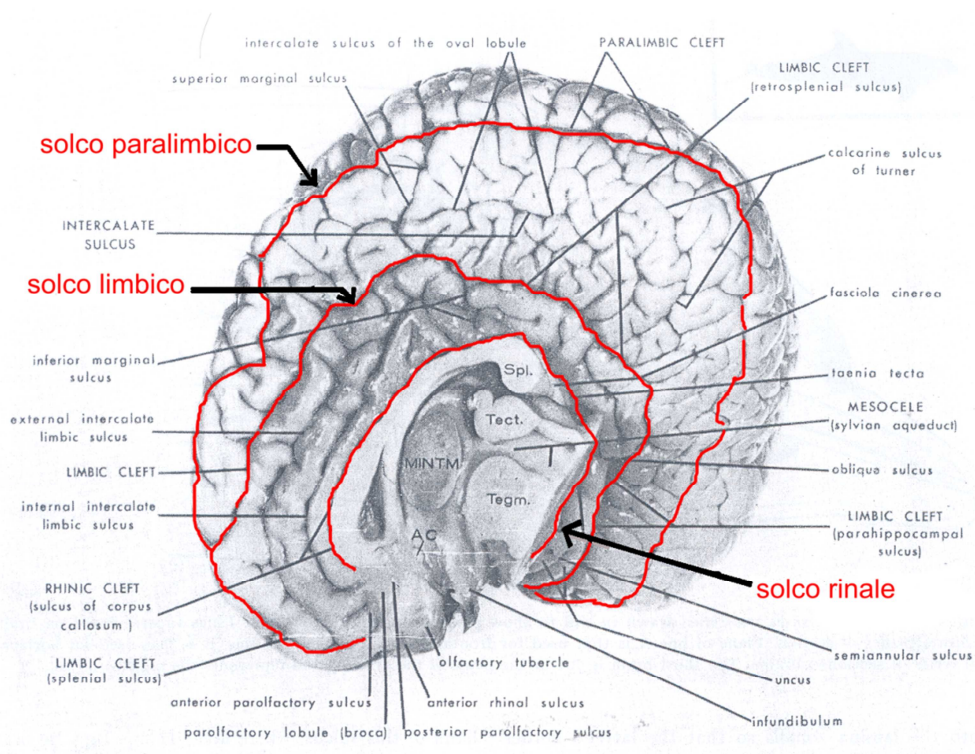


Figura 5: Faccia mediale dell'encefalo di tursiope (*T. truncatus*). L'immagine evidenzia i tre principali solchi che suddividono la faccia mediale di ciascun emisfero cerebrale, individuando il lobo limbico, tra solco rinale e solco limbico, e il lobo paralimbico, tra solco limbico e solco paralimbico (Morgane *et al.*, 1982 modificato).

1.7 Caratteristiche della formazione ippocampale

La formazione ippocampale è formata da fascia dentata, ippocampo e subiculum. A queste aree si possono aggiungere il *præsubiculum*, il *parasubiculum* e la corteccia entorinale che, pur avendo caratteri di transizione da archicortex a neocortex, sono collegati tra loro e con le prime tre strutture da connessioni unidirezionali che rendono tutti questi componenti parte di un'unica entità funzionale (Insausti e Amaral, 2004).

L'ippocampo propriamente detto è la principale struttura localizzata nella parte mediale del lobo temporale ed è caratterizzata da una rotazione sul proprio asse, più o meno marcata nelle diverse specie. Nei Cetacei l'ippocampo ha dimensioni ridotte ma è ben differenziato.

Studi quantitativi su diverse specie animali hanno mostrato che la dimensione dell'ippocampo è strettamente correlata a input olfattori (“olfactory limbic factor”), mentre l'amigdala è correlata a input non-olfattori (“non-olfactory limbic factor”). In realtà è da ricordare che l'ippocampo dei mammiferi riceve proiezioni da diverse aree corticali, e quelle dalle aree olfattive sono le minori quantitativamente. L'ippocampo rappresenta la principale struttura limbica di integrazione, coinvolta nell'avvio di schemi motori, nell'esplorazione e nella processazione della memoria spaziale. Una riduzione del sistema olfattorio non implica necessariamente una riduzione di dimensioni dell'ippocampo, ma una diminuzione degli input dai chemiocettori periferici e dal sistema vestibolare ha sicuramente contribuito a una riduzione della massa dell'ippocampo nei Cetacei.

Di seguito vengono indicate alcune strutture che costituiscono la formazione ippocampale nei settori subcalloso, sopraallosso e retrospleniale negli Odontoceti. Infine verranno dati indicazioni più dettagliate del settore temporale in cui la formazione ippocampale è maggiormente e massimamente rappresentata.

1.7.1 Settori della formazione ippocampale

Nella parte subcallosa e sopraallosa la formazione ippocampale degli Odontoceti e del tursiope (*T. truncatus*) in particolare è molto ridotta ed è rappresentata principalmente dai rudimenti ippocampali che comprendono indusium griseum e taeniae tectae. L'indusium griseum, costituito da sostanza grigia, è in genere difficilmente individuabile nella parte posteriore del corpo calloso e scompare nello splenio del corpo calloso. Le taeniae tectae sono delle sottili bande di fibre che si estendono sulla superficie dorsale del corpo calloso con estensioni fino alle regioni subgenuali.

Nella parte retrospleniale la formazione ippocampale è rappresentata dalla fasciola cinerea (o giro fasciolare di Retzius) che è una sottile struttura che costituisce l'estensione dei rudimenti dell'ippocampo posteriormente al corpo calloso. Nel tursiope si estende dal solco obliquo seguendo la superficie dorsale dello splenio del corpo calloso (Jacobs *et al.*, 1979).

Nella parte temporale la formazione ippocampale è costituita principalmente dall'ippocampo propriamente detto e in questo settore raggiunge la sua massima rappresentazione. L'ippocampo si estende dal solco obliquo (corpo dell'ippocampo) fino all'uncus (*pes ippocampi*, piede dell'ippocampo). Il solco ippocampale rappresenta il limite assiale dell'archicorteccia temporale e allo stesso tempo divide il settore temporale della formazione ippocampale in due parti. Una parte profonda (o laterale) che corrisponde alla fascia dentata e alla fimbria¹⁰ e che costituisce le pareti della fessura corioidea e una parte paraippocampale (o mediale) che comprende subiculum e periarhicorteccia.

Si possono distinguere 7 aree citoarchitettoniche che si dispongono concentriche all'asse antero-posteriore dell'ippocampo: area subiculare, aree ippocampali H1, H2, H3, H4, H5 e area della fascia dentata (Figura 7).

La suddivisione dell'ippocampo in 5 settori (H1, H2, H3, H4, H5) è stata proposta per la prima volta in medicina umana nel 1929 da Rose e si basa su criteri di citoarchitettura.

¹⁰ La fimbria è un insieme di fibre che derivano dalle cellule piramidali dell'ippocampo (*alveus*) ed è la principale connessione tra gli ippocampi dei due emisferi, caudalmente si fonde con la porzione posteriore del corpo calloso formando la commissura ippocampale.

Questa dicitura però non è mai stata largamente utilizzata negli animali da laboratorio preferendo quella proposta da Lorente de Nò (1934) basata su osservazioni di campioni colorati con colorazione di Nissl, Golgi e colorazioni della mielina. Si distinguono in questo modo 4 settori: CA1, CA2, CA3, CA4. Il settore CA4 spesso è poco o nulla rappresentato per questo nella pratica si parla solo di 3 settori (CA1, CA2, CA3).

Una pubblicazione di Jacobs, Morgane e McFarland del 1979, “The anatomy of the brain of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Rhinic Lobe (Rhinencephalon): The Archicortex”, si basa sui sopracitati lavori di Rose. Pur utilizzando la meno diffusa tra le metodiche di suddivisione in aree dell’ippocampo, questo lavoro è molto minuzioso e specifico riguardo alla regione encefalica oggetto di questa tesi e verrà per questo utilizzato come principale punto di partenza nella descrizione di ciascuna area ippocampale (Jacobs *et al.*, 1979). Insieme a questo atlante sono state utilizzate altre pubblicazioni degli stessi autori che sono citate nel paragrafo 2.1 dei “Materiali e metodi”.

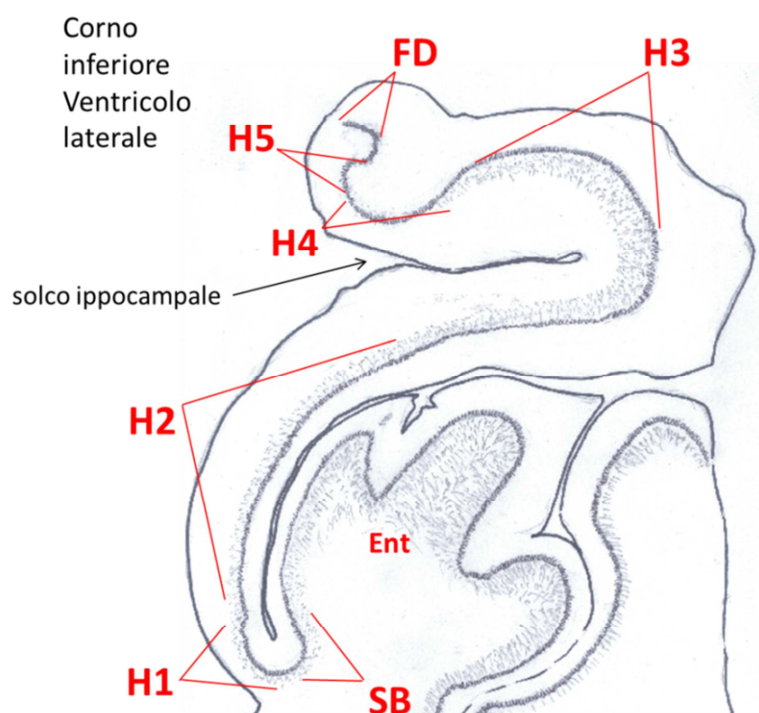


Figura 6: Disegno originale di una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). Sono indicati i diversi settori della formazione ippocampale: FD fascia dentata, aree H1, H2, H3, H4, H5 dell’ippocampo, SB subiculum. Con Ent è indicata la corteccia entorinale.

1.7.2 Laminazione dell'ippocampo

L'ippocampo ha la tipica stratificazione trilaminare dell'archicorteccia con uno strato molecolare (I strato), uno strato cellulare (II strato) e uno strato polimorfo (III strato).

Il II strato è costituito da cellule piramidali ed ha uno spessore di poche cellule nei primi settori ippocampali ma diventa molto spesso nei settori H2 e H1 dove è possibile distinguere diversi strati. Verso la cavità ventricolare si definiscono *alveus*, costituito dagli assoni delle cellule piramidali, e *stratum oriens*, formato dai dendriti basali delle cellule piramidali. Verso la fessura del solco ippocampale si distinguono invece *stratum lucidum*, costituito da fibre amieliniche che instaurano sinapsi con i dendriti prossimali delle cellule piramidali, *stratum radiatum*, formato da fibre di proiezione dai nuclei del setto e dalla regione sopramammillare, e *stratum lacunosum* adiacente alla fessura.

La corteccia entorinale è la struttura di passaggio da allocortex a isocortex e si trova nella parte anteriore della formazione ippocampale connettendo il subiculum con la neocorteccia. La sua stratificazione comprende sei lamine come la neocorteccia ma con alcune differenze in relazione alla sua natura di area di transizione. Il I strato (plessiforme) è acellulare, il II è formato da cellule piramidali modificate e cellule stellate raggruppate in isole cellulari, il III strato contiene una popolazione omogenea di cellule piramidali di media grandezza. Caratteristica peculiare della corteccia entorinale è l'assenza di uno strato interno dei granuli sostituito da un IV strato acellulare che prende il nome di *lamina dissecans*. Il V strato è costituito da cellule piramidali grandi e in alcuni settori si possono distinguere ulteriori strati (Va, Vb, Vc), infine il VI strato non è ben rappresentato e spesso si confonde con lo strato Vc.

La corteccia entorinale riceve un flusso costante di informazioni cognitive e sensitive dalle aree associative, le trasmette alla formazione dell'ippocampo perchè vengano consolidate, poi le recupera in forma consolidata per ritrasmetterle alle aree associative dove sono codificate in forma di tracce mnesiche.

Il fornice forma un secondo circuito di questo tipo tra formazione ippocampale e neocorteccia (Jacobs *et al.*, 1979; Morgane e Jacobs, 1986; Insausti e Amaral, 2004).

Per completare la descrizione della formazione ippocampale vengono dati alcuni cenni sulle connessioni intrinseche (tra i diversi settori della formazione) ed estrinseche (tra

formazione e strutture subcorticale e corticali), sui neurotrasmettitori individuati e sui tipi cellulari presenti. Tutte queste informazioni sono ricavate principalmente da studi fatti su animali da laboratorio o indagini di medicina umana, per questo motivo i riferimenti alle aree ippocampali si basano sulla suddivisione secondo Lorente de Nò (settori CA1, CA2, CA3, CA4) maggiormente utilizzata per gli animali da laboratorio [nel testo verrà indicato tra parentesi il settore corrispondente della dicitura secondo Rose].

Scarsi o assenti sono i dati bibliografici per i Cetacei riguardanti questi argomenti.

1.7.3 Connessioni intrinseche ed estrinseche

La trasmissione nervosa degli impulsi da e verso l'ippocampo viene divisa in connessioni intrinseche e connessioni estrinseche. Le connessioni intrinseche sono rappresentate dal circuito intrinseco: le strutture coinvolte sono la fascia dentata, i settori dell'ippocampo, il subiculum, il præsubiculum, il parasubiculum e la corteccia entorinale. Si definisce una "via perforante" costituita dalle connessioni che vanno dalla corteccia entorinale alla fascia dentata. Al contrario la fascia dentata non proietta mai al di fuori della formazione ippocampale inviando proiezioni solo allo strato molecolare della fascia dentata stessa e ai neuroni del CA3 (corrispondente più o meno al settore H5 e H4). Negli animali non-primati esiste una proiezione alla fascia dentata controlaterale. Singole cellule del settore CA3 proiettano ad altri strati dello stesso settore e al settore CA1 (parte finale settore H2 e settore H1). I neuroni del CA1 proiettano al subiculum, il subiculum proietta al præs- e parasubiculum e tutti e tre alla corteccia entorinale dimostrando la natura unidirezionale della trasmissione nervosa caratteristica di questo circuito.

Per quanto riguarda le connessioni estrinseche, è stato dimostrato che la principale struttura che proietta al di fuori della formazione ippocampale è il subiculum e non esclusivamente la fimbria e il fornice come si pensava fino agli anni '70 (nei primati sia il fornice che il subiculum e il settore CA1 proiettano verso la corteccia cerebrale associativa).

Sono state descritte moltissime proiezioni dalla formazione ippocampale a strutture subcorticali e corticali e viceversa. Alcune sono ancora poco conosciute ma in generale si può affermare che, attraverso il complesso subicolare e la corteccia entorinale, la formazione ippocampale si integra con la neocorteccia. I settori coinvolti in queste connessioni sono la corteccia temporale, la corteccia peririnale, il giro temporale e il giro paraippocampale, l'insula, la corteccia orbitofrontale posteriore, la corteccia frontale dorsolaterale e mediale, la corteccia cingolata, la corteccia retrospleniale.

Inoltre la formazione ippocampale può influenzare molte altre regioni cerebrali in modo indiretto attraverso le sue proiezioni al complesso amigdaloide, al nucleo striato e ad altre strutture subcorticali (nuclei del talamo, nuclei del setto, tegmento) (Insausti e Amaral, 2004).

1.7.4 Neurotrasmettitori nell'ippocampo

I neurotrasmettitori utilizzati dai neuroni per la trasmissione dello stimolo sono molteplici e assumono significati diversi. Nei mammiferi i due principali neurotrasmettitori nel Sistema Nervoso Centrale sono il glutammato (o acido glutammico), con significato eccitatorio, e il GABA (acido γ -aminobutirrico), con significato inibitorio.

Studi molto dettagliati sull'ippocampo di ratto hanno dimostrato la presenza in questa regione cerebrale sia dei principali neurotrasmettitori sia di altri meno diffusi.

Il GABA, quale principale neurotrasmettitore inibitorio utilizzato dagli interneuroni, risulta molto rappresentato nell'ippocampo e sarà oggetto di indagine in questo lavoro attraverso le tecniche immunoistochimiche che individuano l'espressione delle proteine leganti il calcio. Infatti come verrà spiegato successivamente, è stata dimostrata la correlazione tra l'espressione di queste proteine e l'utilizzo da parte della cellula del GABA come neurotrasmettitore.

Oltre al GABA e all'acido glutammico individuati rispettivamente nel settore CA3 (corrispondente più o meno a H5 e H4 nella suddivisione di Rose) dell'ippocampo e nella fascia dentata, sono stati identificati numerosi altri neurotrasmettitori diversamente distribuiti all'interno della formazione ippocampale. Questi neurotrasmettitori sono la dopamina (identificata nei settori dell'ippocampo e nel subiculum), l'acetilcolina, la glicina, la taurina (trovata nei settori CA1 e CA3 e nell'ilo della fascia dentata, nelle cellule dei granuli), la colecistochinina (individuata nello strato piramidale di CA1 e CA3 e nello strato molecolare della fascia dentata), la neurotensina (identificata a livelli molto bassi nel settore CA1 e nel subiculum), il Corticotropin Releasing Factor, i peptidi oppioidi quali dinorfina ed encefalina (identificati nelle cellule dei granuli della fascia dentata che proiettano alle cellule piramidali del settore CA3; e nelle cellule della corteccia entorinale che attraverso la via perforante proiettano all'ippocampo), la galanina, la somatostatina, il neuropeptide tirosina (o peptide Y, trovato negli interneuroni dello strato polimorfo della fascia dentata, nel settore CA1, nel subiculum e nella corteccia entorinale), la sostanza P (individuata nelle cellule dello strato polimorfo della fascia dentata che innervano lo strato delle cellule dei granuli) (Tohyama e Takatsuji, 1998).

Tutte queste molecole sono state individuate e descritte nel ratto, mentre in molte altre specie, Cetacei compresi, manca un'indagine qualitativa e quantitativa e una dettagliata mappatura della distribuzione dei diversi neurotrasmettitori.

1.7.5 Tipi cellulari nell'ippocampo

Morgane e Jacobs nel 1986 utilizzarono la colorazione di Nissl con il colorante Cresyl-violetto e la colorazione di Golgi per indagare la citoarchitettura e le diverse popolazioni cellulari presenti nella regione ippocampale del tursiope (*T. truncatus*).

Essi descrissero nel dettaglio i diversi settori della regione riportando la morfologia delle cellule da loro riscontrate nelle preparazioni di Golgi.

La fascia dentata è costituita da cellule dei granuli, queste cellule sono descritte come ovali con un dendrite apicale che si estende nello strato molecolare. Occasionalmente sono state osservate cellule non granulari nella parte più profonda dello strato granulare con dendriti sia basali che apicali. Sono state inoltre individuate cellule piramidali nell'ilo della fascia dentata provenienti dallo strato piramidale dell'ippocampo (settore CA4 o H5). Nello strato molecolare sono state descritte cellule stellate che proiettano il loro assone nello strato polimorfo. Infine sono state talvolta individuate cellule bipolari con localizzazione tra strato granulare e strato plessiforme (molecolare) della fascia dentata.

Lungo tutti i settori dell'ippocampo le cellule sono piramidali con forma più o meno tipica. Nel settore CA4 (H5 e H4) le cellule sono di media grandezza con spigolature evidenti e non mostrano disposizione radiale, inoltre in queste aree sono state identificate molte piccole cellule polimorfe. Nel settore CA3 (H4) le cellule sono piramidali spinose e stellate lisce. Nel settore CA1 (H2 e H1) le cellule piramidali sono più piccole rispetto agli altri settori e il dendrite apicale è affiancato e rinforzato da dendriti secondari che originano da quelli basali. Questi ultimi hanno orientamento orizzontale mentre quelli secondari seguono la direzione del dendrite apicale o dell'assone, si genera in questo modo una laminazione del settore con la formazione di una lamina dissecans relativamente povera di cellule. Questa struttura è tipica degli ultimi settori dell'ippocampo fino al subiculum e ricorda in certi aspetti l'organizzazione della corteccia entorinale.

Il subiculum ha uno strato cellulare più spesso ma meno denso (ipocromatico), è costituito da cellule piramidali con distribuzione radiale che presentano una organizzazione laminare abbastanza chiara nella parte adiacente all'ippocampo (settore CA1 o H1). Le cellule piramidali dello strato profondo sono descritte come rotondeggianti con un sistema dendritico apicale ampio che si ramifica lontano dal corpo cellulare; lo strato superficiale invece è caratterizzato da cellule piramidali più tipiche con dendriti che ramificano prossimali al pirenoforo (Morgane e Jacobs, 1986).

2. Scopo della tesi

La maggior parte delle conoscenze sulla citoarchitettura della corteccia cerebrale e dell'ippocampo derivano da indagini basate su diversi tipi di colorazioni istologiche (colorazione di Golgi, Nissl e colorazioni della mielina). Altri studi hanno impiegato tecniche immunostochimiche per individuare proteine specifiche (come la parvalbumina, la calbindina e la calretinina che sono proteine leganti il calcio) espresse da diversi tipi di neuroni al fine di differenziare dal punto di vista neurochimico le diverse popolazioni cellulari.

La quasi totalità di questi studi è stata effettuata su animali da laboratorio classici, oppure sul gatto o sulle scimmie, oltre che su campioni autoptici umani. I dati disponibili relativi ad altre specie sono scarsi, a causa della difficoltà di reperimento dei campioni o per la natura protetta di alcune specie (entrambe le evenienze si verificano nel caso dei Cetacei).

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di raccogliere e valutare la letteratura relativa al Sistema Nervoso Centrale dei Cetacei, con particolare riferimento al lobo limbico e alla formazione ippocampale in questi animali.

Utilizzando diverse metodiche di indagine applicate a campioni conservati in maniera diversa (e in qualche caso originale almeno rispetto a quanto riportato nei lavori indicati in bibliografia), è stato possibile confrontare e integrare i risultati descritti in letteratura con i nostri dati originali ottenuti per la specie *Tursiops truncatus*. È stato inoltre possibile comparare la citoarchitettura di soggetti adulti con quella di neonati, anche se le difficoltà riscontrate nella preparazione e allestimento dei vetrini dei soggetti più giovani hanno condizionato molto la raccolta dei dati morfologici rendendo difficile un dettagliato confronto.

Oltre alla citoarchitettura sono state valutate anche le caratteristiche neurochimiche della regione ippocampale applicando tecniche di indagine immunostochimica e confrontando i dati ottenuti con quelli riportati in letteratura per altre specie animali.

Nonostante l'elevato numero di lavori pubblicati sull'encefalo e le sue caratteristiche strutturali e funzionali, molto rimane ancora poco chiaro o addirittura ignoto. Questo vale ancora di più se consideriamo il sistema limbico di cui l'ippocampo fa parte.

Le strutture del sistema limbico sono considerate la parte filogeneticamente più antica dell'intero encefalo. Sembrano essere correlate a comportamenti istintivi, all'elaborazione delle informazioni riguardanti lo spazio personale (schema corporeo) e l'ambiente (spazio visivo), alle abilità mnemoniche di varia natura (memoria dichiarativa, memoria procedurale), all'apprendimento e sembrano strettamente legate al senso dell'olfatto.

Visto quest'ultimo aspetto, risulta interessante analizzare come si sviluppino e si modifichino tali strutture in animali microsmatici (o anosmatici) come i Cetacei, al fine di meglio inquadrare le funzionalità e potenzialità di questo sistema.

Lo scopo di questo studio è quello di contribuire all'approfondimento e chiarimento di questi aspetti funzionali del Sistema Nervoso Centrale dei Cetacei.

2. MATERIALI e METODI

2.1 Campionamento

I campioni di tessuto nervoso utilizzati per questo lavoro di tesi sono stati ottenuti da quattro soggetti di tursiope (*Tursiops truncatus*) presenti nella Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini che ha sede presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova.

La Banca, attiva dal 2001, raccoglie tessuti provenienti principalmente da cetacei spiaggiati lungo le coste italiane del Mediterraneo grazie alla collaborazione tra l'Università di Padova, l'Istituto Centrale per la Ricerca Applicata al Mare (I.C.R.A.M.) di Roma e alcune associazioni italiane senza fini di lucro dedicate allo studio dei mammiferi marini. L'obiettivo finale della Banca è quello di raccogliere dati su diversi aspetti che riguardano la biologia, la genetica, l'anatomia, la fisiologia, la patologia e l'etologia dei cetacei. La Banca ha lo scopo di promuovere la conservazione e la protezione dei mammiferi marini che vivono nel Mediterraneo e di fornire diversi servizi alla ricerca distribuendo gratuitamente, su motivata richiesta scientifica, i campioni raccolti, classificati e conservati in essa.

In Tabella 1 sono riportati il codice di classificazione di ciascun animale utilizzato nel mio studio insieme ad alcuni dati autoptici di segnalamento:

codice ID	genere	età	lunghezza (cm)	peso (kg)	blubber v/d ¹	provenienza ²
133	femmina	>30 anni	248	159	2,2/2,3	amb controllato
139	maschio	30 anni	268	198	2,5/2,7	amb controllato
144	maschio	9 giorni	117	22,1	1,2/1,5	amb controllato
123	femmina	6 giorni	106	16,2	0,4/0,6	amb controllato

Tabella 1: Dati relativi agli esemplari di tursiope (*T. truncatus*) utilizzati nello studio oggetto di questa tesi: genere, età, dimensioni (lunghezza e peso del corpo), blubber e provenienza.

¹Spessore blubber ventrale/blubber dorsale;

²Ambiente controllato: Parco Acquatico OLTREMARE di Riccione (RI).

Per tutti gli animali indicati in Tabella 1 si è proceduto all'isolamento dell'encefalo in sede necroscopica presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova. Una volta isolato, ciascun encefalo è stato tagliato in sezioni coronali di circa 1 centimetro di spessore ed è stato immerso in formalina per essere fissato e così conservato.

Per questo studio sono stati poi prelevati dei campioni di zone specifiche del tessuto nervoso che contenessero le regioni di nostro interesse (ROI: Region Of Interest, vedi Figura 8).

La ROI è rappresentata dall'area ippocampale intesa come la parte mediale del lobo temporale che comprende la formazione ippocampale, il giro dentato, il subicolo e la corteccia entorinale; può essere definita anche come pavimento del corno inferiore del ventricolo laterale.

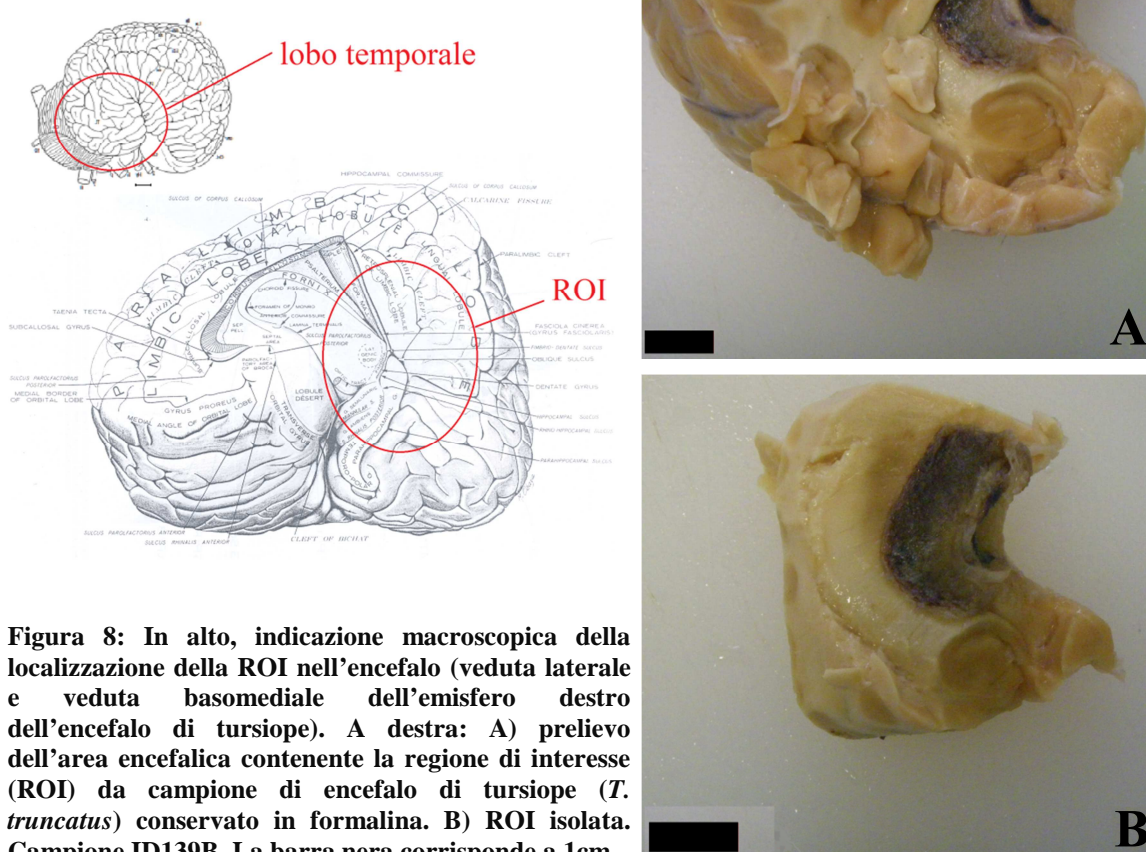


Figura 8: In alto, indicazione macroscopica della localizzazione della ROI nell'encefalo (veduta laterale e veduta basomediale dell'emisfero destro dell'encefalo di tursiope). A destra: A) prelievo dell'area encefalica contenente la regione di interesse (ROI) da campione di encefalo di tursiope (*T. truncatus*) conservato in formalina. B) ROI isolata. Campione ID139B. La barra nera corrisponde a 1cm.

La ROI è stata individuata facendo riferimento alle indicazioni presenti negli atlanti anatomici “The anatomy of the brain of the bottlenose dolphin with comparative anatomical observations in four other cetacean species.” (Morgane PJ, Jacobs MS, McFarland WL (1980); Brain Res Bull: 5, pp. 1-107), “The anatomy of the brain of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Rhinic Lobe (Rhinencephalon). I. The paleocortex.” (Jacobs MS, Morgane PJ, McFarland WL (1971); J Comp Neurol: 141, pp. 205-272) e “The anatomy of the brain of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Rhinic Lobe (Rhinencephalon): the archicortex.” (Jacobs MS, McFarland WL, Morgane PJ (1979); Brain Res Bull: 4, pp. 1-108).

Alcuni campioni sono stati divisi in più parti in modo da facilitare la loro gestione e le manualità di crioconservazione e taglio. Viste le dimensioni, il campione ID139 è stato ulteriormente suddiviso in tre sezioni denominate ID139A, ID139B e ID139C; il campione ID123 invece è stato sezionato in due parti denominate ID123A e ID123B.

2.2 Preparazione dei campioni per l'ottenimento delle sezioni istologiche

2.2.1 Protocollo di congelamento dei campioni

Materiali e reagenti:

- .contenitori di plastica, pinze, guanti, sughero;
- .acqua distillata;
- .soluzione saccarosio al 30%;
- .gel OCT Embedding Matrix;
- .isopentano;
- .azoto liquido.

Procedimento:

I campioni (ROI) di encefalo prelevati sono stati sciacquati in acqua corrente per almeno 48 ore al fine di eliminare la formalina presente. E' seguito un passaggio in acqua distillata e successiva immersione dei campioni in una soluzione zuccherina crioprotettiva (saccarosio al 30%), dove i campioni sono rimasti fino alla totale saturazione confermata dalla loro precipitazione sul fondo.

Ciascun campione è stato poi fissato utilizzando OCT su un piccolo supporto in sughero secondo l'orientamento più adatto alle necessità di taglio al criostato.

Una volta fissati, i campioni sono stati immersi in un contenitore riempito con isopentano alla temperatura controllata di -20° -30°C. Tale temperatura viene ottenuta immergendo lo stesso contenitore dell'isopentano nell'azoto liquido; l'utilizzo dell'isopentano consente di portare i campioni a basse temperature in modo graduale, limitando i danni da shock termico dei tessuti.

A seconda dello spessore del prelievo, il campione viene tenuto immerso per alcuni minuti nell'isopentano; infine ad esso viene allegata un'etichetta per l'identificazione e viene posto in congelatore a -20°C.

2.2.2 Taglio al criostato e allestimento vetrini

Materiali:

- .criostato
- .vetrini gelatinati
- .vetrini polarizzati SuperFROST

Procedimento:

I campioni congelati sono stati fissati al portaoggetti del criostato utilizzando dell'OCT e sono stati tagliati in sezioni di 24-25 μ m. Si è scelto di effettuare sezioni con questo spessore poiché il tessuto nervoso, per la sua particolare fragilità, non può essere tagliato come gli altri tessuti in sezioni da 5-10 μ m. Dopo il taglio, le fette sono state stese sui vetrini e conservate in frigo a 4°C.

Per ciascun campione tagliato sono stati preparati 50 vetrini con un'organizzazione seriale come mostrato in Figura 9.

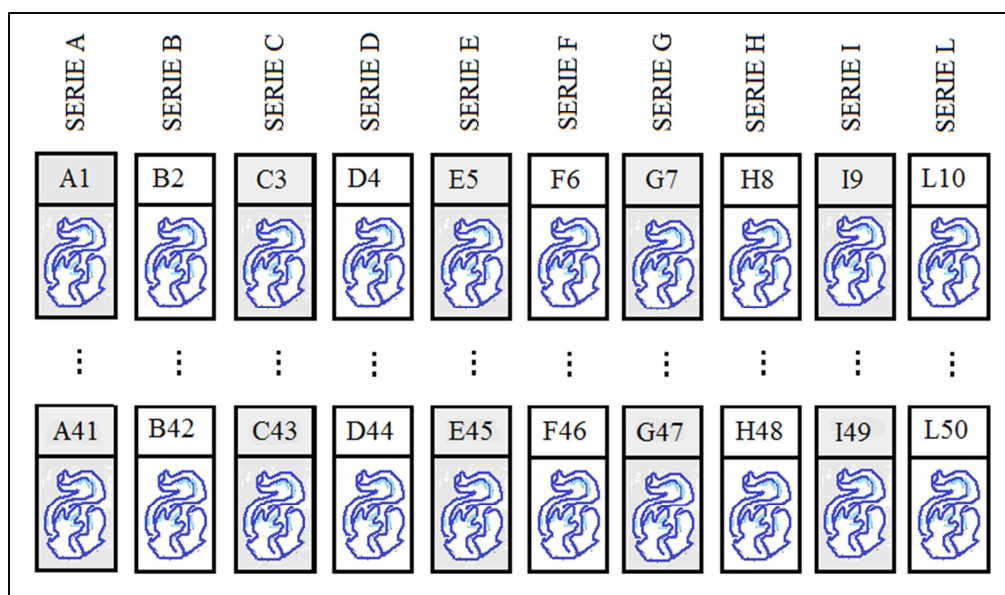


Figura 9: Rappresentazione grafica dell'organizzazione seriale dei vetrini.

Le serie A, C, E, G, e I sono costituite da sezioni allestite su vetrini gelatinati adatti per effettuare semplici colorazioni istologiche. Le serie B, D, F, H e L sono invece costituite da sezioni allestite su vetrini polarizzati SuperFROST trattati appositamente per

permettere indagini immunohistochemiche. All'interno di ogni serie le sezioni presenti su due vetrini successivi distano l'una dall'altra circa 200µm.

2.3 Colorazione istologica e analisi immunohistochemica

2.3.1 Colorazione di Nissl

La colorazione istologica di Nissl del tessuto nervoso permette di determinare le diverse morfologie cellulari neuronali. In questa colorazione si utilizza un colorante basofilo che evidenzia i ribosomi (granuli) distribuiti nel citoplasma e nei dendriti dei neuroni, nel nucleolo e, più blandamente, nei nuclei della glia.

I granuli o "sostanza di Nissl" possono essere messi in evidenza con vari coloranti: Neutral Red, Blu di Metilene, Azur, Tionina, Toluedine Blue, Cresyl-violetto (Bancroft, 1996). Nel laboratorio di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università di Padova dove ho svolto il mio lavoro di ricerca, la colorazione di Nissl è stata eseguita utilizzando la Tionina.

I materiali, i reagenti e il protocollo utilizzati per la colorazione istologica delle sezioni di tessuto preparate sono sintetizzati in Tabella 2.

<u>Materiali e reagenti</u>	.cuvette, imbuto, portavetrini; .cloroformio-etanolo (1:1); .alcoli EtOH 100%, 95%, 70%, 50%; .xilolo; .acqua bidistillata; .soluzione di Tionina: acido acetico 1.0M, idrossido di sodio 1.0M, thionina 0,1% (pH 4,0); .balsamo per montaggio.
<u>Procedura</u>	1.incubazione dei vetrini in cloroformio-etanolo (1:1) per 60-90 minuti in cuvette; 2.reidratazione con scala di alcoli discendente, passaggi di 5 minuti: _Alcool assoluto 100° (EtOH 100%) _Alcool assoluto 100° (EtOH 100%) _Alcool 95° (EtOH 95%) _Alcool 95° (EtOH 95%)

_Alcool 70°	(EtOH 70%)
_Alcool 50°	(EtOH 50%);
3.due passaggi in acqua bidistillata di 3 minuti;	
4.incubazione in stufetta a 58°C con soluzione di Tionina per 1 ora;	
5.due passaggi rapidi in acqua bidistillata (il primo di pochi secondi, il secondo di 3 minuti);	
6.disidratazione con scala di alcoli ascendente, passaggi di 3 minuti:	
_Alcool 50°	(EtOH 50%)
_Alcool 70°	(EtOH 70%)
_Alcool 95°	(EtOH 95%)
_Alcool 95°	(EtOH 95%)
_Alcool assoluto 100°	(EtOH 100%)
_Alcool assoluto 100°	(EtOH 100%);
7.due passaggi in xilolo di 5-10 minuti;	
8.montaggio dei vetrini con balsamo.	

Tabella 2: Materiali, reagenti e protocollo utilizzati per effettuare la colorazione di Nissl.

2.3.2 Immunoistochimica

Nel mio lavoro di ricerca ho voluto marcare le sezioni di tessuto preparate con diversi anticorpi contro determinate strutture cellulari:

- Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): una proteina citoscheletrica usata come marker per identificare gli astrociti (Bancroft, 1996). Le principali funzioni di questo tipo di cellule sono quelle di sostegno meccanico e di apporto nutritizio ai neuroni. Questo studio è una delle prime indagini immunoistochimiche sulla distribuzione della GFAP nel tessuto nervoso dei Cetacei e in particolare nella regione ippocampale della specie *Tursiops truncatus*.
- parvalbumina (PV), calbindina (CB) e calretinina (CR): tre proteine leganti il calcio, presenti in quantità variabile all'interno della popolazione neuronale, in particolare negli interneuroni ma anche nelle cellule piramidali. Queste proteine sono usate come marker per distinguere le diverse sottopopolazioni neuronali e le diverse aree cerebrali da un punto di vista funzionale. La presenza di un tipo di proteina rispetto ad un altro in una data cellula suggerisce un diverso tipo di

attività della stessa e un diverso grado di interazione, integrazione e modulazione con le cellule vicine.

L'immunoistochimica è una tecnica che si basa sull'utilizzo degli anticorpi, proteine in grado di riconoscere specifici determinanti antigenici, combinati con sistemi di rivelazione in grado di evidenziare al microscopio l'avvenuta reazione antigene-anticorpo.

Fattori che influenzano l'efficienza di queste indagini immunoistochimiche sono la qualità del preparato istologico allestito, la preservazione dell'antigenicità del tessuto e il potere di amplificazione del segnale da parte di sistemi utilizzati per evidenziare la reazione antigene-anticorpo.

L'antigenicità del preparato può essere compromessa dal meccanismo d'azione del fissativo (la formalina) perché, pur preservandone la componente morfologica, può formare dei legami crociati con le proteine rendendo meno accessibili i determinanti antigenici. Il recupero dell'antigenicità, o smascheramento, può essere ottenuto con diversi metodi. Nel mio studio lo smascheramento nel protocollo di indagine con l'anticorpo contro la GFAP è stata realizzato utilizzando la tripsina allo 0,1% in tampone TRIS a pH 7.2, incubando i preparati a una temperatura di 37°C per 10 minuti. Per quanto riguarda invece i marcaggi eseguiti con gli anticorpi contro le proteine leganti il calcio non è stato effettuato alcun smascheramento in quanto questo passaggio non era necessario per avere un buon legame antigene-anticorpo.

La tecnica di indagine immunoistochimica utilizzato nel mio lavoro sfrutta un metodo di rilevazione della avvenuta reazione antigene-anticorpo di tipo enzimatico. Tale tecnica sfrutta il complesso avidina-biotina³ coniugato con la perossidasi di rafano (HRP: horseradish peroxidase). Tale complesso viene coniugato all'anticorpo primario grazie all'utilizzo di uno specifico anticorpo secondario biotinitato. L'antigene di interesse viene così marcato in maniera indiretta con l'enzima perossidasi, in grado di convertire la DAB (diaminobenzidina tetraidrocloruro), un substrato solubile in ambiente acquoso, in un precipitato insolubile che precipita nella sede della reazione antigene-anticorpo. L'enzima

³ L'avidina è una proteina estratta dall'albumine d'uovo che ha la proprietà di formare un legame molto stabile con la biotina per l'elevata affinità tra le due molecole. La biotina è una vitamina del gruppo B.

è in grado di agire in pochi minuti conferendo una colorazione marrone alle zone marcate che risultano così visibili al microscopio ottico.

I materiali, i reagenti e il protocollo utilizzato per marcare le sezioni di tessuto preparate sono sintetizzati in Tabella 3.

<u>Materiali e reagenti</u>	<ul style="list-style-type: none">.PBS (tampone fosfato salino) pH 7.4;.TRIS (Tris-idrossimetil-amminometano) pH 7.2;.tripsina allo 0.1% in TRIS;.perossidasi al 3% in PBS;.siero suino al 5% in PBS;.soluzione di 5% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS con 5% NGS (Normal Goat Serum) e 0,2% di Triton;.anticorpi primari:<ul style="list-style-type: none">.anti-GFAP (SIGMA); diluizione 1:200, in 5% di siero suino in PBS;.anti-parvalbumina (PV), monoclonale, prodotto in topo (SIGMA); diluizione 1:500 in soluzione 5%BSA+5%NGS+0.2%Triton in PBS;.anti-calbindina-D28K (CB), monoclonale, prodotto in topo (SIGMA); diluizione 1:500 in soluzione 5%BSA+5%NGS+0.2%Triton in PBS;.anti-calretinina (CR), policlonale, prodotto in coniglio (SIGMA); diluizione 1:500 in soluzione 5%BSA+5%NGS+0.2%Triton in PBS;.kit ABC (avidina-biotina complex, DAKO);.DAB (diaminobenzidina tetraidrocloruro) (Vector);.acqua di fonte, acqua bidistillata;.ematossilina;.alcoli 50%, 70%, 95%, 100%, xilolo;.balsamo;.ammoniaca.
------------------------------------	--

<u>Procedimento</u>	<ol style="list-style-type: none">1.incubazione dei vetrini in PBS per 10 minuti;2.incubazione con tripsina 0,1% in TRIS per 10 minuti a 37°C (smascheramento) [solo per il marcaggio con GFAP];3.vetrini in soluzione di perossidasi al 3% in PBS per 10 minuti (blocco delle perossidasi endogene);4.due passaggi in PBS di 5 minuti;5.incubazione in PBS al 5% di siero suino per 30 minuti [per il marcaggio con GFAP]; incubazione per 30 minuti nella soluzione 5%BSA+5%NGS+0.2%Triton in PBS [per il marcaggio con le proteine leganti il calcio] (bloccaggio). Questo
----------------------------	---

	<p>passaggio ci consente di saturare i siti antigenici che altrimenti darebbero luogo ad un marcaggio di fondo aspecifico;</p> <ol style="list-style-type: none">6. aggiungere anticorpo primario: incubazione a temperatura ambiente per 1 ora e in frigorifero a 4°C over-night;7. due passaggi in PBS di 5 minuti;8. incubazione con il sistema avidina-biotina-perossidasi (Dako kit) per 60 minuti;9. due passaggi in PBS di 5 minuti;10. aggiunta di 1ml di DAB (1mg/ml) + 7,5µl perossidasi al 3% in PBS, sviluppo per un tempo da pochi secondi a qualche minuto a seconda della reattività;11. blocco della reazione in acqua di fonte e passaggio in acqua bidistillata di 4 minuti;12. eventuale passaggio in ematossilina di 5 minuti, lavaggio grossolano e passaggio in acqua corrente di 5 minuti; passaggio di 4 secondi in acido cloridrico, passaggio in acqua di fonte di 5 minuti, passaggio in acqua bidistillata di 5 minuti. Questo se si vuole ottenere un contrasto maggiore, in quanto l'ematossilina colora i nuclei delle cellule. [solo per il marcaggio con GFAP];13. disidratazione con scala di alcoli ascendente, passaggi di 3 minuti;14. tre o quattro passaggi in xilolo di 5 minuti;15. montaggio dei vetrini con balsamo.
--	--

Tabella 3: Materiali, reagenti e protocollo utilizzati nella reazioni di immunistoichimica con l'anticorpo contro la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) e con gli anticorpi contro le proteine leganti il calcio (Parvalbumina, Calbindina e Calretinina).

L'indagine sulla distribuzione della GFAP nell'ippocampo è stata integrata con dei marcaggi realizzati con tecniche di immunofluorescenza. Nell'immunofluorescenza si utilizza un anticorpo primario che lega l'antigene specifico e un anticorpo secondario contenente un fluorocromo che si lega al primario. I marcaggi vengono osservati al microscopio a fluorescenza che, grazie all'utilizzo di determinate lunghezze d'onda, eccita i fluorocromi presenti nell'anticorpo secondario facendo così rilasciare una luce fluorescente che indica il sito dove è presente il complesso antigene-anticorpo.

I materiali, i reagenti e il protocollo sperimentale utilizzato per marcare le sezioni di tessuto preparate con GFAP in fluorescenza sono sintetizzati in Tabella 4.

<u>Materiali e reagenti</u>	<ul style="list-style-type: none">.PBS Tween 20 allo 0,1% (tampone fosfato salino);.TRIS (Tris-idrossimetil-amminometano) pH 7.2;.tripsina allo 0.1% in TRIS;.BSA (Bovine Serum Albumin) al 5% in PBS e all'1% in PBS;.anticorpo primario: anti-GFAP (SIGMA); diluizione 1:200 in BSA all'1% in PBS;.anticorpo secondario: anti rabbit IgG TRITC (SIGMA); diluizione 1:200 in BSA all'1% in PBS;.Vectashield, montante specifico per immunofluorescenza (Mounting Media for Fluorescence, VECTOR);
------------------------------------	--

<u>Procedimento</u>	<ol style="list-style-type: none">1.vetrini in PBS Tween 20 allo 0,1% per 10 minuti;2.incubazione con tripsina 0,1% in TRIS per 10 minuti a 37°C (smascheramento);3.incubazione in BSA al 5% in PBS per 30 minuti (bloccaggio);4.aggiungere anticorpo primario: incubazione a temperatura ambiente per 1 ora e in frigorifero a 4°C over-night;5.tre passaggi in PBS Tween 20 allo 0,1% di 10 minuti;6.aggiungere anticorpo secondario marcato con fluorocromo e incubazione per 60 minuti;7.tre passaggi in PBS Tween 20 allo 0,1% di 10 minuti;8.montaggio dei vetrini con Vectashield.
----------------------------	--

Tabella 4: Materiali, reagenti e protocollo utilizzato nella reazione di immunofluorescenza con l'anticorpo contro la GFAP.

3.Osservazione vetrini e cattura immagini

Dopo il montaggio i vetrini sono stati fatti asciugare, e poi analizzati al microscopio ottico Olympus BX 51 dotato di videocamera Olympus DP71 controllata dal software Olympus CellB.

Una prima osservazione panoramica, ad ingrandimenti 4x e 10x, è stata fatta per definire lo stato di integrità della fetta e l'area encefalica di interesse. Ingrandimenti maggiori, 20x e 40x, sono stati utilizzati per valutare la citoarchitettura e la popolazione cellulare; per quest'ultimo aspetto sono stati utilizzati anche ingrandimenti superiori (60x).

Le sezioni sottoposte a indagine di immunofluorescenza sono state osservate, raccolte ed elaborate al microscopio confocale Leika TCS.

3. RISULTATI

3.1 Valutazione della citoarchitettura della formazione ippocampale di tursiope (*T. truncatus*) in base alle colorazioni di Nissl

La citoarchitettura dell'area ippocampale è stata analizzata secondo lo schema descritto nei lavori di Morgane, Jacobs e McFarland (Jacobs *et al.*, 1979; Morgane *et al.*, 1982 e 1986) nei preparati di tessuto cerebrale di tursiope (*T. truncatus*).

Di seguito vengono descritte nel dettaglio citoarchitettonico tutte le aree della formazione ippocampale riconosciute nell'adulto: la fascia dentata, le aree dell'ippocampo H5, H4, H3, H2, H1 e il subiculum. Per ciascuna area vengono riportate la descrizione della zona presente in letteratura e, successivamente, le osservazioni fatte sulle mie sezioni ottenute da individui adulti e dove possibile anche quelle fatte su sezioni ottenute da soggetti giovani (neonati di 6 e 9 giorni).

3.1.1 Fascia dentata

La fascia dentata nel tursiope (*T. truncatus*) viene descritta in base a studi precedenti come non particolarmente sviluppata in dimensioni e costituita da tre strati: lo strato molecolare (o radiato), lo strato granulare e lo strato polimorfo che costituisce l'ilo della fascia dentata.

Lo spessore del II strato (strato granulare) conta da 6 a 12 cellule strettamente impacchettate tra di loro. Sono cellule dei granuli piccole, di forma da rotondeggiante a ovale; esse risultano più densamente organizzate verso il I strato (strato molecolare), mentre sono più disperse verso il III strato (strato polimorfo). Tra I e II strato le cellule si organizzano in piccoli nidi conferendo un aspetto frastagliato a questa parte della fascia dentata. Le cellule più superficiali sembrano a volte disporsi in file suggerendo un tentativo di laminazione. Lo strato polimorfo è poco cellulare, le cellule presenti sono di piccola o media grandezza e sparse nell'area dell'ilo della fascia dentata e risultano più grandi e maggiormente poligonali delle cellule dei granuli del II strato.

La fascia dentata nei Cetacei di giovane età (feti o neonati) viene descritta negli atlanti anatomici presenti in letteratura (Jacobs *et al.*, 1979; Morgane *et al.*, 1982 e 1986) come completa dei tre strati, con lo strato granulare formato da cellule strettamente impacchettate e caratterizzato da neuroni con soma intensamente ipercromatico non riscontrabile negli adulti (in tale studio si è fatto riferimento ad immagini di preparati ottenuti da un feto di sette mesi di stenella *Stenella caeruleoalba*, un delfinide simile al tursiope *Tursiops truncatus*).

Le mie analisi dei preparati di soggetti giovani di tursiope hanno presentato alcune difficoltà nell'individuazione della fascia dentata a causa sia delle piccole dimensioni dei campioni di tessuto cerebrale, sia per il danneggiamento del campione durante le fasi di taglio e allestimento del vetrino. Per questo motivo non sempre è stato possibile riconoscere la fascia dentata nei soggetti giovani, mentre nei soggetti adulti questa componente della formazione ippocampale è sempre stata individuata e descritta. Le osservazioni hanno confermato quanto presente in letteratura ed è stato possibile mettere in evidenza cellule dei granuli fittamente impacchettate con tendenza alla laminazione o raggruppate in piccoli nidi nella porzione della fascia dentata verso l'ippocampo. Al contrario l'aspetto frastagliato tra I e II strato non è risultato così evidente, mentre questa caratteristica è stata riscontrata tra II e III strato, verso l'ilo della fascia dentata dove sono stati individuati anche alcuni neuroni piramidali isolati (Figura 10).

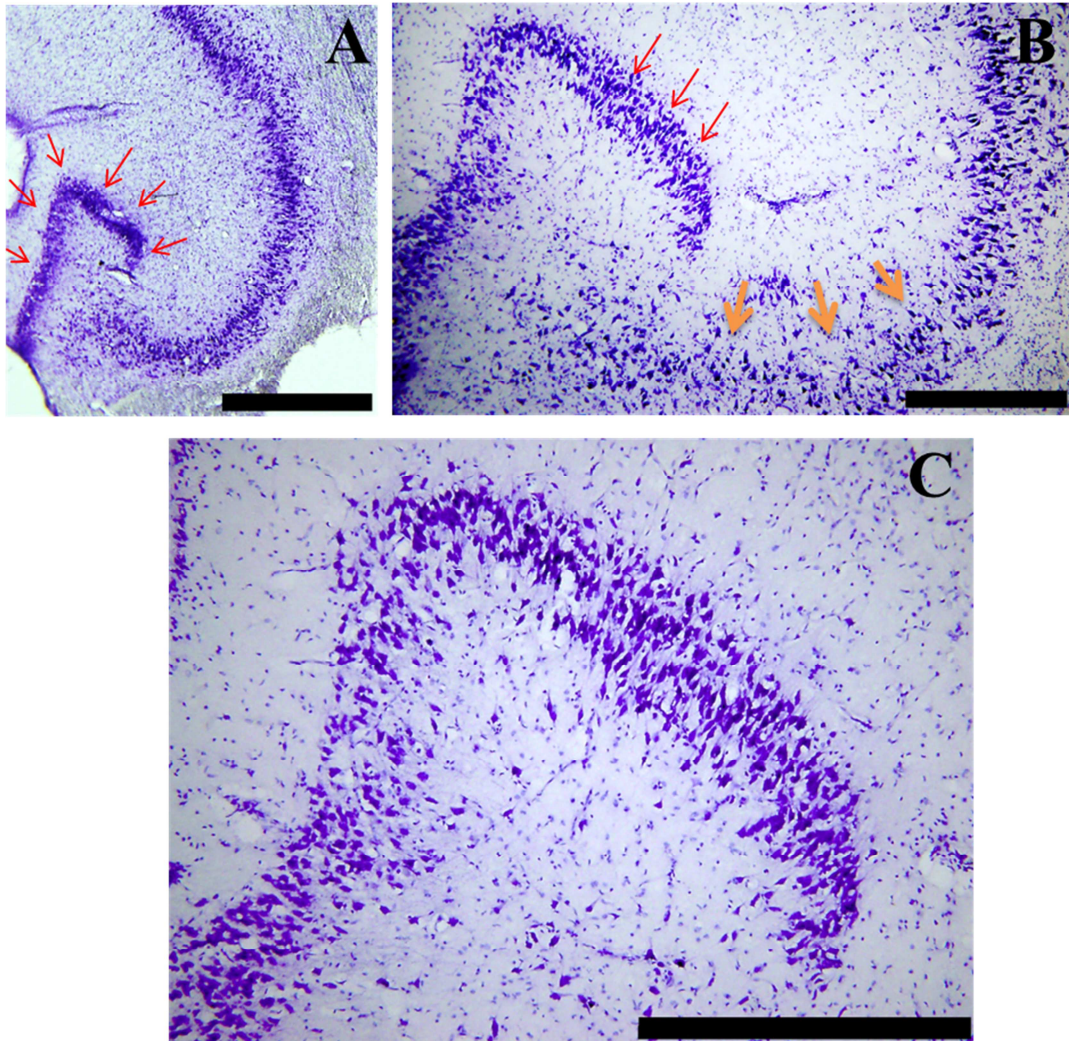


Figura 10: Fascia dentata di tursiope (*T. truncatus*) a diversi ingrandimenti. A) La fascia dentata è indicata dalle frecce rosse; B) Si nota come le cellule della fascia dentata (frecce rosse) risultino più fittamente impacchettate rispetto alle cellule dell'ippocampo (frecce arancio); C) A questo ingrandimento è possibile distinguere nel dettaglio i tre strati della fascia dentata (molecolare, granulare e pleomorfo); inoltre si possono osservare l'allineamento cellulare nel II strato e le poche cellule sparse nell'ilo della fascia dentata. La barra nera corrisponde a 1000 μm in (A) e a 500 μm in (B) e (C).

3.1.2 Ippocampo

Secondo la terminologia di Rose (1929) che ha basato il suo metodo di caratterizzazione su parametri citoarchitettonici del tessuto nervoso, nell'ippocampo vengono distinti cinque settori che sono denominati H1, H2, H3, H4, H5. In ogni settore si possono distinguere i tre strati classici dell'allocorteccia (molecolare, cellulare e pleomorfo) mentre solo in alcuni settori si possono individuare ulteriori strati (paragrafo 1.7.1).

Nel tursiope il II strato (o strato cellulare) lungo tutto l'ippocampo può essere suddiviso in uno strato superficiale ricco di cellule e ipercromico e in uno strato profondo con meno cellule, più chiaro ed omogeneo. Questa distinzione è più o meno evidente nelle diverse aree ippocampali. Per quanto riguarda la situazione negli animali giovani, in letteratura tutti i settori dell'ippocampo sono stati riconosciuti topograficamente ma a causa dell'elevata densità cellulare i dettagli cellulari e morfologici non sono stati definiti chiaramente. E' stato invece possibile distinguere in alcuni punti lo strato superficiale e lo strato profondo del II strato dell'ippocampo.

Le osservazioni condotte sui miei preparati hanno confermato la citoarchitettura dei vari settori dell'ippocampo descritta in letteratura aggiungendo ulteriori dettagli strutturali e morfologici. Anche nei soggetti giovani è stato possibile osservare l'organizzazione dello strato cellulare ma la sua suddivisione in uno strato superficiale e uno profondo non era sempre ben definibile. Inoltre a causa della frammentazione delle sezioni di tessuto nervoso osservate non è stata possibile una determinazione precisa del settore analizzato riducendo il valore stesso dell'osservazione.

Nei paragrafi successivi ho descritto i vari settori dell'ippocampo confrontandoli con quanto riportato negli studi precedenti di Morgane, Jacobs e McFarland (Jacobs *et al.*, 1979; Morgane *et al.*, 1982 e 1986).

a) Settore H5

Secondo quanto riportato in studi precedenti, il settore H5 è situato nell'ilo della fascia dentata, è il meno sviluppato nel tursiope (*T. truncatus*) ed è costituito da cellule polimorfe di piccola o media grandezza. Queste cellule sembrano avere scarsa affinità tintoriale per le colorazioni istologiche di Nissl e si ritrovano sparse e poco organizzate nell'area dell'ilo della fascia dentata. Nei miei preparati le cellule hanno invece mostrato una colorazione intensa permettendo di distinguere le diverse morfologie. Lo strato cellulare non è risultato ancora ben organizzato ma è stato possibile notare un progressivo raggruppamento regolare ed un allineamento delle cellule in direzione dei successivi settori ippocampali (Figura 11).

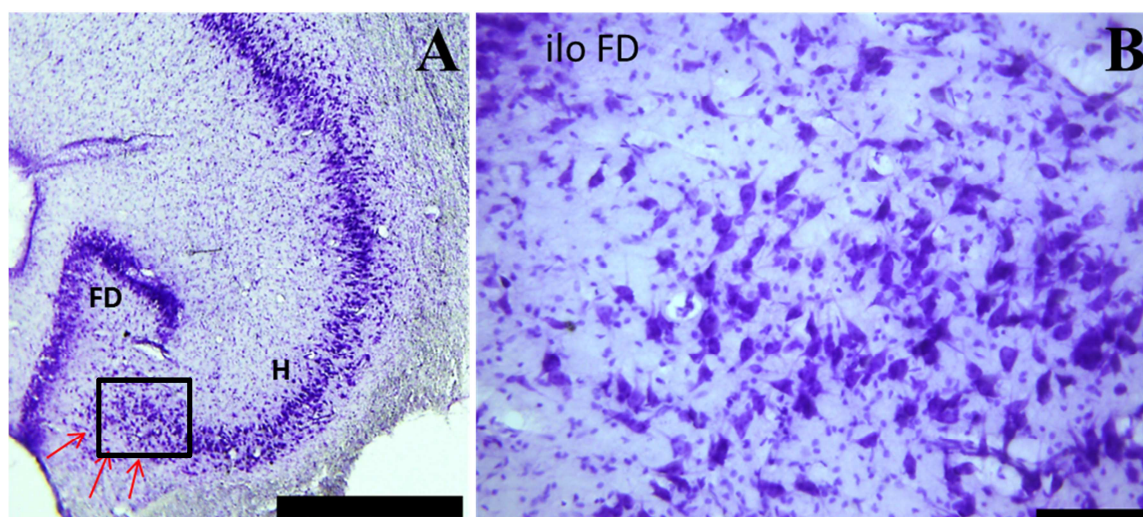


Figura 11: Settore H5 dell'ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). A) Le frecce rosse indicano la posizione del settore H5 rispetto alla fascia dentata (FD) e ai restanti settori dell'ippocampo. Alcune cellule piramidali del settore H5 si trovano molto in profondità nell'ilo della fascia dentata. B) Ingrandimento dell'area del riquadro in (A), si notano le cellule polimorfe di piccole e medie dimensioni poco organizzate con tendenza a disperdersi verso l'ilo della fascia dentata. La barra nera corrisponde a 1000 μm in (A) e 100 μm in (B).

b) Settore H4

Il settore H4, in base a precedenti studi, si estende lungo la porzione di tessuto cerebrale laterale al solco ippocampale ed è caratterizzato da un maggior numero di cellule piramidali grandi che si organizzano in maniera sempre più ordinata procedendo verso il fondo del solco ippocampale. Lo strato cellulare si divide in due ulteriori strati, detti superficiale e profondo, che sono separati da uno strato relativamente privo di cellule. Lo strato superficiale è più spesso, con alta densità cellulare e neuroni che presentano una morfologia ovale e piramidale, si colorano molto intensamente e tendono ad aggregarsi in nidi a mano a mano che ci si avvicina al settore H3. Le cellule dello strato profondo sono invece più piccole, principalmente rotondeggianti con scarsa affinità tintoriale. Queste cellule sono più sparse e molte di esse tendono a proiettarsi nello strato acellulare mascherando l'effetto di separazione tra i due strati, superficiale e profondo. Nei miei campioni tutte le caratteristiche sopracitate e riportate in letteratura sono state confermate e descritte (Figura 12).

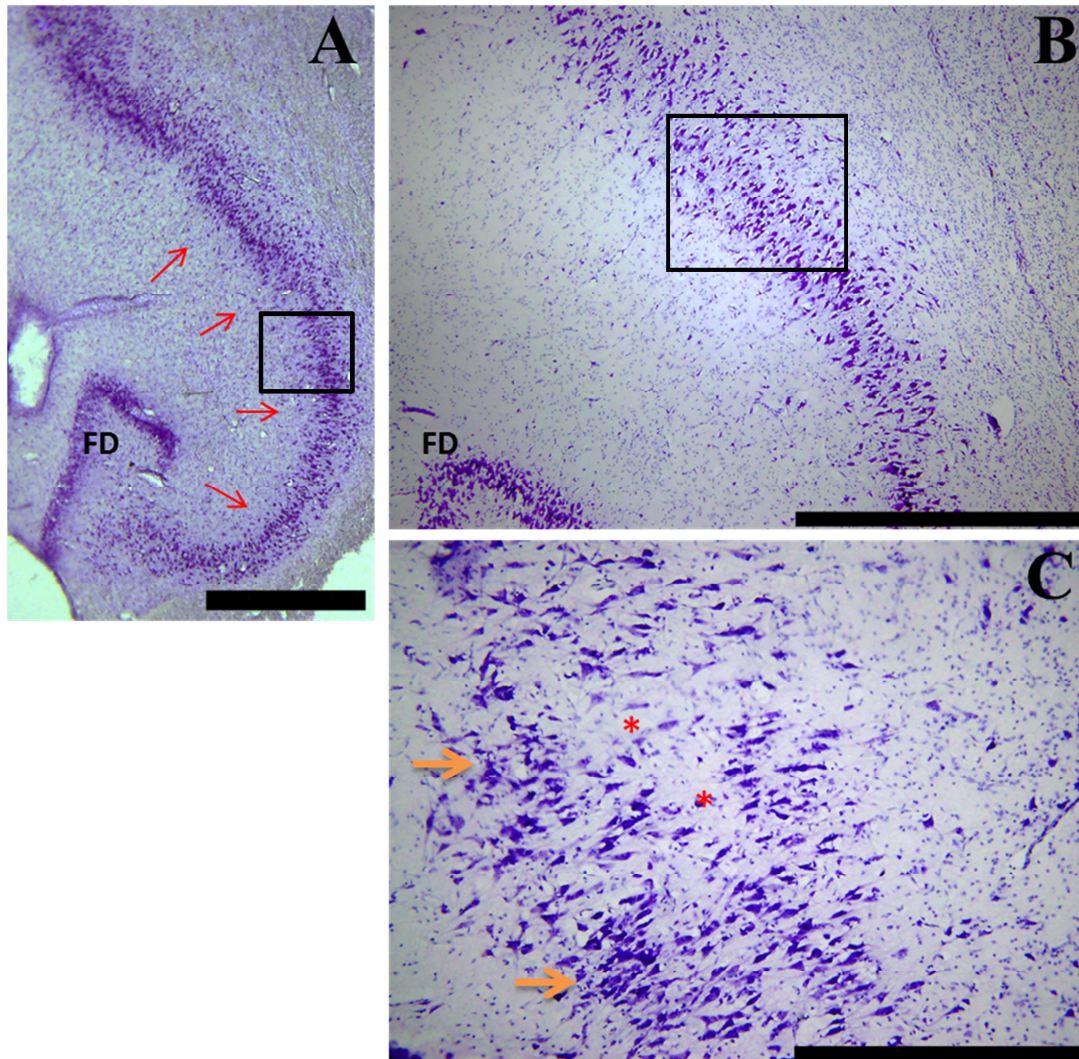


Figura 12: Settore H4 dell'ippocampo di tursiope (*T. truncatus*) a diversi ingrandimenti. **A)** Posizione del settore H4 (freccie rosse) rispetto alla fascia dentata (FD). **B)** Ingrandimento di una parte del settore H4 più o meno corrispondente al riquadro disegnato in (A), si notano l'allineamento cellulare del II strato con la possibilità di distinguere uno strato superficiale più cellulare ed uno profondo con meno cellule. **C)** Particolare di B a maggior ingrandimento corrispondente al riquadro disegnato in (B), gli asterischi indicano lo strato acellulare che separa lo strato profondo e lo strato superficiale caratterizzato da nidi di cellule (freccie arancio). La barra nera corrisponde a 1000 μm in (A) e (B), a 100 μm in (C).

c) Settore H3

Il settore H3 è collocato secondo i dati riportati in letteratura in corrispondenza del fondo del solco ippocampale ed è caratterizzato dal notevole aumento di spessore dello strato cellulare (II strato). La cellularità e le dimensioni dei neuroni sono aumentate rispetto alle altre aree ippocampali ed anche i raggruppamenti a nido sono più consistenti. Inoltre lo strato acellulare che divide lo strato superficiale da quello profondo si evidenzia maggiormente.

Nei miei campioni di ippocampo di tursiope è stato possibile individuare per questo settore tutte le caratteristiche descritte in letteratura, ma con una diversa organizzazione tra strato superficiale e strato profondo a livello del fondo del solco ippocampale. Nel nostro caso le cellule dello strato superficiale hanno mostrato un aspetto radiale mentre le cellule dello strato profondo sono risultate disposte a fasci longitudinali (Figura 13). Lo strato acellulare è risultato più evidente dopo la curva che lo strato cellulare disegna in corrispondenza del fondo del solco ippocampale.

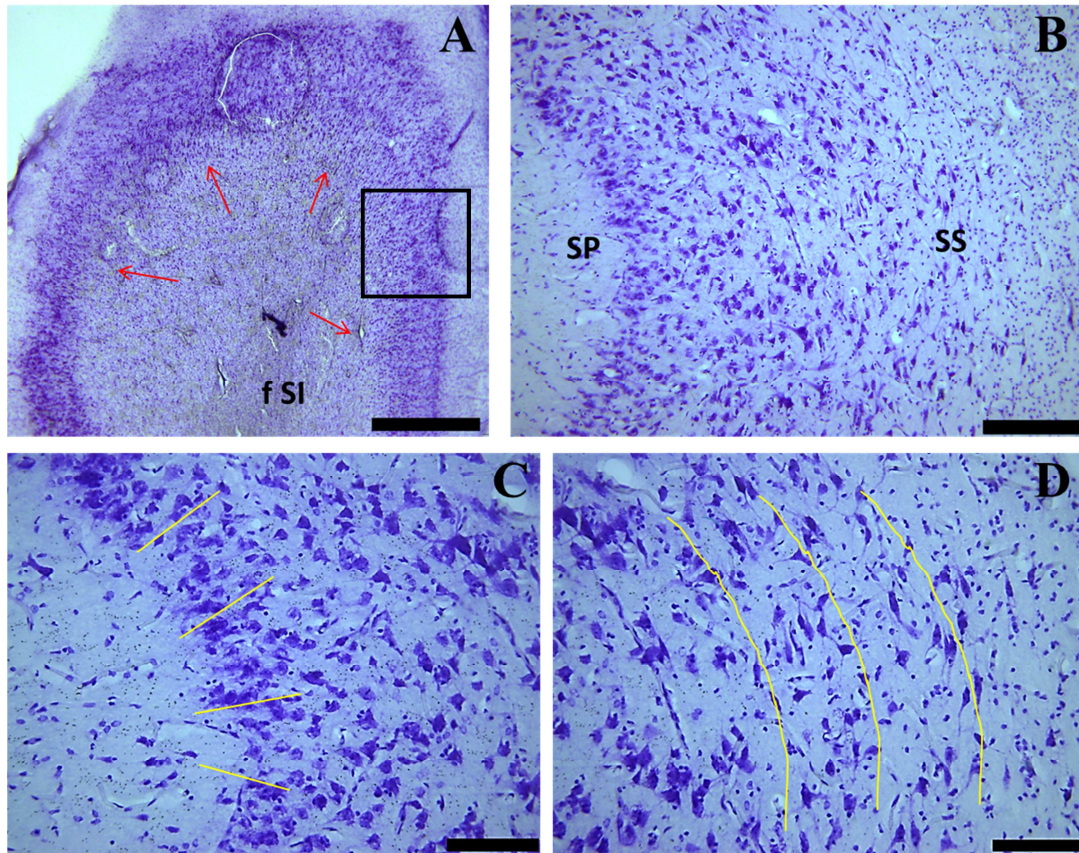


Figura 13: Settore H3 dell'ippocampo di tursiope (*T. truncatus*) a diversi ingrandimenti. A) Le frecce rosse indicano la disposizione del settore H3 rispetto al fondo del solco ippocampale (f SI). B) Area del settore H3 a maggiore ingrandimento corrispondente più o meno al riquadro disegnato in (A). Si distinguono chiaramente uno strato profondo (SP) con disposizione radiale delle cellule come evidenziato dalle linee gialle in (C), e uno strato superficiale (SS) meno cellulare e con disposizione non radiale delle cellule indicato dalle linee gialle in (D). La barra nera corrisponde a 1000 μm in (A), a 200 μm in (B) e a 100 μm in (C) e (D).

d) Settore H2 e settore H1

Secondo quanto riportato in letteratura il settore H2 si estende lungo la porzione paraippocampale, mediale al solco ippocampale. Sia lo strato superficiale che quello profondo sono descritti come aumentati di spessore con le cellule ovali e piramidali dello strato superficiale che si aggregano in densi nidi cellulari di diversa forma e dimensione, separati da aree prive di cellule. L'effetto finale di questa organizzazione architettonica è un aspetto corrugato o interrotto dello strato cellulare lungo tutto il settore ippocampale.

Nei miei preparati l'aspetto corrugato è stato riscontrato solo nella parte finale del settore H2 e solo nello strato superficiale. Nelle aree di transizione tra settore H3 e settore H2 è stato possibile riconoscere aggregati cellulari più piccoli (Figura 14).

In letteratura il settore H1 si continua al settore H2 lungo la porzione paraippocampale del solco ippocampale occupando la parte più dorsale del giro paraippocampale. E' molto simile al settore precedente ma è possibile notare un progressivo diminuire dell'aspetto corrugato dovuto a una minor definizione degli aggregati cellulari. Inoltre lo strato profondo si allarga e proietta nella sottostante materia bianca del giro paraippocampale.

Nei nostri preparati abbiamo individuato il settore H1 come la porzione di ippocampo compresa dal punto in cui scompaiono i densi nidi cellulari del settore H2 e il punto in cui lo strato profondo si allarga notevolmente verso il sottostante tessuto nervoso (Figura 14).

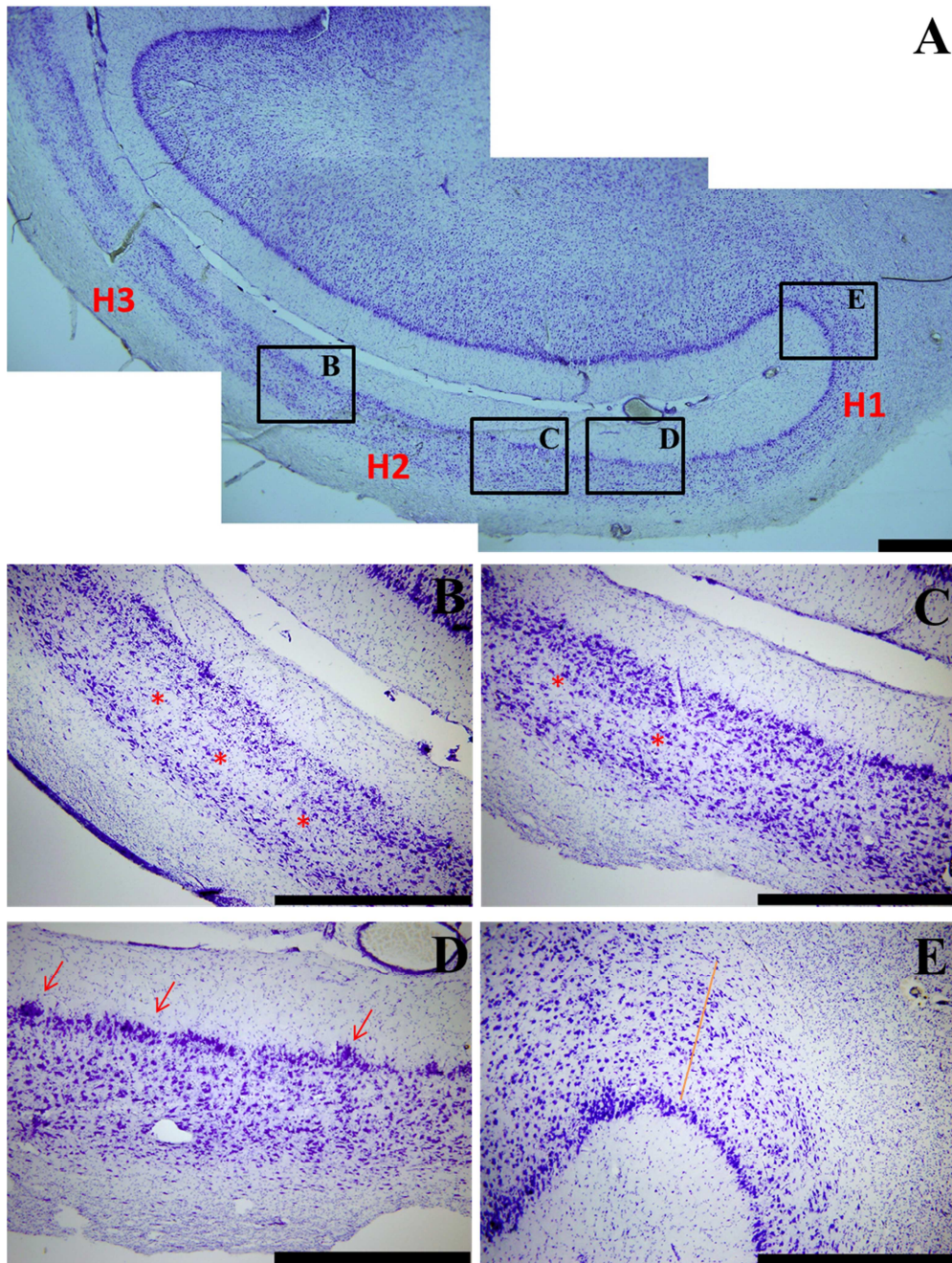


Figura 14: Settori H3, H2 e H1 dell'ippocampo di tursiopo (*T. truncatus*) A) Unione di più fotogrammi a basso ingrandimento per valutare l'area nel suo complesso, sono indicati i tre settori ippocampali. I riquadri indicano le zone osservate a maggior ingrandimento e riportate nelle figure (B), (C), (D) e (E). B) e C) Aree di transizione dal settore H3 al settore H2. Si notano la progressiva scomparsa dello strato acellulare (indicato dagli asterischi) tra lo strato superficiale e lo strato profondo. D) Settore H2, lo strato superficiale presenta nidi cellulari molto densi (freccie rosse) separati da zone scarsamente cellulari. E) Settore H1, da notare l'infiltrazione delle cellule dello strato profondo verso le aree cerebrali sottostanti (la linea arancio indica il punto dove questo effetto si fa più evidente). Il passaggio da ippocampo a subiculum non è chiaro, la stessa linea arancio potrebbe indicare l'inizio del subiculum. La barra nera corrisponde a 1000 μ m.

3.1.3 Subiculum

Il subiculum è l'estensione dell'ippocampo, in particolare del settore H1, e si trova oltre la parte più dorsale del giro paraippocampale, parallelo al settore H2.

In questa area lo strato cellulare (II strato) aumenta di spessore e risulta più omogeneo. La densità cellulare è minore rispetto alle altre aree e le cellule tendono ad assumere orientamento radiale. La separazione tra II e III strato è meno marcata perchè molte cellule dello strato cellulare si proiettano nello strato polimorfo (effetto "spilling"). Il passaggio verso le zone di transizione (præsubiculum-parasubiculum-corteccia entorinale) è indicata da una evidente riduzione dello spessore dello strato cellulare del subiculum e da un aumento della cellularità dello strato superficiale del præsubiculum.

Nella mia analisi mi sono limitato a cercare di individuare la porzione iniziale del subiculum basandomi sulle caratteristiche citoarchitettoniche descritte in letteratura (Figura 15).

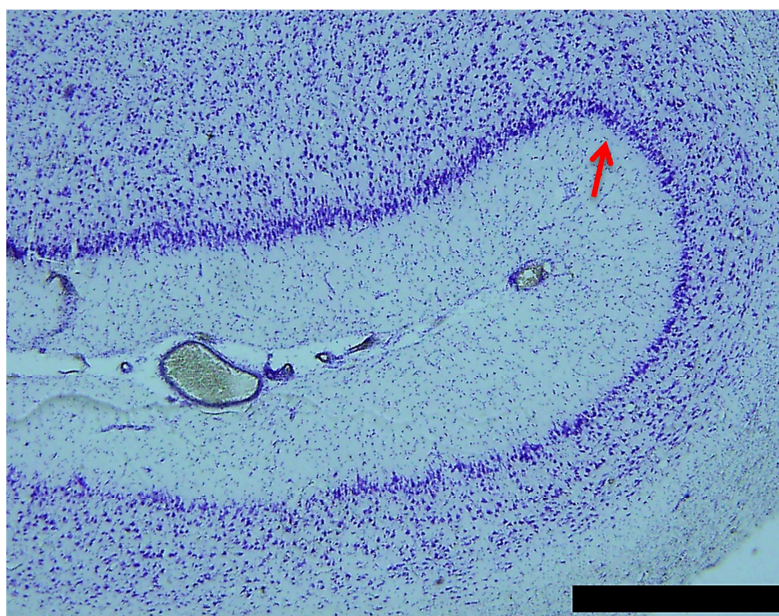


Figura 15: Settori H2 e H1 dell'ippocampo e subiculum del tursiope (*T. truncatus*). La freccia rossa indica il punto in cui lo strato cellulare diventa più spesso ed omogeneo cominciando ad avere le caratteristiche tipiche del II strato del subiculum. La barra nera corrisponde a 1000 µm.

3.2 Tipologie cellulari identificate nella formazione ippocampale

La principale tipologia di neuroni presente nell'ippocampo è quella piramidale. Neuroni piramidali sono presenti in tutta la formazione ippocampale, più rari nella fascia dentata, preponderanti nei settori dell'ippocampo e nel subiculum.

Le cellule piramidali si presentano con una forma più o meno caratteristica nelle diverse componenti della formazione ippocampale. Si va da una forma piramidale classica a cellule piramidali arrotondate, ovalari e fusiformi fino alle cellule piramidali giganti di Betz. Inoltre sia l'affinità tintoriale che la grandezza delle cellule sono eterogenee nelle diverse aree (Figure 16 e 18).

Nei miei preparati sono state individuate tutte le forme piramidali classiche e con frequenza minore anche cellule con morfologia diversa. Nella fascia dentata sono state identificate primariamente cellule dei granuli, ovali, e cellule non granulari nella parte più profonda dello strato granulare. In letteratura (Morgane *et al.*, 1986) sono state descritte cellule bipolari con localizzazione tra strato granulare e strato molecolare della fascia dentata, ma nelle sezioni di ippocampo da me osservate non sono state riconosciute in questa zona. Nell'ippocampo sono state spesso identificate anche piccole cellule polimorfe e stellate (Figura 17).

Di particolare interesse è stato il riconoscimento di cellule bipolari fusiformi con pirenoforo rotondeggiante, più grandi delle vicine cellule piramidali e con prolungamenti dendritici semplici. Queste caratteristiche ci hanno permesso di classificare questi neuroni come cellule di von Economo (VENs: von Economo's Neurons) (Figura 19).

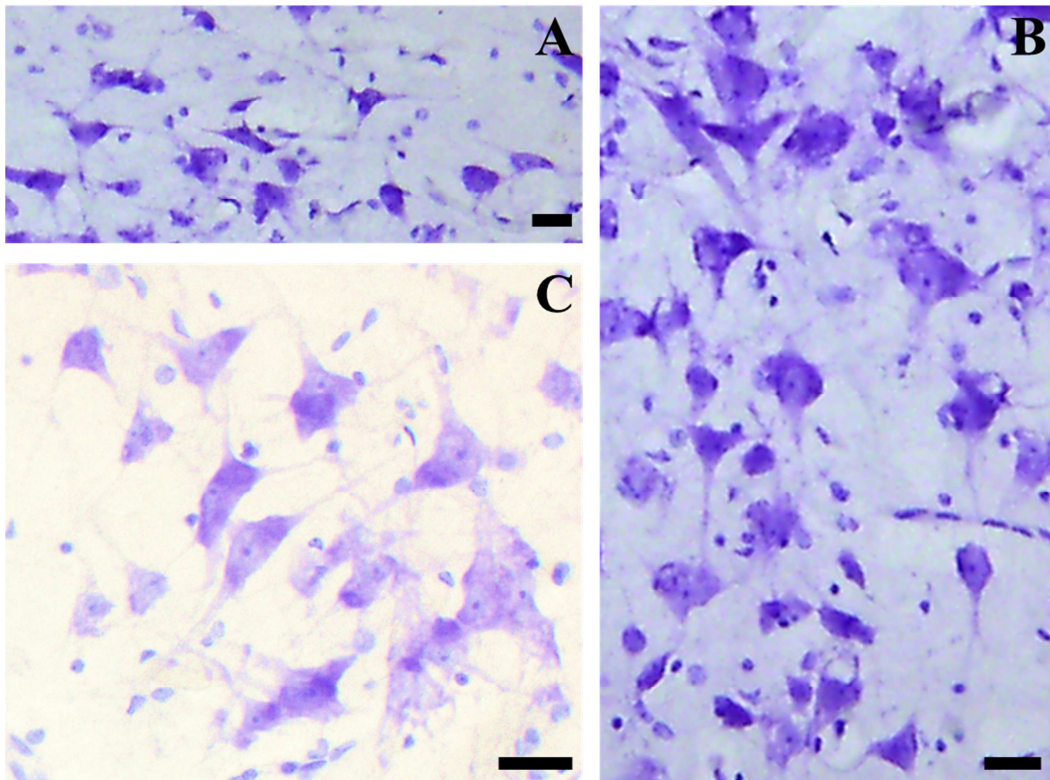


Figura 16: Cellule piramidali osservate nei vari settori dell'ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). Le dimensioni sono varie e anche la morfologia che va dalla classica piramidale (A e B) alla piramidale ovale o rotondeggiante (C). La barra nera corrisponde a 30 μm.

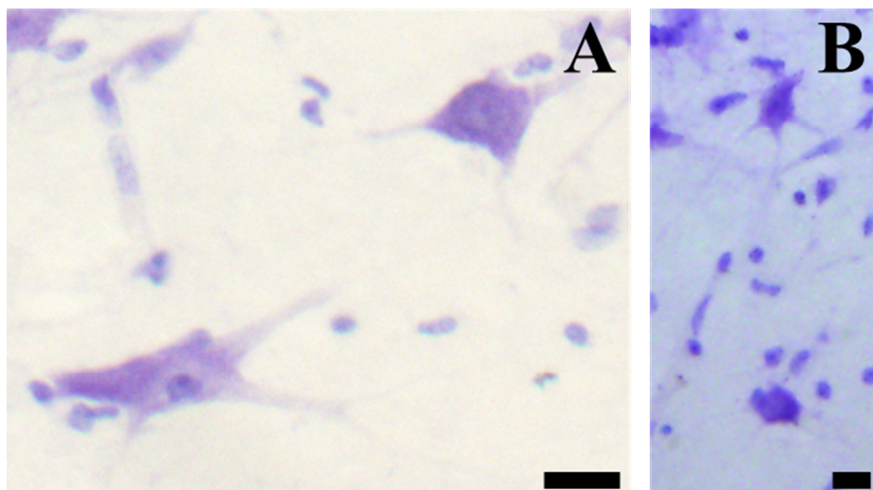


Figura 17: Cellule multipolari stellate individuate ai margini dello strato cellulare dell'ippocampo (A) ma anche più profondamente (B). La barra nera corrisponde a 30 μm.

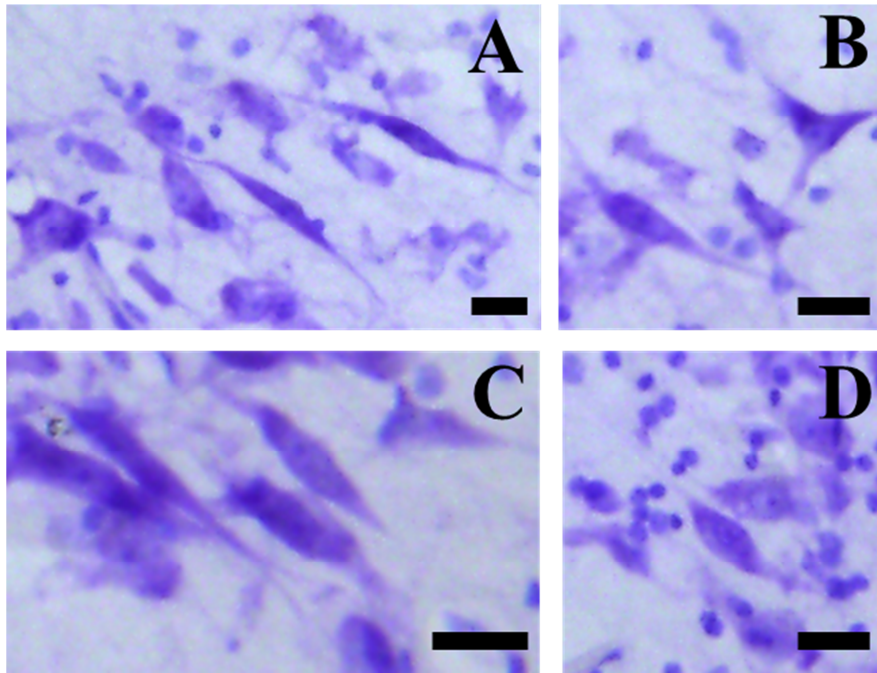


Figura 18: A), B), C) e D) Cellule bipolari individuate in tutti i settori dell'ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). Sono cellule fusiformi con spigolature più o meno evidenti. La barra nera corrisponde a 30 μm .

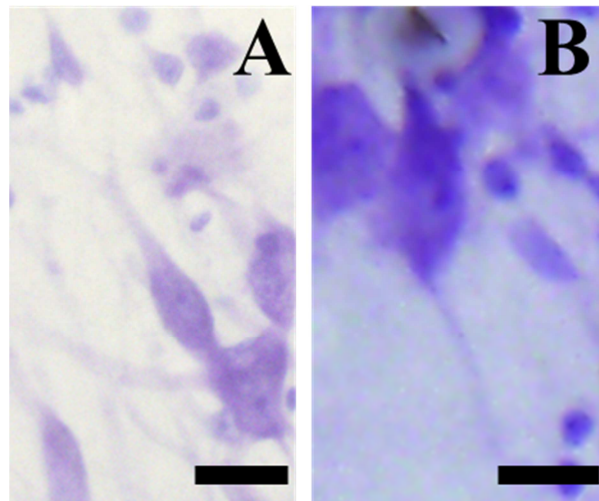


Figura 19: A) e B) Cellule bipolari individuate occasionalmente nelle diverse aree della formazione ippocampale. La particolare morfologia ci ha permesso di classificarle come cellule di von Economo. La barra nera corrisponde a 30 μm .

3.3 Indagine neurochimica

Numerosi studi hanno dimostrato la co-localizzazione dell'acido- γ -aminobutirrico (GABA) con proteine leganti il calcio quali la parvalbumina (PV), la calbindina (CB) e la calretinina (CR).

La distribuzione di queste proteine nella popolazione cellulare del sistema nervoso centrale è stata definita in animali da laboratorio, quali il ratto e il topo, e nei Primati, uomo compreso. Per quanto riguarda i Cetacei, sono stati pubblicati alcuni lavori che indagano questi aspetti di neurochimica nella corteccia visiva e acustica (Glezer *et al.*, 1998; Hof *et al.*, 2000), mentre al meglio delle nostre conoscenze la formazione ippocampale è stata oggetto di una sola analisi preliminare nel 1995 (Glezer *et al.*, 1995) a cui però non ha seguito alcuna pubblicazione scientifica *in extenso*.

3.3.1 Parvalbumina

In letteratura, nell'uomo e negli animali da laboratorio, la parvalbumina (PV) è stata individuata negli interneuroni della fascia dentata e della porzione più caudale e laterale della corteccia entorinale (Insausti e Amaral, 2004).

Nei miei preparati di sezioni di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*), in tutti i settori ippocampali risultano presenti neuroni positivi al marcaggio con anticorpo anti-PV. La reattività risulta più evidente nei settori H5 e H4 (Figura 20), mentre contrariamente a quanto riportato in letteratura per gli altri animali, la fascia dentata si mostra solo blandamente marcata (Figura 21).

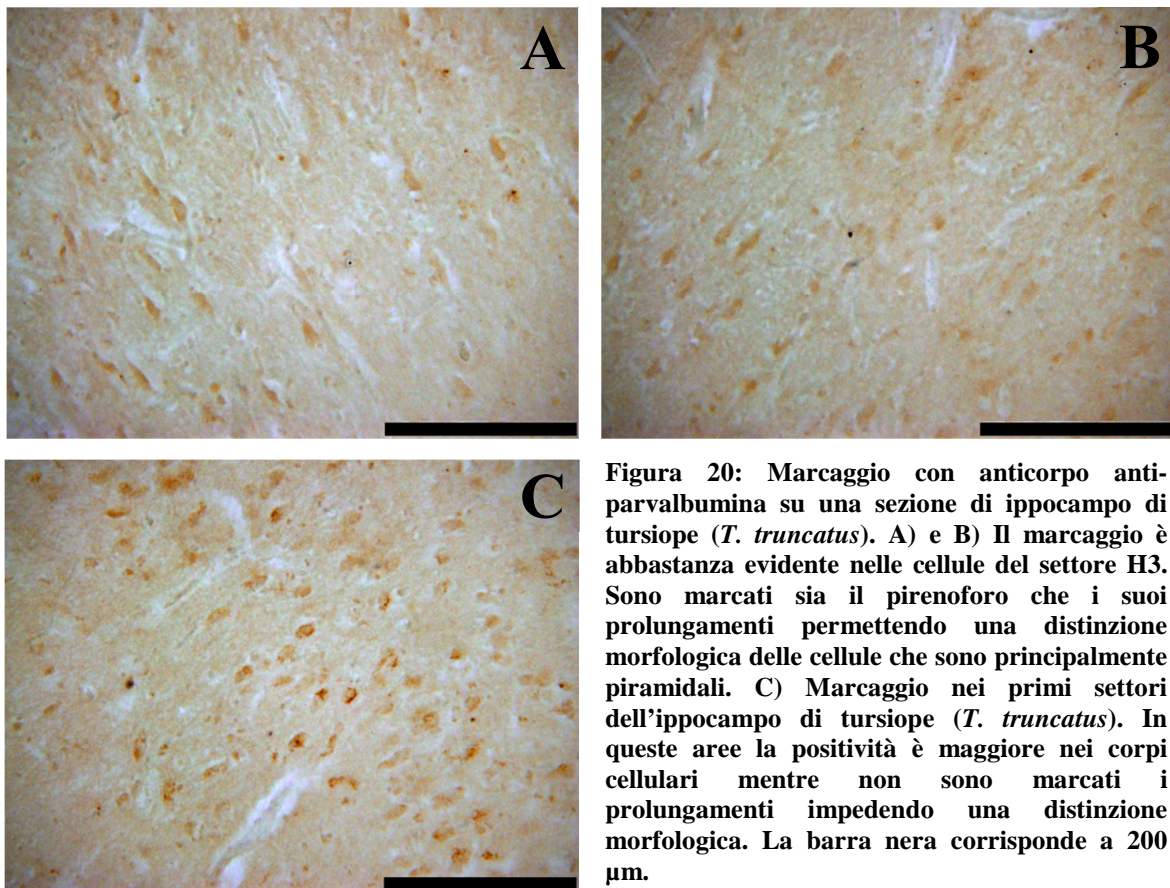


Figura 20: Marcaggio con anticorpo anti-parvalbumina su una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). A) e B) Il marcaggio è abbastanza evidente nelle cellule del settore H3. Sono marcati sia il pirenoforo che i suoi prolungamenti permettendo una distinzione morfologica delle cellule che sono principalmente piramidali. C) Marcaggio nei primi settori dell'ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). In queste aree la positività è maggiore nei corpi cellulari mentre non sono marcati i prolungamenti impedendo una distinzione morfologica. La barra nera corrisponde a 200 μ m.

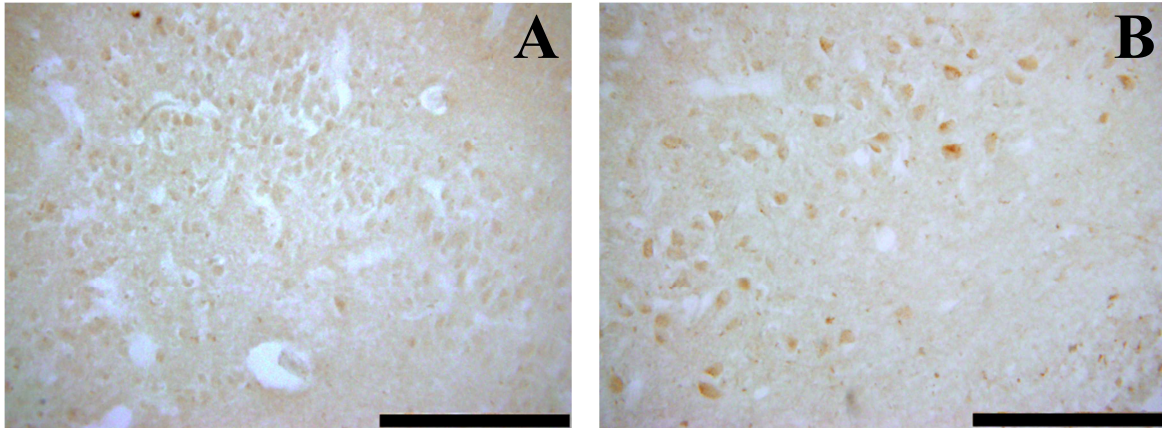


Figura 21: Marcaggio con anticorpo anti-parvalbumina nell'area della fascia dentata di tursiope (*T. truncatus*). A) Il marcaggio è evidente ma risulta difficile una caratterizzazione morfologica. B) A ingrandimento maggiore è possibile distinguere maggiormente le cellule, ma il marcaggio si evidenzia comunque solo nei pirenofori e non nei prolungamenti non consentendo un riconoscimento morfologico. La barra nera corrisponde a 500 µm in (A) e a 200 µm in (B).

3.3.2 Calbindina

Nei lavori presenti in bibliografia sull'uomo e gli animali da laboratorio (Insausti e Amaral, 2004), la calbindina (CB) è stata identificata principalmente nelle cellule dei granuli ma anche nelle cellule non-granulari dello strato molecolare della fascia dentata; nelle cellule piramidali dei primi settori ippocampali risulta poco rappresentata, mentre risultano reattive molte cellule dei settori H3, H2 e H1, del subiculum e della corteccia entorinale (II e III strato della porzione rostrale e mediale).

Nei miei preparati il marcaggio è risultato molto debole in tutta la formazione ippocampale e solo in alcuni settori le cellule si sono marcate in modo più evidente (Figura 22).

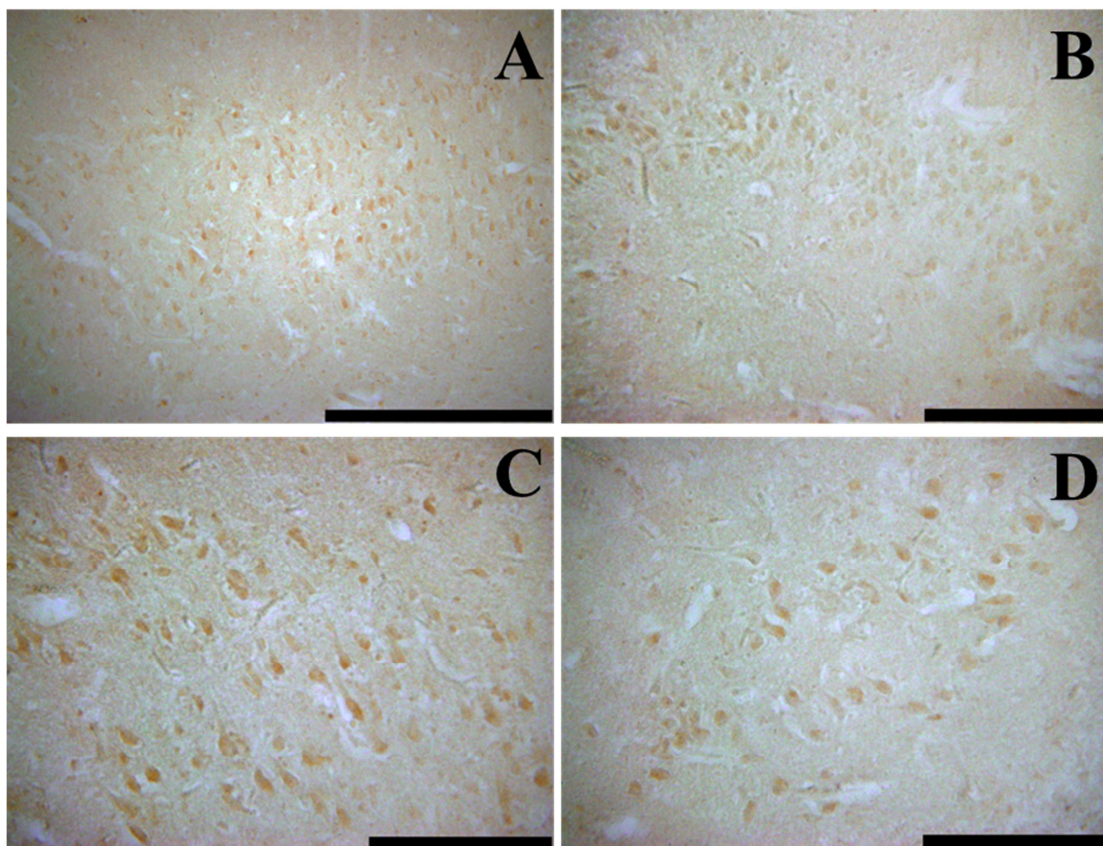


Figura 22: Marcaggio con anticorpo anti-calbindina su una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). A) Settore H3 dell'ippocampo, il marcaggio è relativamente buono e permette una certa distinzione morfologica delle cellule in quanto evidenzia sia il corpo cellulare che i prolungamenti cellulari (C). B) Fascia dentata, il marcaggio è debole e anche ad ingrandimento maggiore (D) è difficile distinguere morfologicamente le cellule. La barra nera corrisponde a 500 μm in (A) e (B), a 200 μm in (C) e (D).

3.3.3 Calretinina

Nelle analisi riportate in letteratura riguardanti l'uomo e gli animali da laboratorio, la calretinina (CR) è stata individuata nei neuroni dello strato molecolare della fascia dentata e in quelli che circondano le cellule piramidali del settore H3. Sono state riscontrate alcune cellule reattive alla CR anche nel V e VI strato della porzione rostrale e mediale della corteccia entorinale.

Nelle mie sezioni di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*) il marcaggio con anticorpo anti-CR ha interessato solo singole cellule nei diversi componenti della formazione ippocampale. Le cellule marcate erano principalmente affusolate e bipolari, più rare le multipolari (Figure 23, 24 e 25).

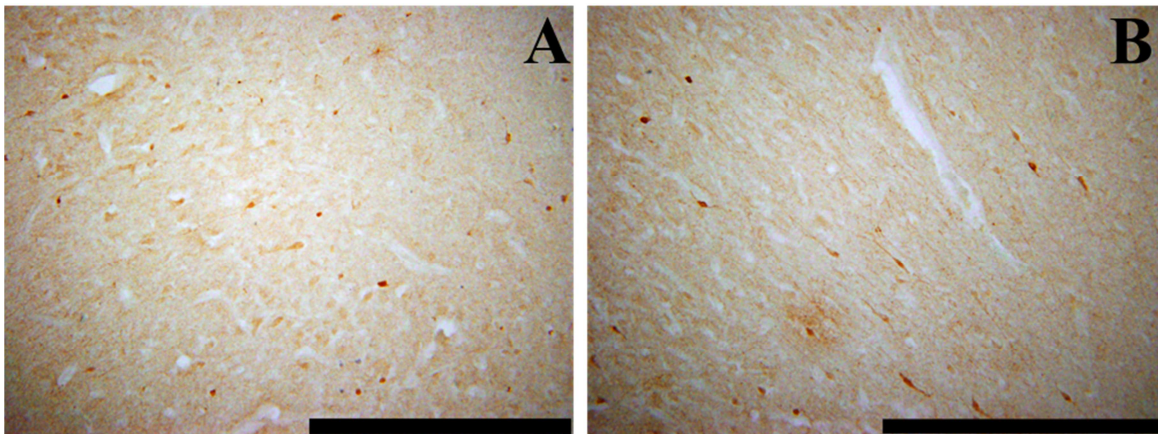


Figura 23: Marcaggio con anticorpo anti-CR su una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). A) Il marcaggio è molto evidente in alcune cellule mentre è praticamente assente nel resto della popolazione cellulare. B) Marcaggio molto evidente di alcune cellule bipolari con disposizione radiale. La barra nera corrisponde a 500 μ m.

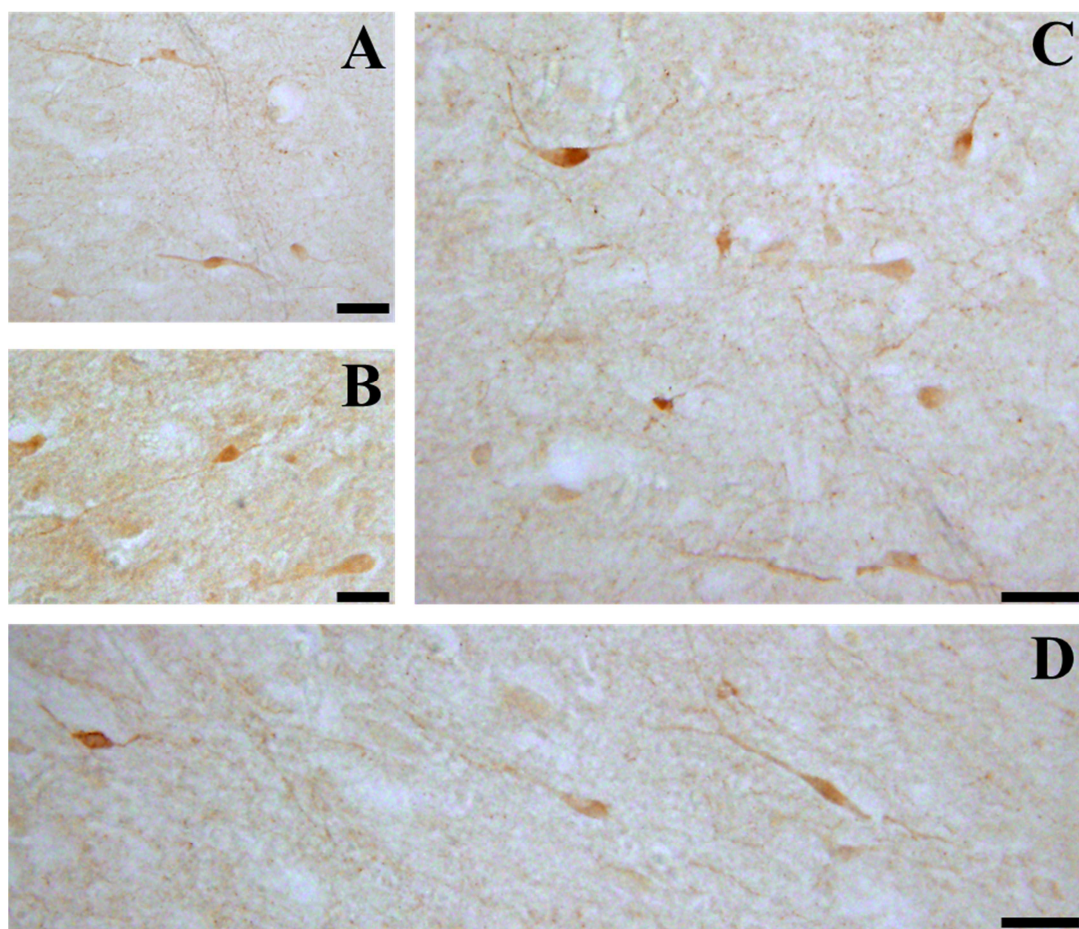


Figura 24: A, B, C e D) Particolari ingranditi dai campi microscopici riportati in Figura 23, neuroni marcati con anticorpo anti-CR. Si nota il marcaggio di singole cellule e la morfologia tendenzialmente bipolare, affusolata o rotondeggiante. La barra nera corrisponde a 50 μ m.

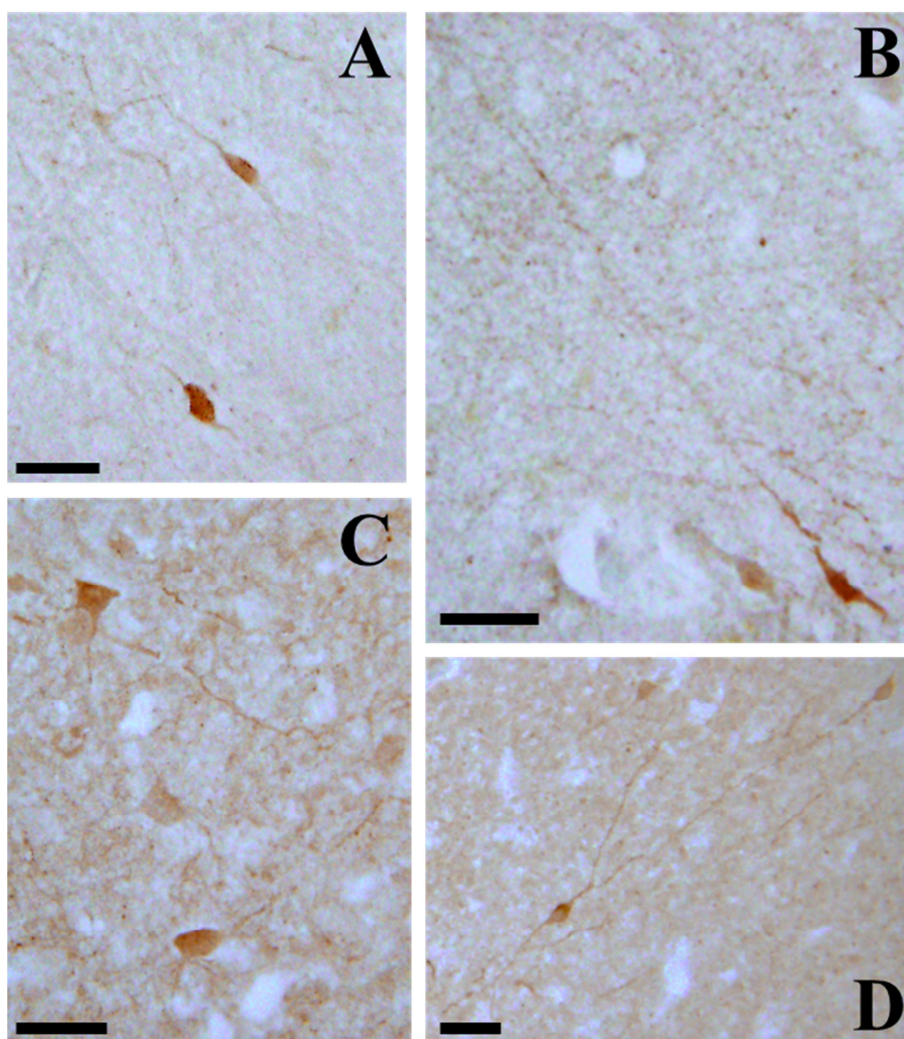


Figure 25: A, B, C e D) Particolari ingranditi dai campi microscopici riportati in Figura 23, neuroni marcati con anticorpo anti-CR. Si nota il diverso grado di marcaggio nelle singole cellule, il marcaggio molto evidente anche nei prolungamenti cellulari e la diversa morfologia cellulare: le cellule bipolari sono frequenti (A e B), mentre le cellule multipolari sono più rare (C e D). La barra nera corrisponde a 50 µm.

3.4 Caratterizzazione della distribuzione gliale nella formazione ippocampale

3.4.1 Marcaggi con metodo immunoenzimatico

L'indagine immunohistochimica con l'utilizzo di un anticorpo contro la glial fibrillary acidic protein (GFAP) mi ha permesso di valutare l'organizzazione della componente gliale della formazione ippocampale del tursiope (*T. truncatus*).

Le cellule gliali si trovano maggiormente concentrate lungo il margine ventricolare. Inoltre esse costituiscono una rete di sostegno meccanico e trofico per i neuroni e si ritrovano tra questi ultimi con una concentrazione diversa nelle varie componenti della formazione ippocampale.

Le mie osservazioni delle sezioni di ippocampo di tursiope marcate con GFAP hanno messo in evidenza un'elevata concentrazione di astrociti lungo il margine ventricolare del solco ippocampale, mentre una concentrazione inferiore è stata riscontrata nello strato cellulare (II strato) della formazione ippocampale, dalla fascia dentata al subiculum (Figure 26 e 27). L'osservazione al microscopio ad ingrandimenti 40x e 60x ha permesso di intuire le interazioni tra astrociti e neuroni (Figura 28).

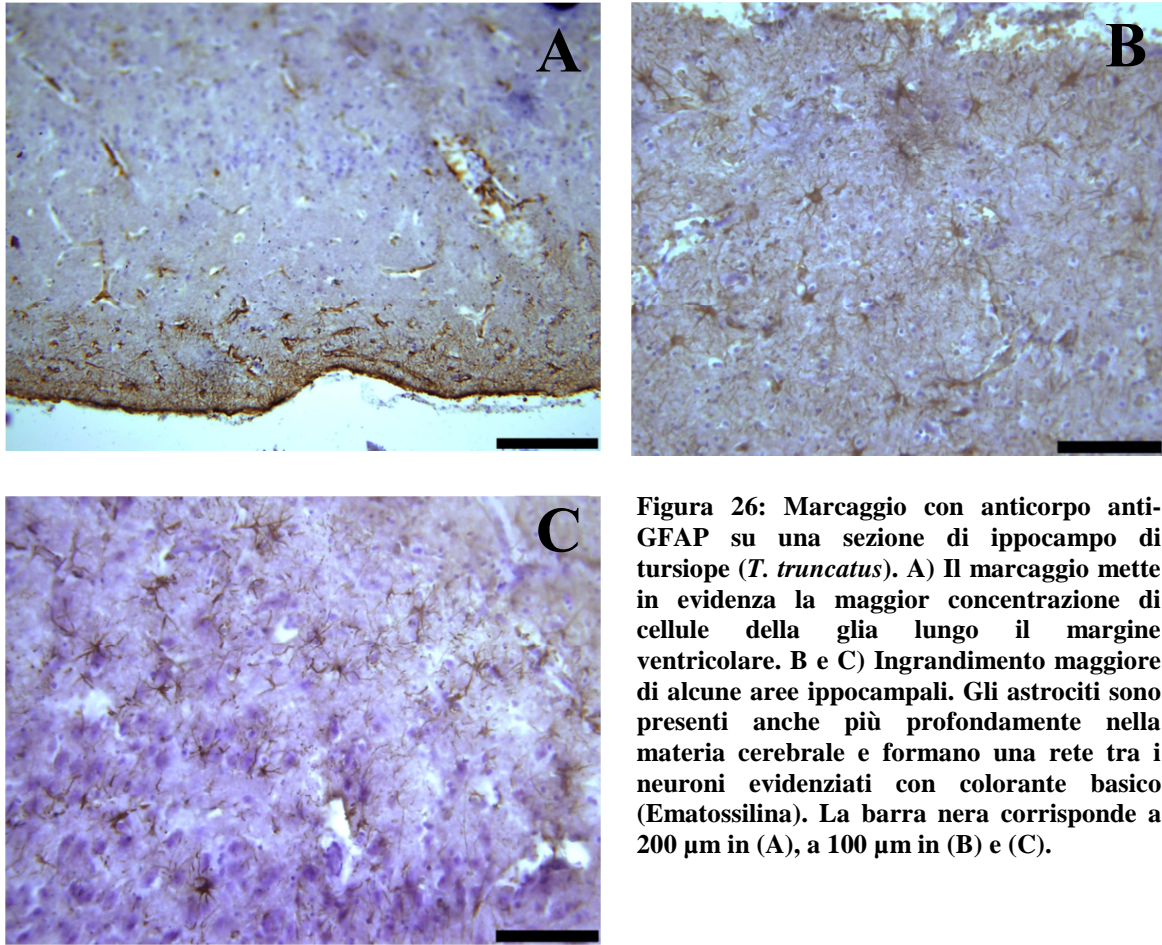


Figura 26: Marcaggio con anticorpo anti-GFAP su una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). A) Il marcaggio mette in evidenza la maggior concentrazione di cellule della glia lungo il margine ventricolare. B e C) Ingrandimento maggiore di alcune aree ippocampali. Gli astrociti sono presenti anche più profondamente nella materia cerebrale e formano una rete tra i neuroni evidenziati con colorante basico (Ematossilina). La barra nera corrisponde a 200 μm in (A), a 100 μm in (B) e (C).

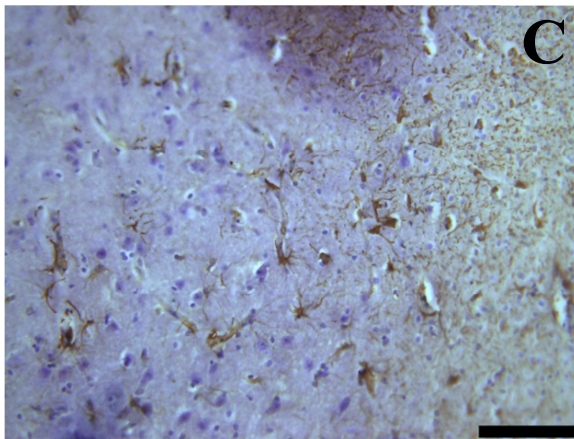
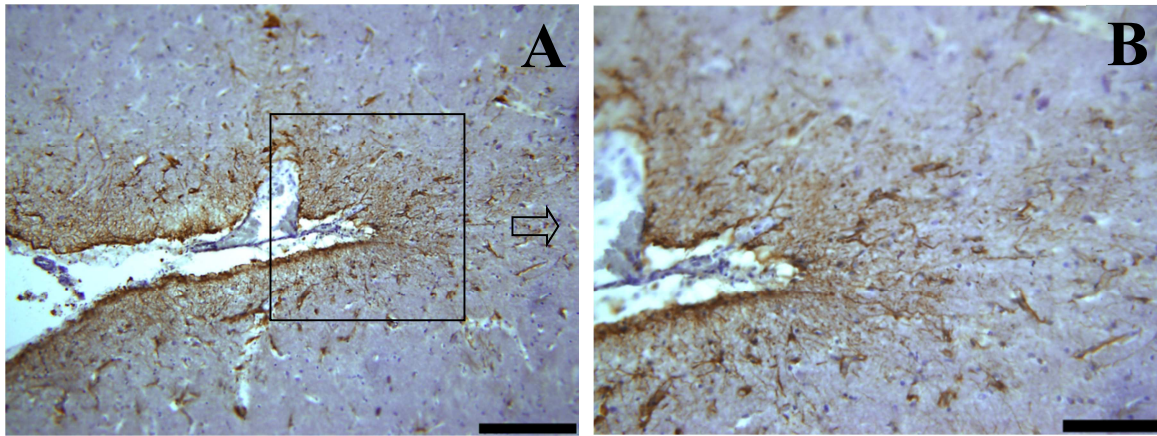


Figura 27: Marcaggio con anticorpo anti-GFAP su una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*) nella regione del fondo del solco ippocampale. **A)** Il marcaggio mette in evidenza la concentrazione di astrociti lungo il margine ventricolare. **B)** Ingrandimento dell'area nel riquadro disegnato in (A) che corrisponde al fondo del solco ippocampale. **C)** Ingrandimento maggiore dell'area situata più profondamente nella materia cerebrale partendo dal fondo del solco ippocampale (indicato in (A) con la freccia). Dopo un'area relativamente povera di astrociti, il marcaggio torna evidente. La barra nera indica 200 μm in (A) e 100 μm in (B) e (C).

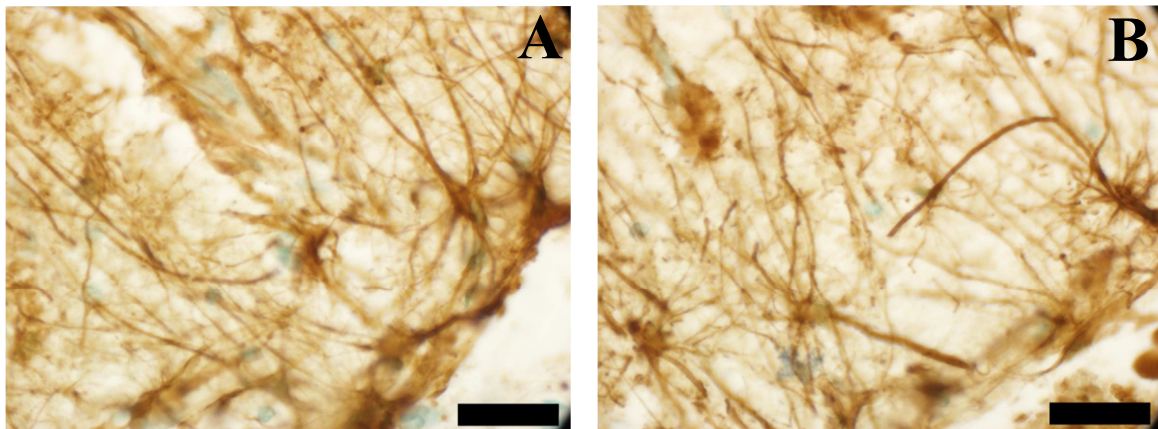


Figura 28: Particolari a maggior ingrandimento di astrociti in ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). Il marcaggio con anticorpo anti-GFAP permette l'osservazione del corpo cellulare dell'astrocita e l'intricata rete dei suoi prolungamenti per gran parte della loro estensione. La barra nera corrisponde a 50 μm .

3.4.2 Marcaggi in fluorescenza

Con l'indagine immunohistochimica in fluorescenza ho voluto integrare i risultati ottenuti con i marcaggi realizzati con il metodo immunoenzimatico. Si è evidenziata la maggior concentrazione delle cellule gliali a livello del margine ventricolare (Figura 29) e la loro presenza all'interno della sostanza bianca dove interagiscono con i neuroni e con le strutture vasali.

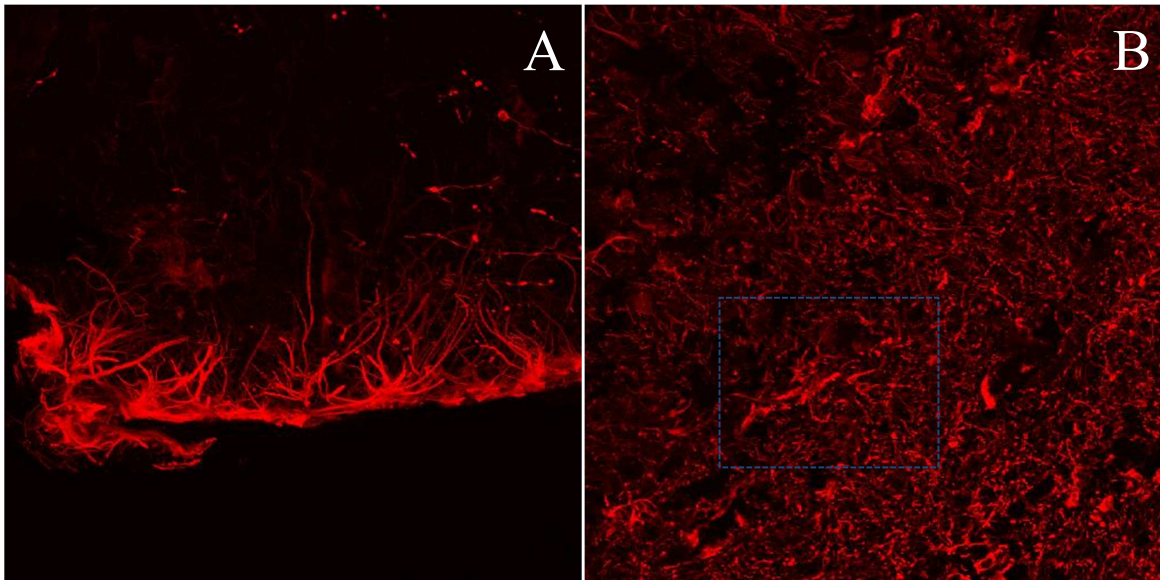


Figura 29: Marcaggio con anticorpo anti-GFAP in fluorescenza su una sezione di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*). A) Il marcaggio mette in evidenza la concentrazione degli astrociti lungo il margine ventricolare. B) Nel riquadro si può riconoscere il corpo cellulare di un astrocita con alcuni prolungamenti marcati. Ingrandimento a 63x in (A), a 40x in (B).

4. DISCUSSIONE

La formazione ippocampale rimane una struttura per molti aspetti ancora poco conosciuta nell'ambito della neuroanatomia ma è stata allo stesso tempo oggetto di numerose indagini di ricerca essendo coinvolta nell'eziologia e nella patogenesi di diversi disturbi nervosi quali l'epilessia, la demenza e altri disordini neurodegenerativi (Vazquez *et al.*, 2008; Errico *et al.*, 2009). L'ippocampo, componente centrale del sistema limbico, è stato messo in relazione alla memoria, alle emozioni e al comportamento sociale ed è stato dimostrato come una sua alterazione porti alla manifestazione di diversi quadri clinici caratterizzati per esempio da perdita di memoria, depressione o schizofrenia (Lathe, 2001; Morgane *et al.*, 2002; Paizanis *et al.*, 2007; Kinney *et al.*, 2007; Georgieff, 2008; Li *et al.*, 2009). Inoltre va ricordato come l'ippocampo sia stato storicamente correlato anche alla percezione delle sensazioni olfattorie per la vicinanza e per le connessioni con le componenti del sistema olfattivo (FitzGerald, 1992b; Haberly, 2001).

Lo studio della formazione ippocampale in un mammifero marino anosmatico come il tursiope (*T. truncatus*) può portare un contributo all'approfondimento delle conoscenze di questa struttura encefalica e delle sue funzioni. Infatti i Cetacei presentano una formazione ippocampale strutturalmente meno complessa, probabilmente non legata alle funzioni olfattorie che ricopre in altre specie terrestri. Questi animali quindi risultano di notevole interesse per lo studio della neuroanatomia e della neurochimica di questa parte del Sistema Nervoso Centrale.

Diversi studi hanno analizzato nel dettaglio citoarchitettonico e neurochimico la neocorteccia dei Cetacei, in particolare la corteccia visiva ed acustica (Glezer *et al.*, 1998; Hof *et al.*, 2000; Furutani, 2008; Butti *et al.* 2011). Minor attenzione è stata invece dedicata alla citoarchitettura dell'allocorteccia e dell'ippocampo dei Cetacei (Jacobs *et al.*, 1979; Morgane e Jacobs, 1986), mentre, per quanto riguarda l'indagine neurochimica della formazione ippocampale, sono presenti solo alcuni dati preliminari (Glezer *et al.*, 1995).

In questo lavoro di tesi, basandomi sulle osservazioni e sulle descrizioni citoarchitettoniche delle diverse componenti della formazione ippocampale di tursiope presenti nei lavori di Jacobs, Morgane e McFarland (1979 e 1986), ho analizzato delle sezioni di tessuto cerebrale contenenti la formazione ippocampale (ROI, Region Of

Interest) ottenute da alcuni encefali di tursiope (*T. truncatus*) disponibili nella Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini dell'Università di Padova, riconoscendo la citoarchitettura tissutale di questa regione descritta in letteratura.

Il protocollo di conservazione e ottenimento dei campioni (paragrafi 2.1 e 2.2) da me utilizzato è diverso da quello degli studi citati in bibliografia, in particolare per quanto riguarda il passaggio dal campione in formalina al campione congelato. Inoltre, a differenza di quanto descritto in letteratura in cui i campioni sono stati ottenuti da soggetti perfusi (pratica diffusa e utilizzata negli anni in cui sono stati svolti i lavori citati, ma oggi eticamente inaccettabile e proibita), i miei campioni di encefalo sono stati ottenuti in sede necroscopica. In conseguenza a questo fatto, il tessuto cerebrale dei miei preparati potrebbe risentire dei più o meno lunghi tempi post-mortali fino al momento della necroscopia vera e propria.

Questo mio lavoro di indagine citoarchitettonica ha permesso di affermare che, nonostante le differenze procedurali nei protocolli di ottenimento, conservazione e allestimento dei campioni, i caratteri citoarchitettonici tipici dell'allocorteccia di tursiope (*Tursiops truncatus*) vengono sostanzialmente mantenuti, nonostante siano emerse anche alcune differenze tra quanto da me osservato e quanto riportato in letteratura. Per quanto riguarda l'analisi delle sezioni di ippocampo nei soggetti giovani di tursiope (nel nostro caso di neonati di 6 e 9 giorni) è stato possibile descrivere uno strato molecolare caratterizzato da una densità cellulare elevata diffusa lungo tutta la formazione ippocampale senza chiare distinzioni in ulteriori strati. I dati raccolti in questa sede risultano in assoluto i primi presenti per soggetti neonati appartenenti alla specie *Tursiops truncatus*.

Oltre all'osservazione e descrizione della citoarchitettura, la colorazione di Nissl con Tionina ha permesso anche un'analisi dettagliata della morfologia cellulare presente nella formazione ippocampale. Un dato di particolare interesse ottenuto durante l'osservazione delle sezioni di ippocampo di tursiope è stato il riconoscimento di neuroni di von Economo (VENs) in diverse aree della regione ippocampale. Questa particolare tipologia di neuroni ha dimensioni maggiori di quelli piramidali, sono fusiformi e bipolari. Si ritiene che essi siano coinvolti nel comportamento sociale, nell'integrazione delle emozioni, nelle funzioni cognitive e nella regolazione delle funzioni autonome (Hof *et al.*, 2000; Allman *et al.*, 2011). Questo tipo di neurone era stato inizialmente individuato solo in

alcuni Primati (nell'uomo e in alcune scimmie antropomorfe) e negli elefanti. Studi sui Cetacei hanno identificato le cellule di Von Economo nel V strato della corteccia cingolata anteriore, della corteccia anteriore, frontoinsulare e frontopolare di diverse specie. Indagini condotte nel laboratorio di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università di Padova hanno evidenziato successivamente la presenza di questi neuroni anche negli artiodattili domestici (*Bos taurus*).

Essendo i VENs di grandi dimensioni e presenti solo in animali con massa cerebrale notevole e comportamenti sociali complessi si suppone che essi abbiano il compito di trasmettere informazioni rilevanti in modo rapido e a lunga distanza (Hof *et al.*, 2000; Allman *et al.*, 2011).

In questo mio lavoro di tesi i neuroni di Von Economo sono stati descritti per la prima volta anche nella formazione ippocampale di tursiope (*T. truncatus*) suggerendo delle possibili connessioni a lunga distanza tra la formazione ippocampale e altre parti del Sistema Nervoso Centrale.

Accanto all'indagine citoarchitettonica ho svolto uno studio finalizzato a caratterizzare la distribuzione delle principali proteine leganti il calcio (parvalbumina (PV), calbindina (CB) e calretinina (CR)) all'interno della formazione ippocampale in modo da definire anche dal punto di vista neurochimico i neuroni presenti.

Diversi studi hanno descritto nel dettaglio la distribuzione di queste proteine nel Sistema Nervoso Centrale nel ratto, nel topo e in alcune parti dell'encefalo dei Primati (Glezer *et al.*, 1998; Tohyama e Takatsuji, 1998; Hof *et al.*, 2000). Per quanto riguarda i Cetacei, molti studi pubblicati a questo proposito riguardano la corteccia visiva e acustica (Glezer *et al.*, 1998), mentre la formazione ippocampale, come già accennato in precedenza, è stata oggetto di un solo lavoro preliminare (Glezer *et al.*, 1995). Secondo questo studio comparativo tra Cetacei (Odontoceti e Mysticeti) e mammiferi terrestri (Primati, Carnivori, Monotremi, Marsupiali e Chiroteri), la formazione ippocampale del tursiope (*Tursiops truncatus*) assomiglia per citoarchitettura e per aspetti di neurochimica a quella dei mammiferi terrestri appartenenti agli ordini dei Monotremi, dei Chiroteri e dei Marsupiali, tra i più primitivi dal punto di vista evolutivo. Nello stesso studio, nel tursiope e nei Cetacei in generale, le cellule nervose della formazione ippocampale risultano soprattutto calretinina-reattive, mentre i neuroni calbindina-positivi sono rari e quelli

parvalbumina-reattivi assenti. Nella formazione ippocampale della maggior parte dei mammiferi terrestri sono presenti tutte e tre le proteine leganti il calcio con netta prevalenza della parvalbumina. Queste sostanziali differenze nelle componenti dell'archicorteccia tra mammiferi terrestri e mammiferi acquatici possono riflettere i mutamenti evolutivi che hanno caratterizzato questi due gruppi di animali. Le stesse differenze sono state descritte nella corteccia acustica e visiva in altri studi dello stesso autore (Glezer *et al.*, 1998).

Le mie analisi sulle sezioni di ippocampo di tursiope (*T. truncatus*) marcate con i diversi anticorpi contro le proteine leganti il calcio hanno dato risultati in alcuni casi contrastanti con i dati riportati in letteratura (Figura 30). In particolare risulta evidente la presenza di neuroni parvalbumina-reattivi in alcuni settori dell'ippocampo ed un marcaggio per calbindina e calretinina limitato a singole cellule lungo tutta la formazione ippocampale. Queste cellule calbindina-reattive o calretinina-reattive sono interneuroni con morfologia varia (bipolari, a canestro, a doppio bouquet) e più raramente neuroni piramidali. Per completezza ho voluto applicare le tecniche di immunoistochimica per l'indagine sulla presenza e distribuzione delle proteine leganti il calcio anche sui preparati di ippocampo dei soggetti giovani. La reattività a tutti e tre gli anticorpi utilizzati è stata descritta ma viste le dimensioni ridotte delle strutture indagate e la conseguente difficoltà ad individuare con certezza i diversi settori non è stato possibile indicare la distribuzione delle tre proteine leganti il calcio.

Le differenze che emergono nella distribuzione dei diversi anticorpi nei neuroni della formazione ippocampale tra i miei marcaggi e quanto riportato in letteratura possono essere spiegate considerando diversi fattori. Innanzitutto la numerosità del mio campione potrebbe influire sul valore statistico dei dati raccolti, essendo inferiore di alcune unità rispetto a quanto presentato in letteratura. Un fattore più importante potrebbe essere la diversa procedura nell'ottenimento delle sezioni di tessuto nervoso e nel diverso protocollo immunoistochimico per il marcaggio. Infine è da notare come nel mio lavoro siano stati analizzati preparati provenienti da tursiopi molto più vecchi (circa trent'anni) rispetto a quelli considerati in letteratura (giovani adulti di circa quindici anni), aggiungendo un possibile fattore individuale che può influire sui dati rilevati.

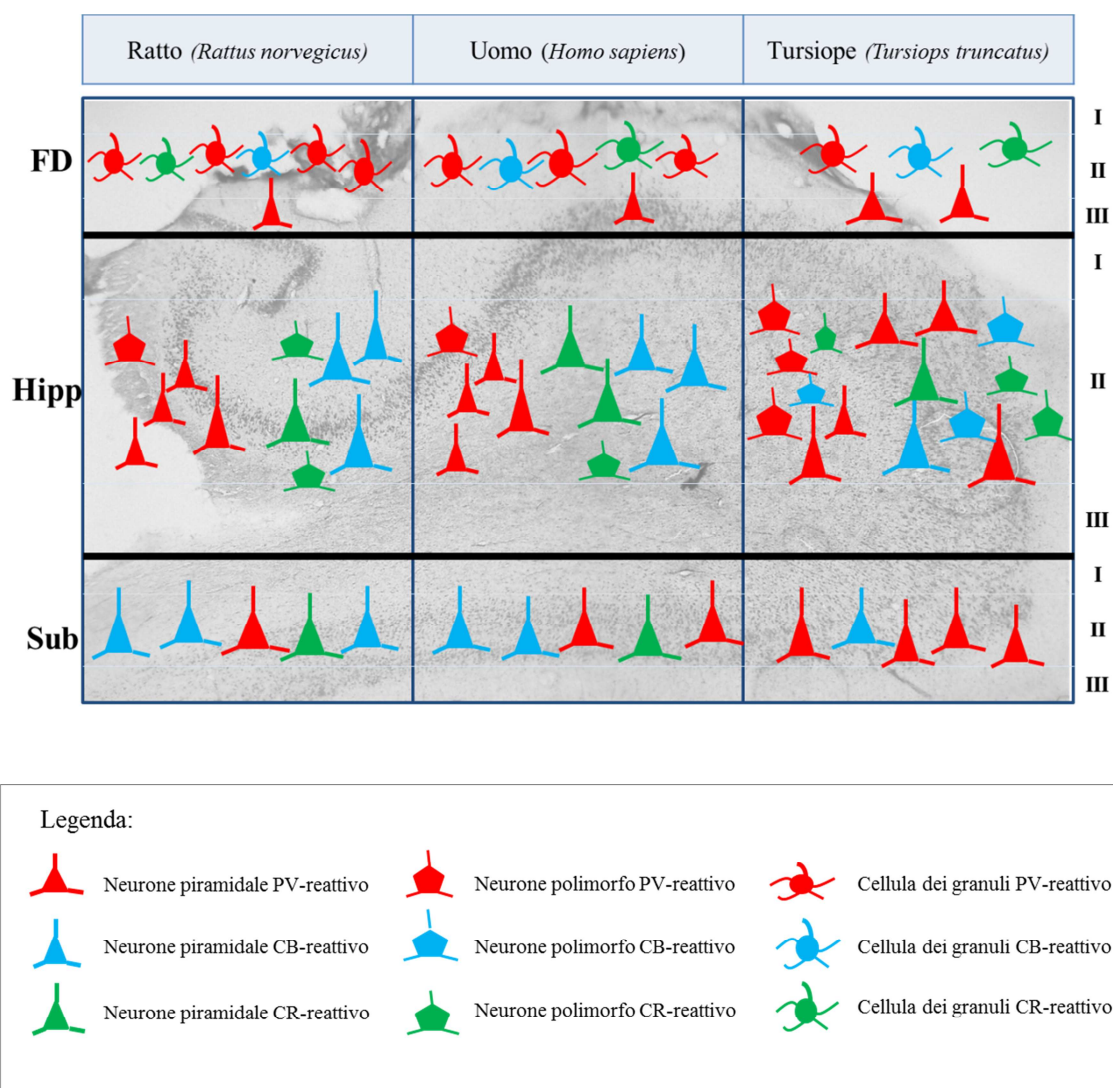


Figura 30: Schema riassuntivo della distribuzione dei diversi neuroni immunoreattivi agli anticorpi contro le proteine leganti il calcio (parvalbumina (PV) in rosso, calbindina (CB) in azzurro e calretinina (CR) in verde) nella formazione ippocampale di ratto (*Rattus norvegicus*), uomo (*Homo sapiens*) e tursiope (*Tursiops truncatus*). Si nota che nella fascia dentata (FD) di ratto e uomo i neuroni PV-reattivi sono prevalenti, mentre nel tursiope la reattività è debole per tutte e tre le proteine; nell'ippocampo (Hipp) la prevalente reattività alla parvalbumina è comune a tutte e tre le specie nei primi settori ma continua ad essere presente nei settori successivi solo nel tursiope, mentre in ratto e uomo i neuroni di queste aree sono prevalentemente CB-reattivi e CR-reattivi; nel subiculum (Sub) permane la prevalenza della reattività alla parvalbumina nel tursiope.

Un ultimo aspetto sviluppato con il mio lavoro di tesi riguarda la distribuzione degli astrociti nella formazione ippocampale di tursiope (*T. truncatus*). Il marcaggio con l'anticorpo contro la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) permette di caratterizzare la distribuzione degli astrociti. Gli astrociti sono cellule della glia caratterizzate da numerosi processi radiali, dall'abbondante presenza di filamenti intermedi e dalla presenza di granuli di glicogeno per il fabbisogno energetico. Le funzioni di queste cellule sono dare sostegno meccanico e trofico ai neuroni, costituire una barriera protettiva e selettiva nei confronti delle molecole e degli ioni che possono avere accesso nelle cellule neuronali e modulare la trasmissione dei segnali nervosi. E' stato recentemente ipotizzato anche un loro ruolo attivo nella stimolazione elettrica dei neuroni, nel meccanismo della neuroprotezione e nella neurogenesi (FitzGerald, 1992; Bonfanti, 2009). L'analisi del marcaggio con anticorpo anti-GFAP sui miei preparati ha portato a conclusioni analoghe a quanto già riportato per altre specie animali riguardo alla distribuzione e alla funzione degli astrociti.

In conclusione i dati da me raccolti sulla formazione ippocampale di tursiope (*Tursiops truncatus*) hanno integrato e approfondito le descrizioni già presenti in letteratura grazie all'utilizzo di tecniche istologiche e immunoistochimiche più recenti e a strumentazioni scientifiche di nuova generazione. Le mie osservazioni sulla citoarchitettura vanno ad aumentare il dettaglio delle conoscenze dell'allocorteccia di tursiope e vengono integrate con dati riguardanti la popolazione della neuroglia mai indagata precedentemente in questa specie. Inoltre per la prima volta i dati riguardano anche soggetti neonati che risultano interessanti sia per un confronto puramente citoarchitettonico con l'adulto sia per una ricerca sulle caratteristiche funzionali della formazione ippocampale nel neonato (in particolare la neurogenesi che è stato dimostrato continuare dopo la nascita in molte specie animali e correlata principalmente -ma non esclusivamente (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Bonfanti e Ponti, 2008)- al ciclo fisiologico dei neuroni olfattori e che risulterebbe di elevato interesse se rilevata in animali anosmatici come i tursiopi). Per la prima volta in assoluto ho identificato neuroni di von Economo nella formazione ippocampale che, insieme ai dati sulla distribuzione delle proteine leganti il calcio che aumentano le scarse informazioni presenti a riguardo, suggeriscono nuove ipotesi sulle funzioni e connessioni della formazione ippocampale stessa.

Infine con questo mio lavoro di tesi ho potuto testare l'efficacia dei protocolli di ottenimento e conservazione dei campioni (in particolare di tessuti delicati com'è quello cerebrale) che vengono utilizzati presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università di Padova confermando inoltre l'utilità della presenza della Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini quale ottimale risorsa per la ricerca su specie animali come i Cetacei difficili da studiare per la rarità e per le normative di protezione e salvaguardia che li riguardano, ma sicuramente interessanti per le diversità anatomiche, fisiologiche e comportamentali che li caratterizzano.

Questo mio lavoro di ricerca può quindi porsi come punto di partenza per analisi comparative con altre specie animali delle strutture dell'allocorteccia al fine di aumentare i dati presenti su quella che è la parte filogeneticamente più antica del Sistema Nervoso Centrale. D'altra parte notevole interesse ha già suscitato il ritrovamento di neuroni di von Economo in queste regioni dell'encefalo riaprendo il dibattito sulle loro funzioni e peculiarità presunte e dando spunto a futuri scenari per la ricerca.

5. BIBLIOGRAFIA

Allman JM, Tetreault NA, Hakeem AY, Manaye KF, Semendeferi K, Erwin JM, Park S, Goubert V, Hof PR (2011) The von Economo neurons in the fronto-insular and anterior cingulate cortex. *Ann NY Acad Sci* 1225: 59-71.

Alvarez-Buylla, A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2: 287-293.

Bagnoli P, Cozzi B, Zaffora A, Acocella F, Fumero R, Costantino ML (2011) Experimental and computational biomechanical characterisation of the tracheo-bronchial tree of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during diving. *J Biomech* 44: 1040-1045.

Bonfanti L, Ponti G (2008) Adult mammalian neurogenesis and the New Zealand white rabbit. *Vet J* 175: 310-331.

Bonfanti L (2009) *Le cellule invisibili. Il mistero delle staminali del cervello*. Torino, Bollati Boringhieri, pp. 1-275.

Bibliografia

Butti C, Raghanti MA, Sherwood CC, Hof PR (2011) The neocortex of Cetaceans: cytoarchitecture and comparison with other aquatic and terrestrial species. *Ann NY Acad Sci* 1225: 47-58.

Cozzi B (2005) *Mammiferi marini del Mediterraneo. Storia naturale, biologia, anatomia, patologia, parassitologia*. A cura di B Cozzi, The Coffee house art & adv. Milano, Italia.

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 Anat Rec* 293: 235-242.

Errico F, Napolitano F, Nisticò R, Centonze D, Usiello A (2009) D-aspartate: an atypical amino acid with neuromodulatory activity in Mammals. *Rev Neurosci* 20: 429-440.

FitzGerald MJT (1992a) Neurons and neuroglia. In: *Neuroanatomy, basic and clinical-2nd edition* (MJT FitzGerald ed). Bailliere Tindall, London, pp. 41-49.

FitzGerald MJT (1992b) Olfactory and limbic system. In: *Neuroanatomy, basic and clinical-2nd edition* (MJT FitzGerald ed). Bailliere Tindall, London, pp. 219-229.

Bibliografia

Fordyce RE (2008) Cetacean evolution. In: Encyclopedia of marine mammals-2nd edition (WF Perrin, B Wursig, JGM Thewissen, eds). Academic Press, New York, USA, pp. 201-207.

Forey PL, Humphries CJ, Kitching IJ, Scotland RW, Siebert DJ, Williams DM (1993) Cladistics: a practical course in systematics. Clarendon Press, Oxford, pp. 1-208.

Furutani R (2008) Laminar and cytoarchitectonic features of the cerebral cortex in the Risso's dolphin (*Grampus griseus*), striped dolphin (*Stenella caeruleoalba*) and bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Anat* 213: 241-248.

Georgieff MK (2008) The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. *Biochem Soc Trans* 36: 1267-1271.

Glezer II, Morgane PJ, Jacobs MS (1988) Implications of the 'initial brain' concept for the brain evolution in Cetaceans. *Behav Brain Sci* 11: 75-116.

Bibliografia

Glezer II, Hof PR, Ackerman AI, Tsai F, Morgane PJ. Immunocytochemistry and cytoarchitectonics of the hippocampal formation in whales: comparative analyses. Program No. 176.7 Neuroscience 1995 Abstracts. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 1995. Online.

Glezer II, Hof PR, Morgane PJ (1998) Comparative analysis of calcium-binding protein-immunoreactive neuronal populations in the auditory and visual systems of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the macaque monkey (*Macaca fascicularis*). *J Chem Neuro* 15: 203-237.

Haberly LB (2001) Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem Senses* 26: 551-576.

Hof PR, Glezer II, Nimchinsky EA, Erwin JM (2000) Neurochemical and cellular specializations in the mammalian neocortex reflect phylogenetic relationships: evidence from Primates, Cetaceans, and Artiodactyls. *Brain Behav Evol* 55: 300-310.

Insausti R, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: *The human nervous system-2nd edition* (G Paxinos, JK Mai, eds). Elsevier Academic Press, London, pp. 871-914.

Bibliografia

Jacobs MS, Morgane PJ, McFarland WL (1979) The anatomy of the brain of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Rhinic lobe (Rhiencephalon): the archicortex". Brain Research Bulletin 4: 1-108.

Jefferson TA, Webber MA, Pitman RL (2008) Marine mammals of the world: a comprehensive guide to their identification. Elsevier-Academic Press, Amsterdam, pp. 1-592.

Kern A, Siebert U, Cozzi B, Hof PR, Oelschläger HHA (2011) Stereology of the neocortex in Odontocetes: qualitative, quantitative, and functional implications. Brain Behav Evol 77: 79-90.

Kinney HC, Armstrong DL, Chadwick AE, Crandall LA, Hilbert C, Belliveau RA, Kupsky WJ, Krous HF (2007) Sudden death in toddlers associated with developmental abnormalities of the hippocampus: a report of five cases. Pediatr Dev Pathol 10: 208-223.

Lathe R (2001) Hormones and the hippocampus. J Endocrinol 169: 205-231.

LeDuc RG, Perrin WF, Dizon AE (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome b sequences. Mar Mamm Sci 15: 619-648.

Bibliografia

Li Y, Mu Y, Gage FH (2009) Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Curr Top Dev Biol* 87: 149-174.

Lowe J (1996) Techniques in neuropathology. In: Theory and practice of histological techniques-4th edition (JD Bancroft, A Stevens, DR Turner, eds). Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 341-381.

Marino L (1998) A comparison of encephalization between Odontocete Cetaceans and Anthropoid Primates. *Brain Behav Evol* 51: 230-238.

Marino L, Mcshea DW, Uhen MD (2004) Origin and evolution of large brains in toothed whales. *The Anat Rec* 281: 1247-1255.

McFarland WL, Morgane PJ, Jacobs MS (1969) Ventricular system of the brain of the dolphin, *Tursiops truncatus*, with comparative anatomical observations and relations to brain spacializations. *J Comp Neur* 135: 275-368.

Miller GS (1923) The telescoping of the Cetacean skull. *Smithson Misc Collect* 76: 1-71.

Bibliografia

Morgane PJ, McFarland WL, Jacobs MS (1982) The limbic lobe of dolphin brain: a quantitative cytoarchitectonic study. *J Hirnforsch* 23: 465-552.

Morgane PJ, Jacobs MS (1986) A morphometric Golgi and cytoarchitectonic study of hippocampal formation of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *The Hippocampus* 3: 369-432.

Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 471-483.

Oelschläger HHA, Kemp B (1998) Ontogenesis of the sperm whale brain. *J Comp Neurol* 399: 210-228.

Oelschläger HHA (2008) The dolphin brain-a challenge for synthetic neurobiology. *Brain Res Bull* 75: 450-459.

Oelschläger HHA, Oelschläger JS (2008) Brain. In: *Encyclopedia of marine mammals-2nd edition* (Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM, eds). Academic Press, New York, USA, pp. 134-149.

Bibliografia

O'Leary MA (2001) The phylogenetic position of Cetaceans: further combined data analyses, comparisons with the stratigraphic record and a discussion of character optimization. *Amer Zool* 41: 487-506.

Paizanis E, Kelai S, Renoir T, Hamon M, Lanfumey L (2007) Life-long hippocampal neurogenesis: environmental, pharmacological and neurochemical modulations. *Neurochem Res* 32: 1762–1771.

Rauschmann MA, Huggenberger S, Kossatz LS, Oelschläger HHA (2006) Head morphology in perinatal dolphin: a window into phylogeny and ontogeny. *J Morphol* 267: 1295-1315.

Revishchin AV, Garey LJ (1991) Laminar distribution of cytochrome oxidase staining in Cetacean isocortex. *Brain Behav Evol* 37: 355-367.

Rommel SA, Pabst DA, Mclellan WA (2008) Skull Anatomy. In: *Encyclopedia of marine mammals-2nd edition* (WF Perrin, B Wursig, JGM Thewissen, eds). Academic Press, New York, USA, pp. 1033-1047.

Bibliografia

Rice DW (2008) Classification overall. In: Encyclopedia of marine mammals-2nd edition (WF Perrin, B Wursig, JGM Thewissen eds). Academic Press, New York, USA, pp. 234-238.

Sassu R, Cozzi B (2007) The external and middle ear of the striped dolphin *Stenella caeruleoalba* (Meyen 1833). *Anat Histol Embryol* 36: 197-201.

Soldevilla MS, McKenna MF, Wiggins SM, Shadwick RE, Cranford TW, Hildebrand JA (2005) Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) head tissues: physical properties and CT imaging. *J Exp Biol* 208: 2319-2332.

Thewissen JGM, Williams EM, Roe LJ, Hussain ST (2001) Skeletons of terrestrial Cetaceans and the relationships of whales to Artiodactyls. *Nature* 413: 277-281.

Thewissen JGM, Cooper LN, Clementz MT, Bajpai S, Tiwari BN (2007) Whales originated from aquatic Artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature* 450: 1190-1195.

Tohyama M, Takatsuji K (1998) Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. Oxford University Press, USA, pp. 1-356.

Bibliografia

Vazquez E, Mayolas N (2008) Developmental abnormalities of temporal lobe in children. *Semin Ultrasound CT MR* 29: 15-39.

Wells RS, Scott MD (2008) Common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. In: *Encyclopedia of marine mammals-2nd edition* (WF Perrin, B Wursig, JGM Thewissen, eds). Academic Press, New York, USA, pp. 249-255.

Zilles K (2004) Architecture of the human cerebral cortex-Regional and laminar organization. In: *The human nervous system-2nd edition* (G Paxinos, JK Mai, eds). Elsevier Academic Press, London, pp. 997-1055.