



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute**

**Dipartimento di Biomedicina Comparata e  
Alimentazione**

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

Le reti mirabili dei cetacei.  
Un approccio biodinamico alla struttura e alle  
funzioni.

**Relatore**

Prof. Bruno Cozzi

**Correlatore**

Dott. Marco Bonato

**Laureanda**

Ginevra Brocca

**Matricola n. 1026910**

ANNO ACCADEMICO 2015-2016



*Alla Ginevra di dieci anni fa...*



# INDICE

1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 <i>I Cetacei</i> .....	7
1.2 <i>Principali adattamenti evolutivi</i> .....	9
1.2.a <i>Aspetto esterno ed apparato scheletrico</i> .....	9
1.2.b <i>Termoregolazione ed osmoregolazione</i> .....	13
1.3 <i>Apparato respiratorio</i> .....	15
1.4 <i>Apparato cardiocircolatorio</i> .....	19
1.5 <i>Il problema della coagulazione</i> .....	28
1.6 <i>Storia delle reti mirabili</i> .....	28
1.6.a <i>Galeno</i> .....	28
1.6.b <i>Vesalio</i> .....	29
1.6.c <i>Slijper</i> .....	30
1.7 <i>Anatomia della rete mirabile</i> .....	32
1.8 <i>Vascolarizzazione dell'encefalo umano (dispositivo arterioso endocranico)</i> .....	33
1.9.a <i>Suidae</i> .....	38
1.9.b <i>Bovidae</i> .....	39
1.9.c <i>Delfinidae</i> .....	41
1.10 <i>Anatomia microscopica</i> .....	45
1.11 <i>Conclusioni</i> .....	46
2. SCOPO.....	51
3. MATERIALI E METODI.....	53
3.1 <i>Animali e organi campionati</i> .....	53
3.2 <i>Preparazione dei campioni: fissaggio, inclusione, taglio</i> .....	57
3.3 <i>Analisi Istologiche ed Immunoistochimiche</i> .....	58
3.3.a <i>Ematossilina-Eosina</i> .....	58
3.3.b <i>Immunoistochimica</i> .....	59
3.4 <i>Acquisizione immagini</i> .....	60
3.5 <i>Analisi delle immagini</i> .....	61
3.7 <i>Elaborazione del foglio di calcolo Excel</i> .....	65
3.7.a <i>Correlazione tra frequenza cardiaca e stroke volume</i> .....	65
3.7.b <i>Simulazione delle condizioni di superficie e d'immersione</i> .....	69
4. RISULTATI.....	75

4.1 <i>Analisi istologica: anatomia microscopica delle reti mirabili</i> .....	75
4.1.a <i>Sezioni cervicali e toraciche</i> .....	75
4.1.b <i>Sezioni lombari e della cauda equina</i> .....	78
4.2 <i>Analisi immunoistochimica</i> .....	79
4.3 <i>Volume della rete mirabile midollare</i> .....	80
4.4 <i>Distribuzione del sangue nel nuoto in superficie e in immersione</i> .....	81
5. DISCUSSIONE.....	87
5.1 <i>Le reti mirabili come riserva di sangue ossigenato</i> .....	88
5.2 <i>Altre funzioni delle reti mirabili</i> .....	91
5.2.a <i>Vantaggi anatomici</i> .....	92
5.2.c <i>Termoregolazione</i> .....	94
5.2.d <i>Buffer pressorio</i> .....	96
5.2.e <i>Tromboembolismo</i> .....	97
5.3 <i>Il problema della regolazione delle reti mirabili</i> .....	101
6. PROSPETTIVE FUTURE.....	107
7. ALLEGATI.....	109
7.1 <i>Drenaggio venoso di uomo e cetacei</i> .....	109
7.1.a <i>Dispositivo venoso endocranico nell'uomo</i> .....	109
7.1.b <i>Drenaggio venoso nei cetacei</i> .....	109
7.2 <i>Schede dettagliate per G. griseus, S. coeruleoalba e Z. cavirostris</i> .....	112
7.3 <i>Protocollo ematossilina-eosina</i> .....	115
7.4 <i>Protocollo immunoistochimica</i> .....	116
8. BIBLIOGRAFIA .....	117

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I Cetacei

L'animale comunemente noto come “delfino” è un mammifero marino conosciuto da sempre e rappresentato in molte culture.

Il suo stesso nome lo annovera fin da subito come un mammifero (dal greco *delphis*, utero), la cui filogenesi tuttavia lo ha portato ad assumere gli adattamenti anatomici tipici dei pesci.

Un mammifero che, in senso evolutivo, circa 55 milioni di anni fa è “tornato indietro”, riadattandosi all'ambiente acquatico primordiale, ma rimanendo filogeneticamente imparentato con i ruminanti terrestri.

Una delle principali spinte evolutive in tal senso pare essere stata l'abbondanza di cibo presente nei mari, come suggerito da Ponganis et al (2003).

Il Sottordine *Cetacea*, di cui questo animale fa parte, si articola in due Infraordini principali: i misticeti, la cui alimentazione si basa essenzialmente sulla filtrazione del plancton attraverso i fanoni, alloggiati nel rostro dalla forma arcuata, e gli odontoceti, i quali hanno mantenuto una dentatura ossea, che permette loro di cibarsi di pesci e cefalopodi.

La dentatura e la mandibola degli odontoceti svolgono inoltre un ruolo nel recepimento delle onde sonore utilizzate per l'ecolocazione.

Molte di queste specie sono presenti nel Mediterraneo ed i loro tessuti sono stati campionati e conservati dalla Banca Tessuti dell'Università di Padova.

Le specie principali e più frequenti sono raccolte in Tabella 1.

	FAMIGLIA	GENERE	SPECIE
Sottordine Mysticeti (1 Specie)			
	Balaenopteridae	Balaenoptera	<i>B. physalus</i>
Sottordine Odontoceti (7 Specie)			
	Delphinidae	Delphinus	<i>D. delphis</i>
		Globicephala	<i>G. melas</i>
		Grampus	<i>G. griseus</i>
		Stenella	<i>S. coeruleoalba</i>
		Tursiops	<i>T. truncatus</i>
	Physeteridae	Physeter	<i>P. microcephalus</i>
	Ziphiidae	Ziphius	<i>Z. cavirostris</i>

**Tabella 1** Specie presenti nei mari italiani, in grassetto le specie delle quali ci si è occupati in questa trattazione (rielaborato dal sito della Banca Tessuti dell'Università di Padova).

Tutte queste specie sono completamente acquatiche, ovvero nessuna fase della loro vita si svolge sulla terra ferma.

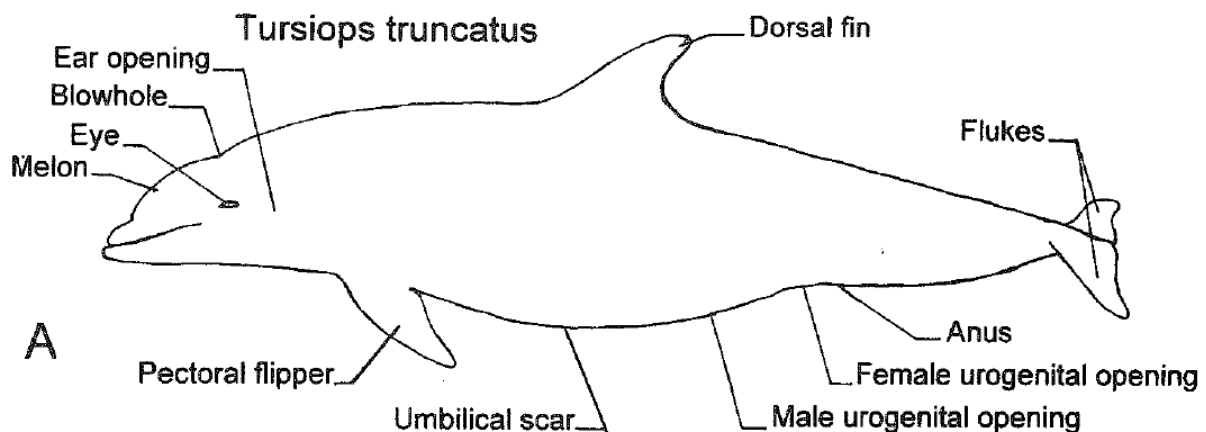
Ognuno di questi cetacei si discosta quindi dal normale canone dei mammiferi terrestri ed il loro percorso evolutivo li ha portati a cambiamenti sostanziali di morfologia e fisiologia.

Come essi siano riusciti ad adattarsi all'ambiente marino, da cui l'evoluzione li aveva così decisamente allontanati, è una domanda la cui risposta è ancora solo parziale, e che offre innumerevoli spunti per futuri campi di ricerca.

I cetacei hanno infatti dovuto mantenere molte delle caratteristiche tipiche dei mammiferi terrestri: in primis, la respirazione di aria atmosferica per l'ossigenazione del sangue, dato che essi non possono contare su un sistema di branchie come i pesci; le loro vie respiratorie si sono quindi dovute modificare enormemente, perdendo qualsiasi comunicazione col tratto digerente attraverso l'orofaringe, per via della migrazione delle narici a livello del dorso.

Queste ed altre modificazioni sostanziali verranno trattate più nel dettaglio nel prossimo paragrafo. Nello specifico, in questa trattazione si è scelto di indagare una struttura detta "rete mirabile" e di studiarne il ruolo nell'adattamento al mondo acquatico, indagandone i meccanismi regolatori e proponendoci di dimostrare un loro ruolo attivo nella regolazione pressoria e termica del circolo encefalico, anche attraverso l'indagine di analogie e differenze con le specie terrestri.





**Figura 1** Rappresentazione schematica di un tursiope (*Tursiops truncatus*) (Reynolds e Rommel, 1999).

## 1.2 Principali adattamenti evolutivi

I “parenti” terrestri più stretti dei cetacei sono gli ungulati terrestri, che come loro appartengono all’ordine *Cetartiodactyla*.

Tuttavia grazie alla forma molto affusolata, che garantisce loro una maggiore idrodinamicità (viene infatti ridotto l’attrito con l’acqua), il corpo dei cetacei risulta apparire molto simile a quello dei pesci.

Tale fenomeno prende il nome di convergenza evolutiva, ovvero specie filogeneticamente molto distanti (i pesci ed i cetacei) si sono adattate ad uno stesso ambiente adottando caratteristiche anatomiche similari.

Anche se nel corso di questo studio ci si è concentrati in particolare sulla specie *Tursiops truncatus*, la maggior parte delle modificazioni evolutive descritte sono in realtà comuni anche a tutti gli altri odontoceti (ed in parte anche a molti mysticeti).

Quelle più rilevanti per lo scopo di questa tesi vengono descritte nei prossimi sottoparagrafi.

### 1.2.a Aspetto esterno ed apparato scheletrico

A causa della maggior densità, un mezzo liquido oppone una resistenza al movimento di molto maggiore rispetto ad un mezzo gassoso.

Questo ha portato allo sviluppo nei cetacei di una forma fusiforme e dell’implemento della forza di propulsione attraverso l’evoluzione della pinna caudale (Reidenberg, 2007).

## **Le pinne**

I cetacei sono dotati di due pinne pettorali, le quali derivano da adattamenti dell'apparato scheletrico (in particolare degli arti toracici) e da una pinna dorsale ed una caudale.

Queste ultime due non hanno omologhi nel mondo terrestre e sono una caratteristica tipica dell'adattamento alla vita acquatica: esse infatti non hanno una base scheletrica, ma sono costituite da tessuto connettivo.

Le pinne pettorali, o *flipper*, altro non sono che gli arti anteriori e sono caratterizzate da un accorciamento estremo di omero, radio e ulna e da un sovrasviluppo, definito "iperfalgia" (falangi in sovrannumero) delle dita (Slijper, 1979).

A causa delle loro dimensioni esse non hanno un ruolo di propulsione del nuoto, ma servono invece a stabilizzarlo.

Anche la pinna dorsale garantisce stabilità al nuoto, ed essendo spesso ricoperta da tagli e cicatrici, spesso è un utile strumento per la fotoidentificazione degli animali.

La pinna caudale è il corrispettivo della coda dei mammiferi terrestri e non deriva, come invece si credeva un tempo, da una fusione degli arti posteriori (Slijper, 1979): questi ultimi infatti non sono presenti se non per dei residui vestigiali delle ossa pelviche, a causa di una regressione durante la fase embrionale, e non sono articolati con la colonna vertebrale, vista la completa assenza del sacro. La pinna caudale compie movimenti dall'alto verso il basso (contrariamente ai pesci) e permette all'animale di muoversi in avanti.

I *flukes* di cui essa è costituita, ovvero i due lobi di tessuto connettivo che si allungano orizzontalmente ai lati della coda, permettono di smuovere un maggior volume di acqua e garantiscono una maggiore propulsione.

## **L'apparato scheletrico**

Di tutte le modificazioni anatomiche subite dai cetacei durante il loro adattamento alla vita acquatica, quelle a carico dell'apparato scheletrico sono state le prime ad essere indagate ed analizzate più nel dettaglio.

Dato che ormai il loro ruolo principale non è più il sostegno del corpo, ma solo l'ancoraggio dei muscoli, le ossa di tutti i cetacei sono molto più leggere e spugnose di quelle dei mammiferi terrestri: l'intero scheletro rappresenta solamente il 17% del peso corporeo e circa metà della sua componente (51%) è costituita da tessuto adiposo (Slijper, 1979).

Il cranio ha subito una modificazione in senso telescopico, così da permettere l'alloggiamento del melone ed allo stesso tempo garantire una maggiore idrodinamicità, è inoltre caratteristica la sua asimmetria (lo sfiatatoio è infatti spostato verso sinistra, rispetto alla linea mediana).

Studi recenti (Macleod et al., 2007) suggeriscono che tale deviazione sia dovuta ad un posizionamento asimmetrico della laringe, così da permettere all'animale di inghiottire prede di maggiori dimensioni (gli odontoceti infatti non possono masticare).

In tutte le specie di odontoceti esiste inoltre un sistema molto esteso di seni accessori ripieni di aria, a livello della parte ventrale del teschio: la maggior parte della loro superficie interna è rivestita da voluminose masse di vene prive di valve, convolute ed intercomunicanti, separate dalle cavità solamente da una sottilissima parete traslucida (l'anatomia del drenaggio venoso, e quindi anche dei plessi, è riportata nel capitolo "Allegati").

Non avendo una parete di sostegno a struttura ossea, molti di questi seni accessori possono espandersi in base alla quantità di aria in essi contenuta.

Generalmente ai seni accessori si trovano associati anche dei cuscinetti adiposi e recenti studi suggeriscono un ruolo sinergico di queste tre strutture (plessi venosi, cavità ed adipe) come buffer per l'assorbimento ed il rilascio di azoto, essendo questo di natura lipofilica e quindi con la tendenza ad accumularsi nel tessuto adiposo.

Tuttavia in tempi recenti sono stati rinvenuti dei cetacei deceduti a causa della compresenza di emboli gassosi ed adiposi. (soprattutto zifidi).

La probabile area di origine di emboli di questo tipo è laddove gas e tessuto adiposo siano intimamente associati a dei vasi sanguigni, l'ipotesi più probabile pertanto è che in certi casi il sistema dei seni accessori e dei corpi adiposi possa non funzionare correttamente, tuttavia i diversi scenari devono ancora essere indagati (Costidis e Rommel, 2012).

La testa può compiere movimenti generalmente limitati rispetto al tronco (nel tursiope può formare al massimo un angolo di 45° in senso verticale e angoli minori in senso orizzontale) e questo è dovuto ad una certa rigidità del collo, per via della fusione di un numero variabile di vertebre (a seconda della specie) ed alla conseguente limitazione dei movimenti all'articolazione atlanto-occipitale (Slijper, 1979).

La rigidità della testa e del tronco aiutano a sfruttare al massimo la propulsione generata dalla coda, aumentando la stabilità del nuoto.

Anche il resto della colonna vertebrale mostra delle modificazioni: la parte lombare, sulla quale si inseriscono i potenti muscoli della coda, è molto più lunga di quella di un mammifero terrestre, inoltre le vertebre di tutta la colonna sono tra loro omologhe per forma e dimensione (Cozzi et al., 2009).

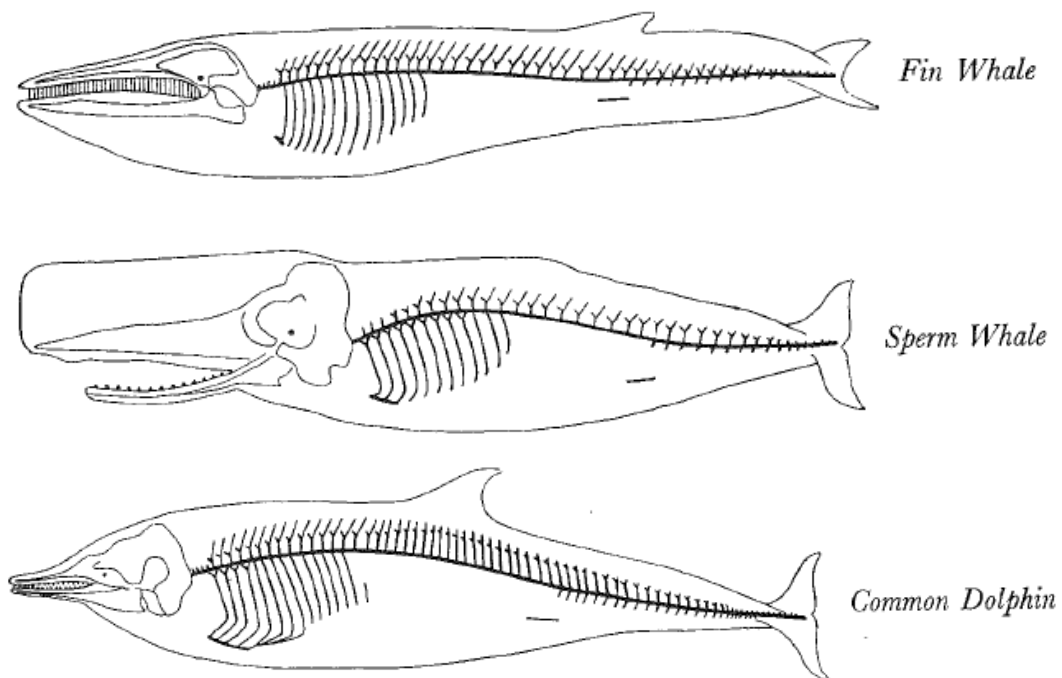
Risulta comunque possibile distinguere le vertebre caudali da quelle lombari, grazie al fatto che ogni vertebra caudale è associata alle ossa dell'arco emale o canale di Chevron, le quali servono a dare sostegno alla coda nella sua parte ventrale (Figura 2).



**Figura 2** Arco emale o canale di Chevron.

La cassa toracica invece è estremamente flessibile e possiede uno sterno di dimensioni ridotte, essa è formata da un numero variabile di coste, la maggior parte delle quali non articolate con lo sterno (false coste), le cui cartilagini non sono ossificate, come invece accade negli artiodattili terrestri (Slijper, 1979), così da facilitare il collasso dei polmoni durante l'immersione.

Quest'ultima caratteristica è particolarmente importante per evitare l'accumulo di azoto nel sangue, come verrà spiegato in seguito.



**Figura 3** Rappresentazione dello scheletro di una balenottera comune (*Balaenoptera physalus*), un capodoglio (*Physeter macrocephalus*) e un delfino comune (*Delphinus delphis*) (Slijper, 1979).

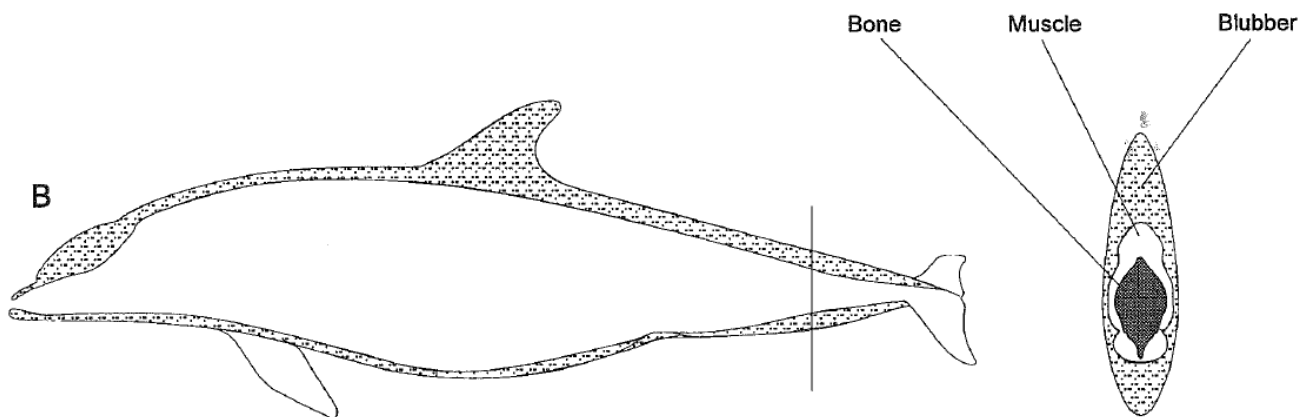
### 1.2.b Termoregolazione ed osmoregolazione

I cetacei sono gli unici omeotermi a trascorrere interamente la propria vita in mare aperto.

Un tale ambiente presenta notevoli difficoltà, dato che la conduttività di calore dell'acqua risulta essere 25 volte quella dell'aria atmosferica alla stessa temperatura (Schmidt-Nielsen, 1997) e che la sua temperatura può variare dai  $-2^{\circ}\text{C}$  fino ai  $+30^{\circ}\text{C}$  (Silva, 2004).

In tali condizioni di vita, si ritiene che la temperatura misurata a livello della cute dei cetacei sia la stessa del mezzo liquido nel quale essi sono immersi (Irvin e Hart, 1957), con una temperatura così bassa come possono quindi questi animali preservare il calore all'interno del proprio corpo?

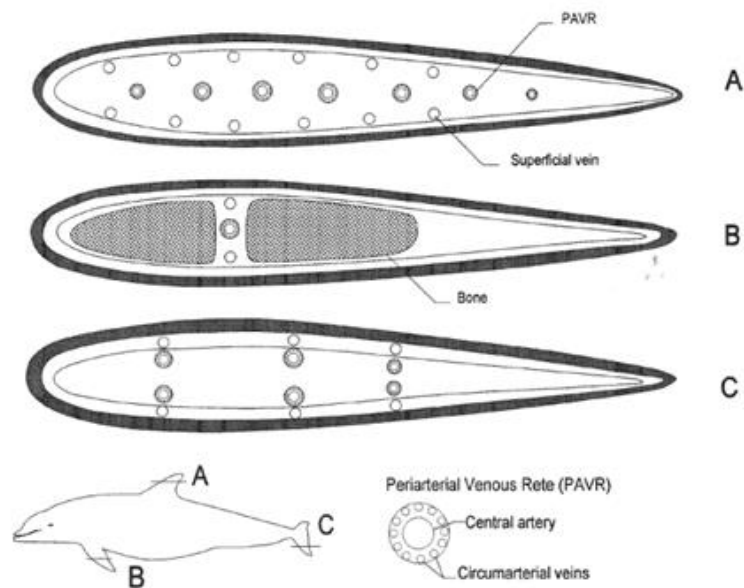
Il mezzo impiegato per ridurre la dispersione di calore verso l'ambiente esterno è un pannicolo adiposo posto a livello dell'ipoderma, che prende il nome di *blubber* (Figura 4), il quale riveste praticamente l'intera superficie corporea e funziona come un isolante (in alcuni odontoceti si assiste ad una variazione stagionale del suo spessore).



**Figura 4** Rappresentazione dello strato di blubber in un tursiope (*Tursiops truncatus*), in sezione longitudinale e trasversale (Reynolds e Rommel, 1999).

I cetacei sono in grado di conservare il calore corporeo anche attraverso strutture vascolari specializzate, localizzate a livello delle pinne pettorali, dorsali e dei *flukes*.

In ognuna di queste appendici si trovano delle arterie di grosso calibro poste al centro di una ramificazione di vasi venosi (Figura 5).



**Figura 5** Sezioni trasversali a livello di pinna dorsale (A), pinna pettorale (B) e pinna caudale (C) (Reynolds e Rommel, 1999).

Tali strutture prendono il nome di PAVR (*peri-arterial venous retia*) e funzionano come degli scambiatori controcorrente.

Tuttavia, in situazioni di alte temperature esterne o di un massivo sforzo fisico, può essere necessario per l'animale dover disperdere, e non più conservare, parte del proprio calore corporeo.

In questo caso il flusso attraverso queste reti venose viene bypassato, permettendo la dispersione del calore corporeo dalle appendici verso l'ambiente esterno (Meagher et al., 2002).

La salinità dell'acqua di mare rappresenta un ulteriore fattore al quale i cetacei hanno dovuto adattarsi, essi infatti devono mantenere un corretto equilibrio idro-salino, malgrado l'inevitabile ingestione di acqua di mare durante la fase di alimentazione (Reidenberg, 2007).

La particolare anatomia dei reni dei cetacei, i quali sono i principali responsabili del bilancio idrico, non trova omologhi tra i mammiferi terrestri se non forse nell'orso, in quanto essi sono formati da centinaia a migliaia di renculi per ogni rene a seconda della specie (Pfeiffer, 1997), i quali garantiscono una maggior superficie funzionale rispetto a quella di un mammifero terrestre con rene monolobato.

In questo modo i reni sono in grado di filtrare una quantità maggiore di plasma durante le intermittenti perfusioni che ricevono nelle fasi di immersione ed emersione (si veda più avanti) (Hedges et al., 1978), tuttavia i reni dei cetacei non sembrano possedere una maggiore capacità di concentrazione dell'urina rispetto a quelli dei mammiferi terrestri (Ortiz, 2001).

Una trattazione più dettagliata va riservata agli adattamenti subiti da apparato respiratorio e circolatorio.

### **1.3 Apparato respiratorio**

I mammiferi marini hanno dovuto sviluppare 2 caratteristiche essenziali: la capacità di trattenere a lungo il respiro e la resistenza alla pressione causata dalla colonna d'acqua sovrastante: 10 metri al di sotto del livello del mare infatti corrispondono alla pressione di 1 atmosfera, quindi un'immersione di 468 metri impone di resistere ad una pressione di 50 atmosfere (Reynolds e Rommel, 1999).

Tuttavia, tutto ciò non è così incredibile dato che la materia vivente è costituita principalmente d'acqua ed essa è incomprimibile.

Ciò che invece è facilmente comprimibile è l'aria presente nei polmoni, il cui volume, in immersione, tende a diminuire e la pressione ad aumentare, fino ad equilibrarsi con l'ambiente circostante, secondo la legge di Boyle:

$$p_1 * V_1 = p_2 * V_2$$

Questo vuol dire che, pur essendo il torace dei cetacei del 10% più flessibile rispetto a quello dei mammiferi terrestri, in mancanza di altri adattamenti esso rischia di collassare durante un'immersione a grandi profondità, comportando la rottura delle coste per via dell'eccessivo schiacciamento.

Minore quindi la quantità d'aria presente nei polmoni durante l'immersione, minore il rischio di superare la soglia critica: sarà quindi necessario, soprattutto per gli animali in grado di immergersi a profondità elevate, inspirare il volume d'aria minimo indispensabile.

Vediamo adesso nel dettaglio tutti gli adattamenti anatomici avvenuti.

Le narici si sono spostate sul dorso a formare lo sfiatatoio, il quale nei mysticeti rimane costituito da due aperture (che ricordano, appunto, le narici stesse), mentre negli odontoceti da una soltanto (Berta et al., 2014).

La sua apertura avviene per azione di muscoli ad azione volontaria (Bagnoli et al., 2011), quindi, contrariamente a quanto accade per i mammiferi terrestri, i cetacei decidono quando respirare.

La trachea è molto corta, essendo il collo stesso di lunghezza ridotta, e permette così di ridurre lo spazio morto anatomico, ma oltre ad essere corta essa è anche più larga del normale: in questo modo garantisce l'emissione ad una velocità maggiore di grandi volumi di aria, durante l'espiazione (Ponganis et al., 2003).

La caratteristica “ventilazione esplosiva” (Kooyman, 1973; Fahlman et al., 2015) permette al 70-90% del volume d’aria presente nei polmoni di essere scambiato in soli 0,3 secondi, differentemente che in un cavallo al galoppo, il quale ricambia solo il 27% del proprio volume polmonare in 0,5 secondi (Piscitelli et al., 2013).

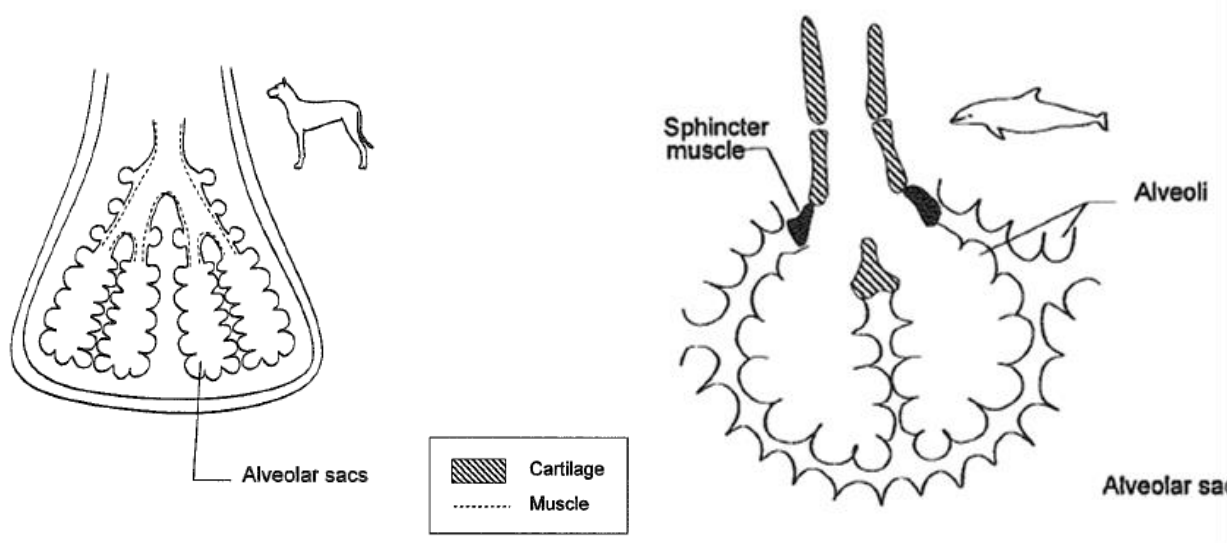
Gli odontoceti in particolare, e soprattutto il tursiope, mostrano le più estreme modificazioni rispetto a quelle di qualsiasi altro mammifero: oltre alla modificazione delle vie aeree superiori, di cui si è già parlato, si assiste alla mancanza dei bronchioli respiratori ed alla presenza di robusti sfinteri cartilaginei a livello bronchiale (Ponganis et al., 2003).

Tali sfinteri, di natura mioelastica, si trovano a livello della sottomucosa dei bronchioli aventi un diametro inferiore ai 2 mm e sono circondati da fibre elastiche bi-direzionali (Piscitelli, 2013) che agiscono in sinergia con le placche cartilaginee (le quali, come nei mammiferi terrestri, persistono lungo l’albero respiratorio fino a livello dei bronchioli).

Durante le immersioni, i polmoni vengono compressi sempre di più con l’aumentare della profondità, fino a raggiungere un punto critico di pressione, oltre il quale il parenchima polmonare collassa.

Tale punto critico è stato calcolato essere 70 metri (Ridgway e Howard, 1979), anche se alcuni studi suggeriscono che esso sia maggiore (Moore et al., 2011).

Una volta che il parenchima è collassato, gli sfinteri descritti nei bronchioli impediscono qualsiasi reflusso di aria all’interno degli alveoli, evitando il disciogliersi dell’azoto nel sangue a causa dell’alta pressione esterna.



**Figura 6** Confronto tra bronchioli ed alveoli di un cane (*Canis lupus familiaris*) e di un tursiope (*Tursiops truncatus*) (Reynolds e Rommel, 1999).



Gli stessi sfinteri sembrerebbero anche fungere da rinforzo per impedire il collasso del parenchima durante l'esplosiva fase espiratoria di cui si è parlato sopra (Reynolds e Rommel, 1999).

I polmoni poi sono spostati molto dorsalmente per favorire un galleggiamento stabile e la respirazione, e l'inserzione del diaframma ne è una diretta conseguenza: soprattutto nei mysticeti, il diaframma è molto più orizzontale rispetto ai mammiferi terrestri, così che la superficie di contatto con i polmoni risulta essere molto più ampia; in questo modo esso svolge un ruolo maggiore nella respirazione rispetto alle coste (Slijper, 1979).



**Figura 7** Sezione trasversale del torace di un cavallo (*Equus caballus*) e di una focena (*Phocoena phocoena*) a confronto (Slijper, 1979).

In base alla profondità d'immersione ed al loro tipo di respirazione, possiamo distinguere tre gruppi di cetacei.

Il primo gruppo include i *deep divers* quali capodoglio (*Physeter macrocephalus*) ed iperodonte (genere *Hyperoodon*), i quali sono capaci di immergersi fino a 90 e 120 minuti rispettivamente, con una media di 40-45 minuti.

Si pensa che a questo gruppo appartenga anche lo zifio (*Ziphius cavirostris*), essendo esso strettamente imparentato con l'iperodonte e capace di immergersi per 40-50 minuti a profondità superiori ai 400 metri.

Il secondo gruppo, avente caratteristiche intermedie tra il primo ed il terzo, include la balena franca (*Eubalaena australis*) e la balenottera azzurra (*Balaenoptera musculus*): questi animali restano immersi per circa 3-15 minuti, riuscendo comunque ad arrivare a 40-60 minuti secondo la specie, a profondità di 80-200 metri.

Anche la balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) rientra in questo gruppo, con i suoi 7 minuti d'immersione ed i 200 metri massimi di profondità raggiungibile.

Il terzo gruppo include delfini e focene, i quali non si immergono a grandi profondità e vengono quindi definiti *shallow divers*, categoria della quale ci si è principalmente occupati in questo lavoro.

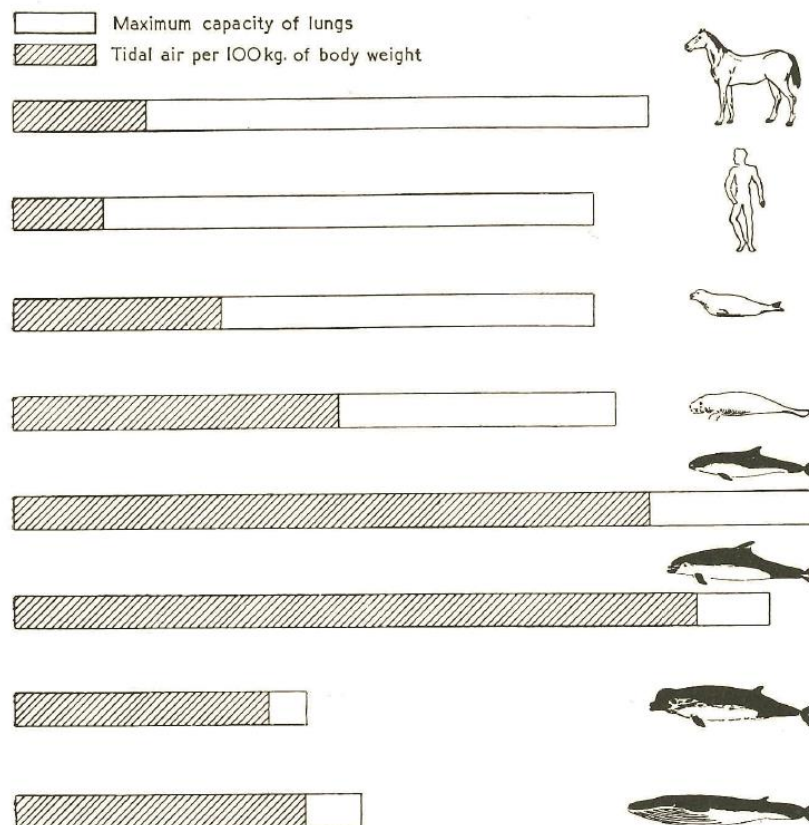
I delfinidi solitamente si immergono per 5-8 minuti a profondità generalmente di 20 metri, con picchi di 390 metri, per poi rimanere vicini alla superficie e respirare 2-6 volte/minuto per circa 8 minuti (Fahlman e Schagatay, 2014).

I primi due gruppi possiedono una bassa frequenza respiratoria (circa 6 atti/min, come un elefante), il che è coerente con la taglia corporea media di questi animali: la frequenza respiratoria infatti diminuisce all'aumentare del rapporto massa /superficie.

Il discorso cambia tuttavia per delfini e focene, i quali respirano molto meno di un mammifero terrestre avente la stessa mole.

Quale può essere la spiegazione?

In un tursiope il peso relativo dei polmoni è il 3-5% di quello corporeo (riportato essere il 2,7% da Piscitelli et al., 2013), mentre nei mammiferi terrestri è l'1-2%, inoltre il volume tidalico (cioè la capacità polmonare) è 1,5 volte quella dei mammiferi terrestri (Figura 8).



**Figura 8** Volume tidalico per 100 kg di peso corporeo in rapporto alla capacità massima polmonare in diverse specie (Slijper, 1979).

Sostanzialmente i cetacei in grado di immergersi a grandi profondità hanno polmoni più piccoli (poca aria o la pressione sviluppata sarà troppa), mentre quelli che restano più vicini alla superficie

ne possiedono di più grandi, dato che devono sopportare pressioni esterne inferiori e possono quindi permettersi di immagazzinare maggiori volumi di aria.

Un'ulteriore differenza è da ricercare nel fatto che i mammiferi terrestri respirano molto più superficialmente di quanto facciano i cetacei: l'essere umano utilizza solo la metà della propria capacità polmonare, mentre i Cetacei la sfruttano all'80-90%.

Questo implica che essi possano aumentare l'ossigenazione del sangue semplicemente aumentando la propria frequenza respiratoria e restando più tempo in superficie (mentre non possono aumentare la loro capacità polmonare, dato che essa è già sfruttata al massimo; Ponganis et al., 2003).

Inoltre gli alveoli altamente vascolarizzati permettono ai polmoni di assorbire circa il 90% dell'aria inspirata, mentre un mammifero terrestre come l'uomo ne assorbe solamente il 20%.

Si pone però il problema dell'accumulo di azoto nel sangue e delle sue pericolose conseguenze: con l'aumentare della pressione aumenta infatti la solubilità dell'azoto, e se a grandi profondità l'aria fosse ancora presente a livello alveolare, questo determinerebbe un aumento dell'azoto disciolto nel sangue.

Durante la risalita, con la diminuzione della pressione, l'azoto disciolto tornerebbe alla forma gassosa formando delle bolle all'interno del circolo sanguigno.

Per evitare tutto questo, grazie al collasso polmonare e agli sfinteri bronchiali l'aria viene confinata nelle parti superiori delle vie respiratorie (trachea e grossi bronchi), le quali non sono capaci di scambi gassosi.

Questi adattamenti dell'apparato respiratorio tuttavia sembrano non essere sufficienti, da soli, per spiegare le spiccate capacità apneistiche dei cetacei: il secondo apparato da considerare è quello cardiocircolatorio.

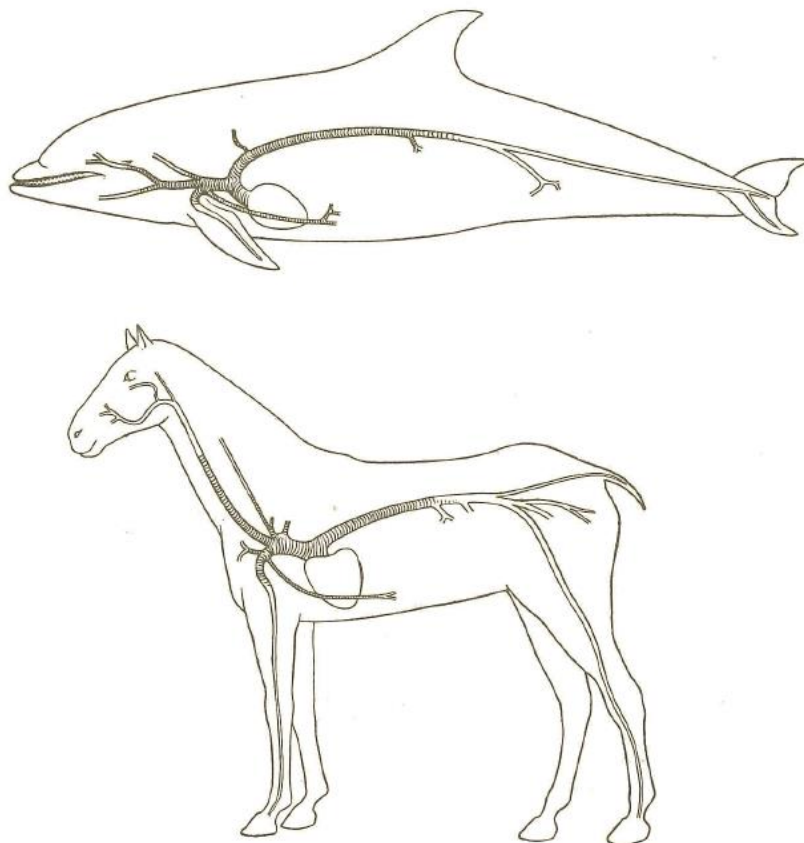
## **1.4 Apparato cardiocircolatorio**

In senso fisiologico, l'apparato cardiocircolatorio dei cetacei è identico a quello dei mammiferi terrestri.

Il sangue ricco di CO<sub>2</sub> raggiunge l'atrio destro attraverso la vena cava per poi venire pompato dal ventricolo destro verso la circolazione polmonare per mezzo dell'arteria polmonare, qui il sangue si ossigena e torna, per mezzo della vena polmonare, al cuore così che il ventricolo sinistro possa immetterlo nella circolazione sistemica.

In quale modo quindi il circolo sanguigno si è adattato alle lunghe immersioni e ai lunghi periodi di apnea volontaria?

Da un punto di vista strettamente anatomico il cuore e le grosse arterie non differiscono in maniera sostanziale da quelli dei mammiferi terrestri (Figura 9).

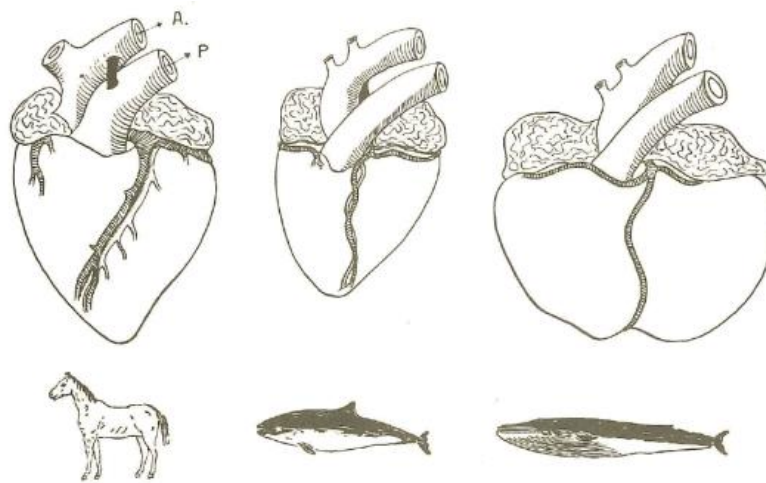


**Figura 9** Le principali arterie di un tursiope (*Tursiops truncatus*) e di un cavallo (*Equus caballus*); i vasi ombreggiati consistono principalmente di tessuto elastico (Slijper, 1979).

Gli studi dell'ultimo secolo non hanno rilevato modificazioni significative nell'output cardiaco dei cetacei; le dimensioni relative del cuore, pur apparendo enorme in certi mysticeti, sono in linea con i mammiferi terrestri: 0,93% nel tursiope, 0,6% nei delfinidi in generale e 0,7-0,8% nel capodoglio (nel cavallo è 0,8%, in roditori e bisonti 0,7%, in coniglio, gatto e vitello 0,5%).

Anche il volume di sangue circolante in rapporto al peso corporeo non risulta essere maggiore di quello dei mammiferi terrestri: 7,4% nel tursiope (ovvero 71 ml/kg; Ponganis, 2015), 5% nel ratto, 6,6% nel cavallo e 8% nella pecora.

Un indizio sulla forza di contrazione di un cuore può essere dato dalla sua forma: un cuore di forma più allungata e triangolare imprime una forza maggiore rispetto ad uno più largo, tuttavia quello dei cetacei è da riferirsi a questa seconda tipologia e la sua forma "poco performante" è dovuta alla conformazione del torace, che dispone di uno spazio ridotto per alloggiare gli organi più ventrali quali il cuore.



**Figura 10** Veduta dal lato sinistro dei cuori di cavallo (*Equus caballus*), focena (*Phocoena phocoena*) e balenottera comune (*Balaenoptera physalus*) (Slijper, 1979).

Si può quindi concludere che il cuore dei cetacei non ha subito modificazioni sostanziali nel corso dell'adattamento al mondo acquatico, così come non ha subito modificazioni l'anatomia microscopica dei grossi vasi.

Così come negli animali terrestri, le arterie principali che per prime ricevono la gittata cardiaca hanno una spessa parete costituita principalmente da fibre elastiche, così da evitare oscillazioni troppo brusche della pressione arteriosa, mentre le arterie di calibro medio e le arteriole hanno una parete prevalentemente muscolare, così da mantenere un certo grado di pressione nei distretti periferici.

Da uno studio comparato di cavallo e tursiopo, emerge come l'estensione dei tratti di tipo elastico sia la medesima.

Una differenza anatomica sostanziale esiste però nell'irrorazione encefalica di cetacei e mammiferi terrestri.

In questi ultimi, il sangue raggiunge l'encefalo per mezzo delle arterie carotidi interne, ma non è così nei cetacei, in cui esse sono obliterate o con un lume estremamente ridotto: sono quindi le arterie spinali meningeae a sopperire al circolo encefalico (McFarland et al., 1979).

I cetacei possiedono inoltre una caratteristica del tutto peculiare, ovvero l'estesa presenza di numerose reti vascolari (le cosiddette *retia mirabilia*) lungo tutto il corpo, nelle quali si vedono arterie e vene ramificarsi in piccoli vasi che per le loro caratteristiche anatomiche (ad esempio la parete relativamente spessa) non possono essere definiti semplici capillari.

Le reti mirabili, secondo la definizione di Ask-Upmark (1935) possono essere di tipo arterioso (rete mirabile arteriosa, oggetto di questa tesi), venoso (rete mirabile venosa) o misto (rete mirabile artero-venosa).

Malgrado queste reti siano presenti anche in diversi mammiferi terrestri, in particolare negli ungulati e in special modo nei ruminanti, nei cetacei esse sono talmente sviluppate da essersi guadagnate il nome, se tradotto alla lettera dal latino, di “reti stupefacenti”.

Le reti sono maggiormente sviluppate nella focena, ma anche il tursiope dispone di una rete toracica molto sviluppata, anche se non altrettanto spessa; nello zifio invece sono state trovate solo a livello cervicale e fino a metà del torace, mentre nel capodoglio si estendono fino alla zona lombare.

Esse si espandono maggiormente nella cassa toracica, in particolare ai due lati della colonna vertebrale e tra le coste, assumendo ad occhio nudo un'apparenza spugnosa, e si continuano sia verso la regione cervicale sia verso la regione lombare (in quest'ultima sede sono comunque meno sviluppate).

Da quest'ultima regione si prolungano poi fino al canale emale delle vertebre caudali per terminare appena prima delle pinne caudali (questo negli odontoceti).

La rete a livello cervicale, prolungamento della rete toracica, si continua intracranialmente dove, in tutti i cetacei, si raccorda con una rete baso-craniale particolarmente sviluppata posta in vicinanza dell'ipofisi (rete carotidea intracranica), da qui essa si estende lungo il nervo ottico e scorre assieme alle arterie per irrorare la maggior parte dell'encefalo.

Queste reti sembrano agire come degli ammortizzatori contro gli effetti dell'apporto intermittente di sangue all'encefalo, garantendo una pressione arteriosa di tipo non pulsatile (Ponganis et al., 2003).

Tutti i cetacei possiedono anche una rete attorno alla parte più esterna della scatola cranica, specialmente attorno all'articolazione della mandibola, alla bolla timpanica e al *foramen magnum*.

Reti più piccole possono essere presenti nella regione pelvica e negli organi sessuali, ma le reti arteriose di gran lunga più sviluppate sono quelle di testa, collo e torace (per una descrizione più completa dell'anatomia, si veda in seguito).

Prima di discutere del loro possibile ruolo, però, bisogna accennare anche alla presenza, nella sola regione addominale, di reti costituite esclusivamente da vasi venosi, senza nessuna componente arteriosa (anche queste sono più sviluppate nelle focene e meno negli altri odontoceti).

Sembra che tutto il sangue venoso proveniente dall'addome e dalla coda, prima di raggiungere la vena cava caudale e quindi il cuore destro, debba prima passare per questa rete, con l'eccezione del sangue venoso della vena porta.

Essa sembra essere collegata al drenaggio encefalico attraverso le vene spinali; essendo infatti le vene giugulari di calibro molto ridotto, in tutti i cetacei i vasi venosi principali sono le vene spinali, che oltre che dall'encefalo, ricevono il sangue anche dalle vene toraciche intercostali e sono connesse attraverso speciali vasi con la vena cava caudale a livello di ogni vertebra lombare.

Le vene spinali, alloggiare all'interno del canale vertebrale, mantengono sempre lo stesso diametro per tutta la loro lunghezza e non sono dotate di valve (a differenza di tutte le altre vene in qualsiasi mammifero) e queste due caratteristiche indicano che probabilmente, al loro interno, il sangue venoso possa scorrere in entrambe le direzioni, in base ai bisogni dell'organismo.

Dato che sfociano nella vena cava craniale a livello del torace e nella vena cava caudale a livello addominale, formano una connessione ausiliaria tra i due principali vasi venosi.

Anche le vene epatiche e la parte diaframmatica della vena cava caudale giocano un ruolo importante, essendo capaci di distendersi per accogliere più sangue, tuttavia essendo questa tematica non verrà trattata nel presente studio.

Tutto ciò che è possibile dare per certo è che le reti siano in grado di assorbire e rilasciare grandi quantità di sangue, in particolare le reti arteriose.

Le vene spinali permettono al sangue proveniente dall'encefalo di tornare sia al torace sia all'addome, così da evitare una congestione del delicato tessuto cerebrale in caso di impedimento del drenaggio a livello toracico, e allo stesso modo il sangue proveniente dall'addome può essere deviato verso il torace invece di essere immesso nella vena cava caudale.

Tutte questi accorgimenti servono ad affrontare possibili squilibri pressori tra torace ed addome e tra questi e l'encefalo.

Guardiamo ora gli adattamenti da un punto di vista puramente fisiologico.

Durante un prolungato arresto della respirazione, i tessuti dell'organismo vanno incontro ad un fenomeno detto ipossia, cioè mancanza di ossigeno ed accumulo di anidride carbonica ed altri metaboliti di scarto.

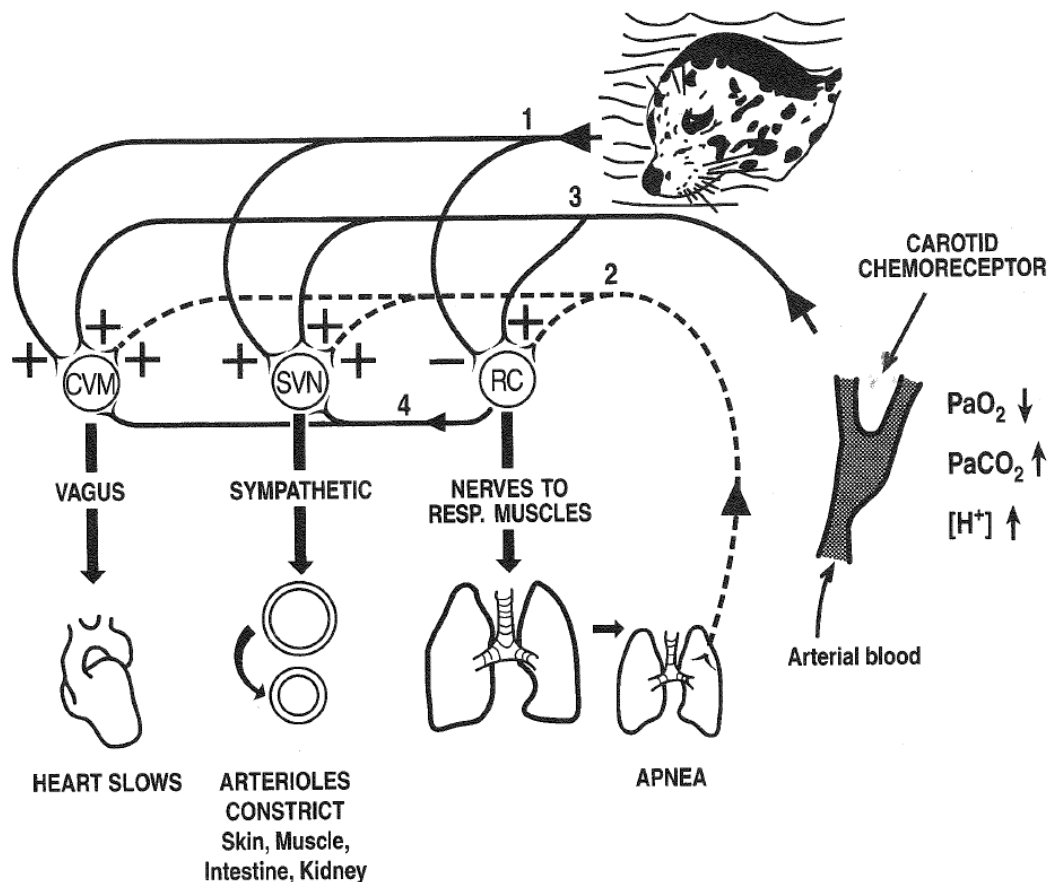
I neuroni dei centri respiratori del midollo allungato e del ponte sono sensibili alle variazioni chimiche dei gas disciolti nel sangue, ricevendo impulsi dai chemocettori periferici situati nei glomi aortici e carotidei.

Generalmente, almeno nei mammiferi terrestri, all'aumentare della CO<sub>2</sub> disciolta si assiste ad un aumento della frequenza e della profondità del respiro.

Ovviamente, in caso di apnea volontaria, questo non è possibile: i centri del respiro dei cetacei agiscono quindi in modo diverso, secondo il *Riflesso d'Immersione* (o *diving reflex*), infatti all'aumentare dei livelli di CO<sub>2</sub> si assiste a:

- rallentamento della frequenza cardiaca (Ponganis et al., 2003), mediato da un riflesso cardiaco parasimpatico dovuto a motoneuroni vagali (la bradicardia inizia poco prima che l'animale si immerga, la frequenza cardiaca torna ad aumentare poco prima che inizi la risalita verso la superficie);

- diminuzione della gittata cardiaca e costrizione dell'afflusso arterioso diretto alla pelle, ai muscoli, all'apparato digerente e ai reni, con conseguente mantenimento della pressione arteriosa a livello di tali strutture pur avendo una diminuzione dell'apporto sanguigno, il tutto mediato da motoneuroni simpatici (Elsner et al., 1966);
- spostamento di grandi volumi di sangue alle reti mirabili così da garantire un'adeguata ossigenazione degli organi vitali, ovvero encefalo, cuore e circolo bronchiale, che sono quelli più suscettibili alla mancata ossigenazione (è quanto si vuole indagare nella presente tesi) (Elsner, 1999).



**Figura 11** Controllo nervoso responsabile del riflesso d'immersione nella foca comune (*Phoca vitulina*) (Reynolds e Rommel, 1999).

Il riflesso d'immersione è presente in tutti i mammiferi (Fahlman e Schagatay, 2014), nell'uomo ad esempio la frequenza cardiaca passa da 70 bpm a riposo a 35 bpm quando in immersione, ma nei mammiferi marini questo riflesso è più marcato.

Infatti in un tursiopo, il cui peso può raggiungere i 650 kg, la frequenza cardiaca in superficie è di circa 110 bpm e scende a 25 o anche 10 bpm durante un'apnea di circa 4 minuti, quindi relativamente molto di più che in un uomo di 80 kg.



Il riflesso d'immersione, e nello specifico la bradicardia, diventa via via più efficiente con l'età dell'animale ed aumenta marcatamente dopo il raggiungimento dell'età adulta (Noren et al., 2004).

Ma come può, un animale che deve continuare a nuotare anche e soprattutto in stato di apnea, permettersi di ridurre l'ossigenazione alla propria muscolatura?

Per trovare una risposta bisogna considerare: volume ematico circolante, concentrazione emoglobinica, massa muscolare e concentrazione mioglobinica.

Di tutto l'ossigeno presente nell'organismo, l'80-90% è stoccato nel sangue e nei muscoli (Ponganis et al., 2003), e questo per via di certi particolari adattamenti.

Il tessuto muscolare dei cetacei presenta una concentrazione di mioglobina da 10 a 30 volte superiore (Noren e Williams, 2000) a quella dei mammiferi terrestri (2,7-3,2 g/100g di muscolo nel tursiope, Ponganis, 2015), e la sua concentrazione è maggiore a livello dei muscoli dorsali, in corrispondenza della coda, e nella porzione dei muscoli più a stretto contatto con le vertebre (Ponganis et al., 2003).

Inoltre, i muscoli aventi la maggior concentrazione di mioglobina sono anche quelli che subiscono il maggior grado di vasocostrizione (Ponganis, 2015).

Il sangue tuttavia nel tursiope non possiede una concentrazione di emoglobina superiore a quella dei mammiferi terrestri, con i suoi 14 g /100 ml, mentre è maggiore in altre specie (22 g/100 ml nel capodoglio; Ponganis et al., 2003); i globuli rossi però, possiedono una maggior superficie di contatto, permettendo uno sfruttamento ottimale delle catene peptidiche e dei gruppi eme.

<b>Bottlenose dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>)</b>	
Hb (g dl <sup>-1</sup> )	14
BV (ml Kg <sup>-1</sup> )	71
Muscle mass (%)	36
Mb (g 100 g <sup>-1</sup> )	2,7-3,2

**Tabella 2** Valori di riferimento nel tursiope (Ponganis, 2015).

Dato poi che cuore, organi splancnici e reni consumano il 40% dell'ossigeno totale disponibile, una vasocostrizione a livello dei secondi settori comporta sicuramente un netto risparmio nella deplezione delle riserve di ossigeno.

Durante l'immersione, l'innervazione simpatica responsabile della vasocostrizione coinvolge soltanto le arterie principali, ma non di tutti gli apparati: nessuna innervazione di questo tipo è infatti presente a livello di aorta, arterie coronarie ed arterie polmonari.

Questo fa sì che venga mantenuta la perfusione di cuore, encefalo e polmoni, a dispetto della forte stimolazione simpatica.

Negli apparati innervati, la vasocostrizione simpatica è di un livello tale da prevaricare anche l'azione dei mediatori ad azione vasodilatatrice quali ossido nitrico e monossido di carbonio, che normalmente vengono prodotti da qualsiasi tessuto in condizioni di ipossia (quali appunto muscoli, reni, cute ed organi splancnici durante l'immersione).

Per quanto riguarda invece la pressione, alla diminuzione della frequenza cardiaca corrisponde un aumento della vasocostrizione, in questo modo la pressione nelle arterie centrali viene mantenuta costante.

Sostanzialmente quindi, bradicardia e vasocostrizione rallentano il consumo delle riserve di ossigeno e le ridistribuiscono a cuore ed encefalo.

In un uomo, l'afflusso sanguigno al muscolo può essere interrotto anche per 15 minuti, quello agli arti anche per alcune ore, senza che vi sia un danno apprezzabile dei tessuti; il cuore invece subirebbe danni molto più ingenti in molto meno tempo e l'encefalo dopo soli 3-5 minuti, con un rischio di morte per il soggetto del 50% dopo soli 2-3 minuti.

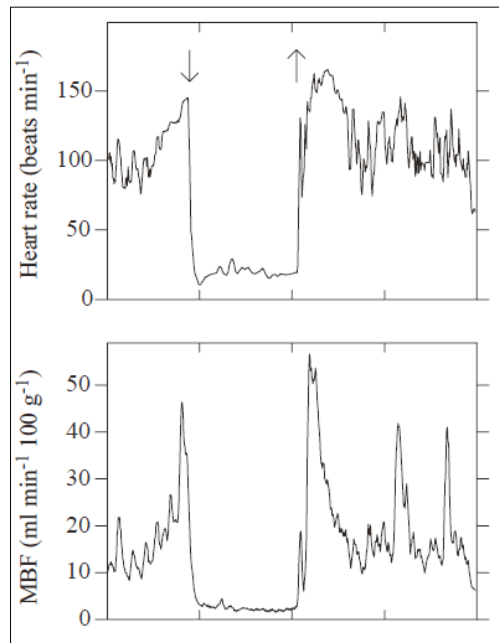
Essenzialmente quindi durante un'immersione prolungata, i muscoli devono contare sulle proprie riserve di ossigeno: come si vede in Figura 13 per la foca comune, ma ciò risulta valido anche per il tursiope, durante l'immersione le riserve muscolari vengono "bruciate" e si ha l'accumulo intramuscolare di acido lattico.

Tutto questo permette di non andare ad intaccare le riserve ematiche di ossigeno (le quali diminuiscono molto meno rapidamente rispetto alle riserve di ossigeno muscolari) ed il sangue arterioso manterrà sempre un certo grado di ossigenazione.

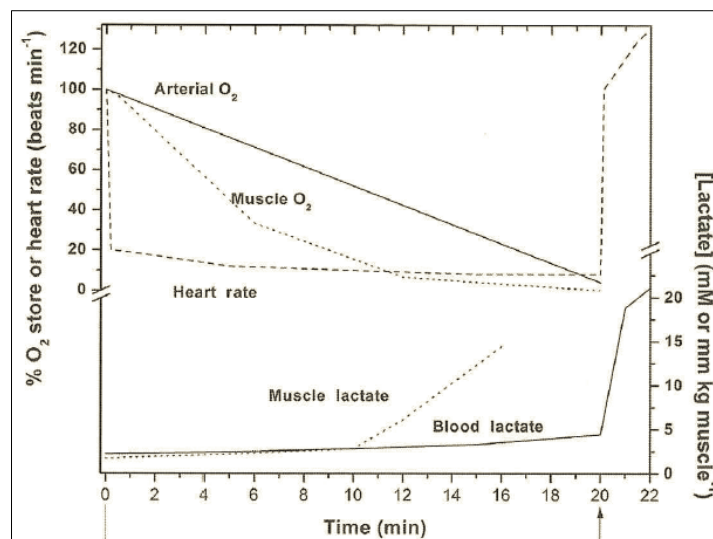
I muscoli risultano quindi quasi esclusi dal circolo sanguigno (è dimostrato che una perfusione minima venga mantenuta, Ridgway e Howard, 1979) ed accumulano lattato al loro interno; con il ritorno in superficie dell'animale, l'aumento della frequenza cardiaca e la progressiva vasodilatazione, questo lattato viene immesso in circolo ed eliminato (Ponganis, 2015).

Come in qualsiasi mammifero, accade che nel momento in cui il metabolismo aerobio non è più sostenibile e l'organismo accumula una quantità eccessiva di acido lattico, l'animale torna in superficie per respirare, i cetacei però mostrano un grado di sopportazione all'asfissia molto maggiore rispetto ai mammiferi terrestri (Elsner et al., 1966).

In conclusione, i cetacei sono in grado non solo di far arrivare più aria a livello alveolare, ma di assorbire un livello maggiore di ossigeno e di stoccarlo con maggiore efficienza nel proprio organismo, con quella che di fatto è una massimizzazione dell'efficienza degli apparati respiratorio e circolatorio.



**Figura 12** Frequenza cardiaca e flusso sanguigno muscolare durante immersioni di 3 minuti nella foca comune (*Phoca vitulina*), le frecce indicano l'inizio e la fine dell'immersione (Jobsis et al., 2001).



**Figura 13** Profili durante un'immersione forzata di frequenza cardiaca, ossigenazione sanguigna/muscolare e accumulo di lattato nella foca comune (*Phoca vitulina*) (Jobsis et al., 2001).

## **1.5 Il problema della coagulazione**

Come viene riportato da Ridgway (1976), i cetacei sono caratterizzati da un tempo di coagulazione rallentato e mancano del Fattore XII (o di Hageman) della cascata della coagulazione.

Maggiori informazioni si hanno da Tibbs et al. (2005): durante le fasi di immersione, condizione in cui il flusso sanguigno rallenta considerevolmente a causa del riflesso bradicardico, ci si ritrova ad avere delle raccolte di sangue all'interno delle reti mirabili e nelle lacune venose del fegato. Soprattutto per quanto riguarda le lacune epatiche, una raccolta quasi stagnante di sangue avente comunque alti livelli di ematocrito e di catecolamine circolanti, oltre ad una crescente concentrazione di lattato a causa dell'ambiente sempre più acido (tutte condizioni che nei mammiferi terrestri favoriscono la coagulazione), si rende necessario un meccanismo in grado di impedire l'estesa formazione di coaguli.

Il sangue quindi va mantenuto fluido, per questo manca il fattore fondamentale della cascata intrinseca, dovendo però mantenere intatta la propria capacità di rapida coagulazione in caso di bisogno, ad esempio in caso di ferite o traumi, infatti la cascata estrinseca rimane inalterata.

La mancanza del Fattore XII è causata da una conversione del suo gene in uno pseudogene, per via di due mutazioni *nonsense* (Semba et al., 1998); questa mutazione sembra essere anche la causa del prolungato tempo di attivazione parziale della tromboplastina (APTT), precedentemente osservato in questi animali (Ridgway 1972; Gulland et al., 1996).

## **1.6 Storia delle reti mirabili**

Non è noto ai più, ma la questione dell'esistenza della rete mirabile nella specie umana ha rivestito un ruolo da protagonista nello sviluppo di una visione critica del mondo rinascimentale in contrapposizione con la fino ad allora indiscussa *auctoritas* del mondo greco e romano (e indirettamente della Chiesa Cattolica).

Sotto la protezione della Repubblica di Venezia, un ruolo cruciale ha svolto anche l'Università di Padova, che tra XIV e XV secolo divenne il principale centro scientifico d'Europa, e che nel 1537 annoverava tra i suoi professori Andrea Vesalio.

### **1.6.a Galeno**

Studioso greco del II secolo d.C. originario dell'Asia minore ed in seguito trasferitosi a Roma, visse nel periodo di declino del mondo e della cultura greca.

Galeno rappresenta per noi, impegnati nella trattazione delle reti mirabili, l'*auctoritas* greca per eccellenza.

Infatti nel *Corpus Galenicum* è il primo a darci una descrizione dettagliata di una rete mirabile alla base dell'encefalo (sebbene essa fosse già stata scoperta da Erofilo).

Viene ritenuto ormai certo che Galeno fondò il suo lavoro sulla dissezione di un ampio numero di primati, cani, cavalli e ruminanti e che in seguito, per analogia, incluse anche l'uomo nel suo trattato di anatomia senza però averne mai avuto un riscontro pratico, anche se ciò venne invece supposto fino al XVI secolo.

Non fu sicuramente l'unico anatomico, nell'arco della storia, a procedere in tal senso: Leonardo da Vinci e Thomas Willis (medico britannico del XVII secolo, scopritore del Circolo di Willis) commisero lo stesso "errore".

Non bisogna tuttavia giudicare l'opera solamente in base a questo vizio di fondo: pur non potendo essere esteso alla specie umana, quello da lui prodotto è un trattato di anatomia estremamente preciso su diverse specie animali, supportato dall'osservazione e dalla sperimentazione diretta e non basato su semplici speculazioni (Cole, 1949).

### **1.6.b Vesalio**

Per 1300 anni dopo Galeno, periodo di tempo incredibilmente lungo ed oggi identificato come Periodo Scolastico, ogni ulteriore ricerca in campo scientifico venne considerata superflua (e alle volte addirittura proibita).

L'autorità greca era stata elevata a canone di perfezione, esaurendo ed impedendo ulteriori tentativi di progresso nella conoscenza.

Con l'avvento del Rinascimento si assiste però ad un risveglio del pensiero critico non solo verso il mondo, ma anche verso gli autori scolastici.

Andrea Vesalio, anatomista e medico fiammingo considerato il padre dell'anatomia moderna, grazie alle osservazioni derivate dalla pratica della dissezione metodica di cadaveri umani, fu il primo a rigettare completamente la medicina galenica.

Professore presso l'università di Padova della cattedra di Anatomia e Chirurgia, egli pubblicò a Venezia, nel 1543, la prima opera scientifica di anatomia: *De humani corporis fabrica libri septem*, più comunemente chiamata *Fabrica*.

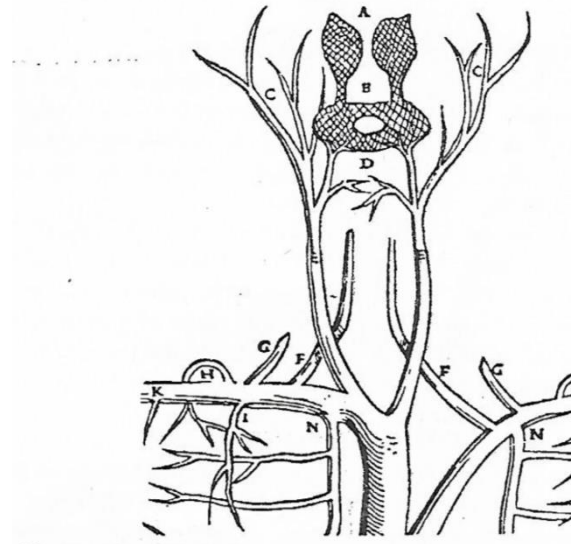
Comparando uno scheletro umano con uno scheletro di scimmia, Vesalio si rese conto che le asserzioni del *Corpus Galenicum* erano tutte basate sulla dissezione animale e non su quella umana, e nella *Fabrica* egli si propone di correggere gli errori arrivati a Galeno dal mondo animale (Cole, 1949).

Uno degli step fondamentali nella revisione critica degli scritti fu proprio la rete mirabile, in quanto essa era uno degli elementi fondamentali su cui poggiava la fisiologia galenica.

Essa stessa è la prova di come le osservazioni fossero basate sullo studio di specie diverse da quella umana dato che essa non esiste nell'uomo, ma è ben sviluppata in tutti gli ungulati ed è presente anche in cane e gatto.

«Quante, spesso assurde cose sono state accettate in nome di Galeno... Tra queste quel mirabile plesso reticolare, la cui esistenza viene costantemente sostenuta nei suoi scritti e di cui i medici parlano continuamente. Essi non lo hanno mai visto, ma tuttavia continuano a descriverlo sulla scorta dell'insegnamento di Galeno. Io stesso sono ora realmente meravigliato per la mia (precedente) stupidità[...] Causa la mia devozione a Galeno non intrapresi mai una pubblica dissezione di una testa umana senza contemporaneamente servirmi di quella di un agnello o di un bove per mostrare che non riuscivo a riscontrare in alcun modo nell'uomo [...] e per evitare che gli astanti mi rimproverassero di essere incapace di trovare quel plesso a tutti loro così ben noto per nome. Ma le arterie carotidi non formano affatto il plesso reticolare descritto da Galeno»

(*De humani corporis fabrica libri septem*, VII, cap. 12)



**Figura 14** Disegno originale di Vesalio (1538) raffigurante la rete mirabile del seno cavernoso (B).

### 1.6.c Slijper

Per quanto riguarda l'approfondimento della struttura delle reti nei mammiferi marini, grandi passi avanti sono stati fatti a bordo delle baleniere, tra XVII e XIX secolo, che per naturalisti e biologi rappresentavano un perfetto laboratorio di osservazione e di studi.

Un riassunto delle osservazioni maturate durante queste esperienze, influenzate anche da scritti quali il trattato di anatomia di Breschet (1836), ci viene da E. J. Slijper nel suo libro *Whales* (1979):

«One of the strangest Cetacean characteristics is undoubtedly the presence of numerous and widespread vascular networks (the so-called *retia mirabilia*) in the blood system. [...] sometimes arteries and veins branch out into a network of small vessels which have neither the very thin walls nor the other characteristics of capillaries.

There are very small arteries or veins, with arterial networks interposed between two arteries and venous networks between two veins. Although such networks occur in various terrestrial mammals as well (including cows) they were once thought so unusual that they were given their present name of *retia mirabilia*, meaning “wonder-networks”.

... [The arteries] divide into innumerable branches in a serpentine course. All the branches are of equal diameter, and the terminal branches are, moreover, imperceptibly interwoven and are anastomosed so as to form a complete network. From the functional point of view, it is important to note that while the afferent vessels are predominantly of the elastic type, the vessels of the network itself are strongly muscular, i.e. their wall consists mainly of a thick layer of smooth muscle at the expense of elastic fibres.

A microscopic examination will show that, in addition to being built up of arteries, the *retia* are also built up of veins, although to a much lesser extent. In contrast to the arteries, these small veins have very thin walls without muscle tissue. Moreover, they lack valves so that the blood in them can flow in two directions. In a very few places, the arterial *retia* are joined to the venous *retia* by capillaries. [...] The *retia mirabilia* lie embedded in adipose tissue consisting of a large mass of fat cells separated by connective tissue septa.

[...] the fat is not so much a food reserve as a shock-absorber. The very structure of the tissue, which resembles a quilt, would seem to bear out this contention. Thus the structures, the serpentine course of the small vessels, the many branches, the anastomoses, and the thick muscular wall of the small arteries, all strongly point to the conclusion that the *retia* are subjected to very great and quick changes of volume. By quick distensions and contractions of their muscular wall, the small arteries enable the *retia* to absorb and expel large quantities of blood very quickly, and some form of shock-absorber is obviously essential if they are to function smoothly. Moreover, it is quite possible that the venous *retia* also act as shock-absorbers for the arterial *retia*.»

Slijper (1979) Whales, pp 161-163)

«Una delle più strane caratteristiche dei cetacei è indubbiamente la presenza di numerose e diffuse reti vascolari (*retia mirabilia*). A volte infatti il sistema vascolare devia dalla composizione canonica e arterie e vene si ramificano in una rete di piccoli vasi che non possiedono né la sottilissima parete né le altre caratteristiche dei capillari.

Esistono invece arterie o vene molto piccole, con reti arteriose interposte tra due arterie e reti venose interposte tra due vene. Nonostante il fatto che tali reti esistano anche in svariati animali terrestri (vacche comprese), vennero reputate così inusuali da ricevere il nome di *retia mirabilia*. Le arterie si dividono in innumerevoli rami, con andamento serpentino, e tutti i rami sono di uguale diametro. I rami terminali sono impercettibilmente intrecciati e anastomizzati a formare una rete completa.

Dal punto di vista funzionale è importante osservare come mentre i vasi afferenti sono principalmente di tipo elastico, i vasi della rete sono muscolari, ovvero la loro parete consiste per la maggior parte di uno spesso strato di muscolatura liscia, a discapito delle fibre elastiche. Una valutazione microscopica rivela inoltre che, oltre che da arterie, le reti sono composte anche da vene (seppur in minor misura). Tuttavia queste vene possiedono una parete molto sottile e priva di tessuto muscolare. Mancano inoltre di valvole [le vene] e in questo modo il sangue può scorrere in entrambe le direzioni.

In alcuni rari punti, la rete arteriosa è unita a quella venosa da dei capillari.

La rete mirabile è circondata da tessuto adiposo, ovvero una grande quantità di cellule adipose separate da trabecole di tessuto connettivo. In questo caso il grasso non è tanto una riserva energetica, quanto un materiale protettivo la cui funzione è attutire gli urti. La struttura stessa del tessuto, la quale ha un aspetto come trapuntato, sembrerebbe confermare questa tesi.

Tutto ciò che abbiamo finora descritto, la struttura, l'andamento serpentino dei piccoli vasi, le molteplici ramificazioni, le anastomosi e la spessa parete muscolare delle arteriole, porta quindi a pensare che la rete mirabile sia soggetta a notevoli e rapidi cambiamenti di volume; attraverso rapide distensioni e contrazioni della loro parete muscolare, le piccole arterie permettono alla rete di accumulare ed espellere grandi quantità di sangue molto rapidamente (quindi, se si vuole che funzioni in modo fluido, un sistema per attutire gli urti è indispensabile).

Inoltre è possibile che anche le reti venose abbiano un ruolo di attenuazione degli urti per la rete arteriosa. Quella di nostro interesse, tra le tanti reti mirabili presenti, è la rete baso-craniale, posta intracranialmente nelle vicinanze dell'ipofisi. Questa rete supplisce alla maggior parte dell'encefalo, dato che nei cetacei l'arteria carotide interna ha un lume molto stretto o è atrofizzata.»

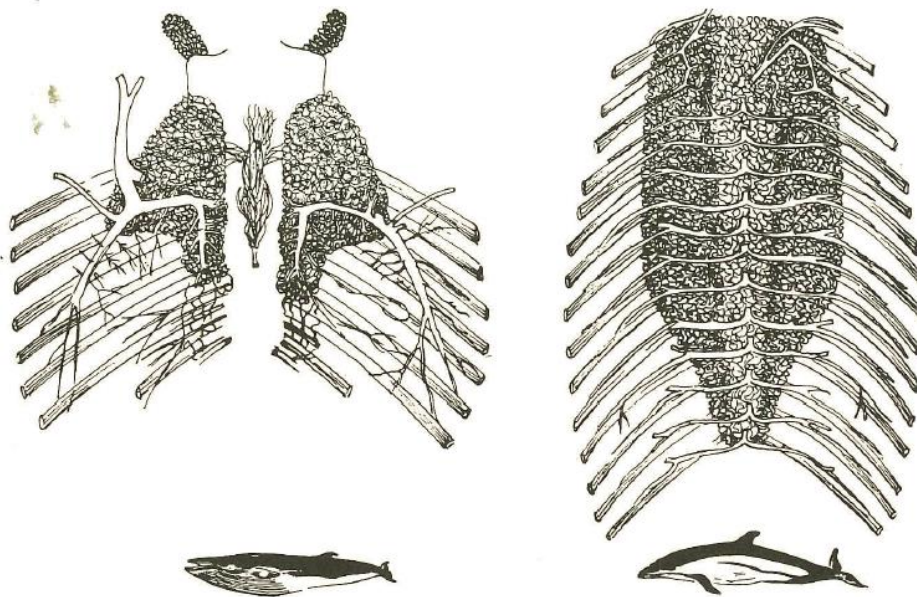


Figure 92. View into the thorax of a Little Piked Whale and a Common Dolphin to show the position of the vascular networks, the ribs, and some afferent vessels. (Bouvier, 1889.)

**Figura 15** Immagine tratta raffigurante le reti mirabili in una balenottera rostrata (*Balaenoptera acutorostrata*) e in un delfino comune (*Delphinus delphis*) (Slijper, 1979).

### 1.7 Anatomia della rete mirabile

Per *rete mirabile* storicamente si intende la "rete carotide intracranica", ovvero quella rete arteriosa anastomotica alloggiata all'interno del seno cavernoso (uno spazio vascolare privo di parete propria, derivante da uno sdoppiamento dei foglietti della dura madre), posto ai lati della sella turcica in corrispondenza dell'ipofisi.

Nei mammiferi terrestri la definizione di rete mirabile è ascrivibile solamente a questa struttura vascolare alla base del cranio (con le dovute differenze di specie), a differenza dei cetacei in cui reti mirabili si estendono all'interno del corpo per tutta lunghezza dell'animale..

Essendo stata a lungo studiata nei mammiferi domestici, non ci si può esimere in questa trattazione dal riassumerne le caratteristiche principali, per poi concentrarsi sullo studio delle reti dei cetacei.

La rete carotide intracranica è un dispositivo vascolare misto, artero-venoso, in assenza però di anastomosi dirette, che si interpone tra circolazione sistemica e circolazione cerebrale.

I vasi arteriosi si dividono in una serie di rami di calibro inferiore, immersi in un ambiente vascolare di tipo lacunare contenente sangue venoso.



Pur quindi non esistendo un passaggio di sangue dal circolo arterioso a quello venoso, si verifica comunque un contatto tra le pareti dei diversi comparti.

Ma quali specie possono vantare una rete mirabile e quali ne sono i vantaggi?

Per comprenderne appieno la struttura ed il ruolo, quanto segue è un'accurata comparazione tra le diverse specie a partire dall'uomo, essendo esso il più studiato ed il più compreso, per passare poi all'analisi di alcune specie domestiche il cui confronto si mostra significativo per la piena comprensione di quella che sarà poi l'analisi della rete mirabile nel tursiope.

### **1.8 Vascolarizzazione dell'encefalo umano (dispositivo arterioso endocranico)**

Quanto scritto in questo capitolo è in accordo con Kaplan (1956) e Bairati (1973), qualora la fonte sia diversa essa viene riportata fra parentesi.

L'encefalo umano è vascolarizzato dalle due arterie carotidi interne, di destra e di sinistra, e dalle due arterie vertebrali; quest'ultime si uniscono a formare un'arteria impari mediana: l'arteria basilare.

Qualsiasi interruzione di queste vie principali comporterà un quadro patologico, che potrà manifestarsi come ischemia transitoria più o meno lieve fino all'ictus, con conseguenti disturbi neurologici.

Il circolo carotideo ed il circolo vertebro-basilare presentano una serie di anastomosi a livello della base dell'encefalo chiamato Circolo Arterioso Cerebrale o *Circolo di Willis*, dal nome dello scopritore.

Il sangue refluo poi attraverso le vene encefaliche viene raccolto dal sistema dei seni venosi della dura madre e convogliato attraverso il foro giugulare nella vena giugulare interna.

L'arteria carotide comune nasce, a destra, dal tronco brachiocefalico, e a sinistra direttamente dall'arco dell'aorta, per poi decorrere lungo il collo e dividersi in carotide esterna ed interna a livello della cartilagine tiroidea della laringe.

Nel collo le arterie scorrono assieme alla vena giugulare e al nervo vago.

Le arterie carotidi interne e il sistema vertebrale-basilare vanno a formare il circolo arterioso intracranico, mentre le arterie carotidi esterne formano il circolo arterioso extracranico, senza possibilità di comunicazione tra di essi.

Di nostro particolare interesse è quindi l'a. carotide interna, che nell'uomo penetra nel cranio attraverso il canale carotico per poi immettersi all'interno del seno cavernoso.

Infatti è l'arteria carotide interna, che non a caso è anche quella di maggior calibro, il principale tronco della vascolarizzazione encefalica (assieme all'arteria basilare).

Il lungo percorso dell'arteria viene generalmente suddiviso in 3 tratti: cervicale, carotideo (con la penetrazione dell'arteria nel canale carotideo del temporale) e cavernoso; quest'ultimo segmento ha un decorso curvilineo, in quanto una volta penetrata nel seno l'arteria esegue una doppia curva ad "esse" per poi flettersi bruscamente verso l'alto e perforare la dura del seno cavernoso, fino allo spazio intra-aracnoideale.

Una volta superato il seno cavernoso, l'arteria carotide interna distacca l'arteria oftalmica e l'arteria centrale della retina, e come rami terminali l'arteria cerebrale anteriore, l'arteria cerebrale media, l'arteria corioidea anteriore e l'arteria comunicante posteriore.

Tutti questi rami terminali sono da considerarsi facenti parte del circolo arterioso cerebrale.

(In realtà, tenendo conto dello sviluppo embriologico, il vero vaso terminale è solamente l'arteria cerebrale anteriore, mentre gli altri dovrebbero essere considerati dei rami collaterali).

Le arterie vertebrali nascono invece dalle arterie succlavie di destra e di sinistra e risalgono posteriormente lungo il collo per entrare nel cranio attraverso il forame occipitale.

Successivamente le arterie vertebrali controlaterali si uniscono a formare l'arteria basilare, impari e mediana.

I due rami terminali dell'arteria basilare sono le arterie cerebrali posteriori, anch'esse facenti parte del circolo arterioso cerebrale, nel quale si uniscono all'arteria comunicante posteriore derivante dalle arterie carotidi.

Le due arterie vertebrali e l'arteria basilare emettono numerosi vasi collaterali che provvedono ad irrorare il tratto iniziale del midollo spinale, il tronco cerebrale, il cervelletto e parte del diencefalo, forniscono poi l'arteria uditiva interna.

L'arteria carotide esterna, invece, una volta distaccatasi dalla carotide comune, scorre tra il processo mastoideo e l'angolo della mandibola per poi dividersi in arteria mascellare, arteria temporale superficiale, arteria auricolare posteriore, arteria occipitale, arteria facciale, arteria linguale, arteria faringea ascendente ed arteria tiroidea superiore.

In definitiva, l'encefalo, eccezion fatta per le rare parti vascolarizzate dai rami delle arterie vertebrali, riceve la maggior parte del sangue arterioso dall'a. basilare e dalle due carotidi destra e sinistra, che sono appunto unite da un sistema di tronchi anastomotici a formare il cosiddetto poligono, o esagono, di Willis.

Ma cos'è quindi il circolo arterioso cerebrale?

Il circolo arterioso cerebrale è un circolo anastomotico, o maglia arteriosa, impari e mediano a forma di poligono od esagono, situato nello spazio subaracnoideo alla base dell'encefalo fra il bordo superiore del ponte e la superficie anteriore dell'ipotalamo.

Tale organizzazione permette di ottenere uniformità di pressione nelle arterie che poi si distaccheranno dalle tre principali.

I lati del poligono sono costituiti dalle arterie cerebrali posteriori, dalle arterie comunicanti posteriori, dalle arterie cerebrali anteriori e dall'arteria comunicante anteriore, le quali unitamente al tronco delle carotidi ed al tratto terminale della basilare formano una sorta di anello.

Rami perforanti si distaccano da tutte le arterie che compongono il circolo per penetrare in profondità e contribuire alla vascolarizzazione di strutture profonde dell'encefalo.

L'arteria cerebrale anteriore e l'arteria cerebrale media vascolarizzano esclusivamente strutture telencefaliche (porzione rostrale del Telencefalo e corpo striato), l'arteria cerebrale posteriore vascolarizza invece la porzione caudale del Telencefalo e la porzione di Diencefalo adiacente.

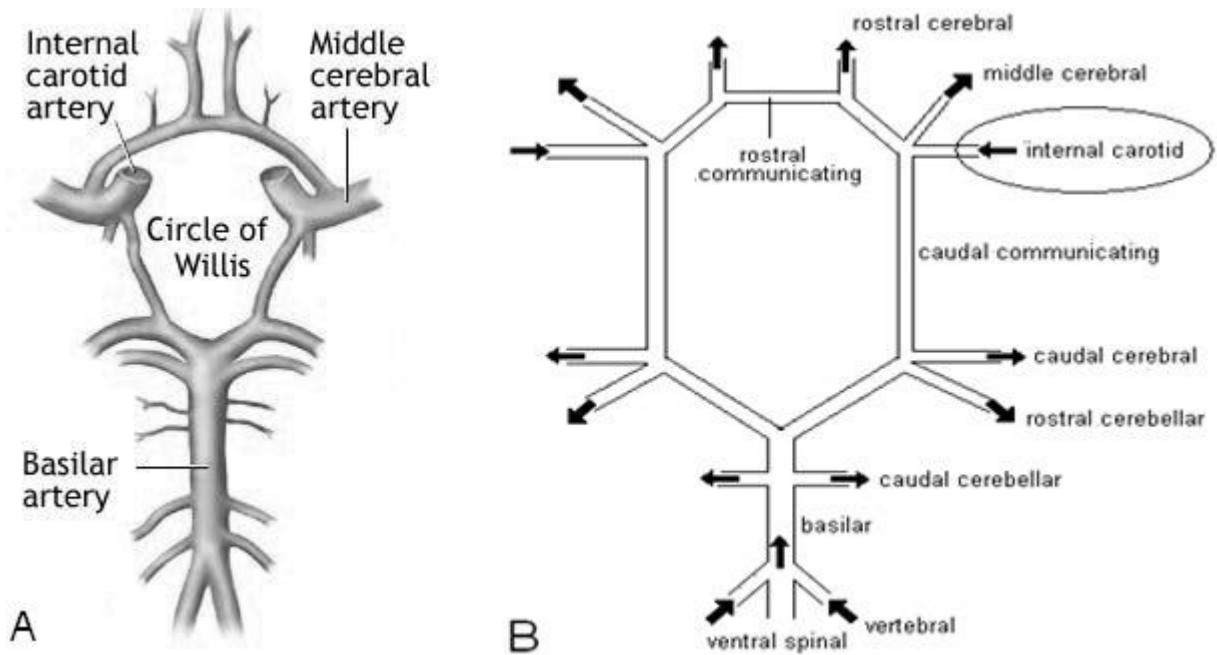
L'arteria corioidea anteriore e l'arteria cerebrale posteriore vascolarizzano l'ipotalamo.

L'arteria basilare vascolarizza invece Mesencefalo e Metencefalo, tant'è che uno dei rami terminali dell'arteria basilare prende il nome di arteria mesencefalica.

La vascolarizzazione delle parti più caudali dell'encefalo e del midollo allungato sono invece da deputare alle arterie vertebrali.

Il circolo arterioso cerebrale non è sempre costante nella sua presentazione e può presentare delle sensibili variazioni, solitamente a carico delle arterie comunicanti posteriori, tuttavia la mancanza di una di esse è caso da riputarsi eccezionale, mentre non lo è l'assenza occasionale della comunicante anteriore.

Va infine fatto presente che il dispositivo arterioso endocranico è praticamente indipendente dal circolo degli involucri, ovvero tutte le anastomosi rilevate con rami meningei encefalici, arterie meningeie della carotide esterna, rami dell'oftalmica e arterie della fascia, arteria uditiva interna e rami della carotide esterna dell'orecchio medio, sono di minimo grado e non sufficienti a compensare eventuali deficit del circolo encefalico in caso di riduzione anche parziale del flusso sanguigno nelle sue arterie.



**Figura 16** Rappresentazione schematica del circolo arterioso cerebrale (Abdi et al., 2016).

Per quanto concerne il drenaggio venoso dell'encefalo, per completezza una sua descrizione è riportata nel capitolo "Allegati".

### 1.9 Anatomia comparata

L'apporto di sangue arterioso nelle diverse specie deriva da un pattern primario comune a tutti i mammiferi e comprendente:

- il sistema dell'arteria vertebrale-basilare;
- il sistema della carotide interna;
- il sistema della carotide esterna;
- il sistema dell'arteria stapedia e dei suoi tre rami.

Le aree irrorate da arteria vertebrale e carotide interna sono l'encefalo ed il globo oculare (circolo intracranico), mentre il sistema dell'arteria carotide esterna irrorava lingua, faccia, parte posteriore della testa e faringe.

Dei tre rami dell'arteria stapedia, il ramo sopraorbitale è destinato alla dura madre ed alla parte extrabulbare dell'orbita, il ramo infraorbitale alla mascella superiore ed il ramo mandibolare alla mascella inferiore (assieme alla carotide esterna forma il circolo extracranico).

Filogeneticamente, alterazioni di questa struttura-base si sono espresse attraverso l'obliterazione dell'arteria carotide interna e/o di certe porzioni del sistema della stapedia, con diversi gradi e combinazioni (Bugge, 1978): a noi interessa la prima.

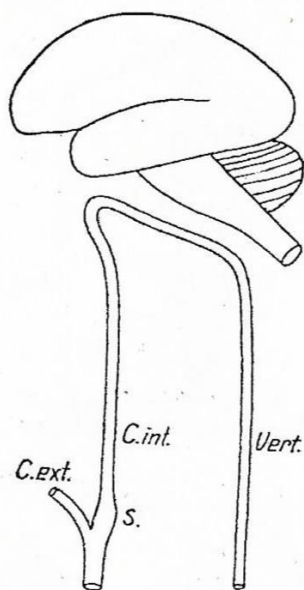


Fig. 25. *Homo sapiens* (Anthropoidea).

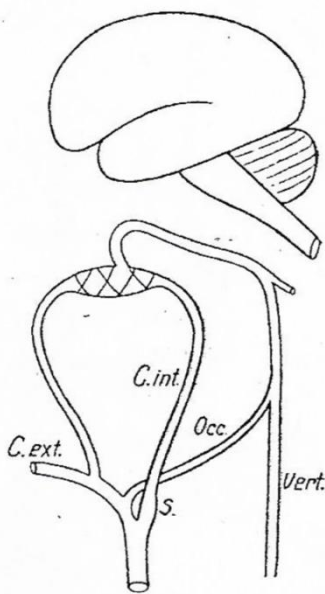


Fig. 42. *Canis familiaris* (Carnivora).

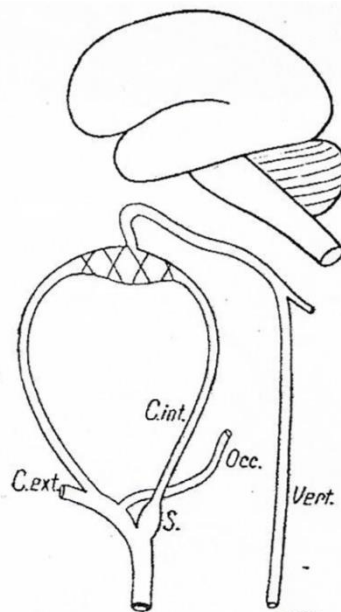


Fig. 37. *Felis domestica* (Carnivora).

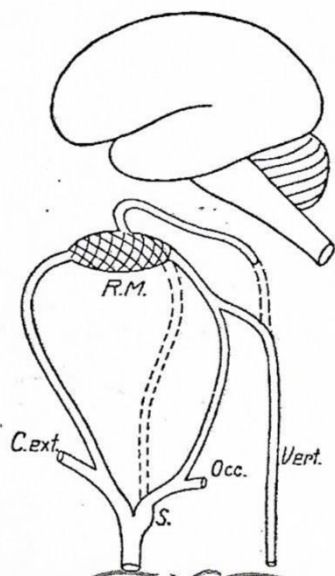


Fig. 34. *Ovis aries*, *Bos taurus* and some other Artiodactyla.

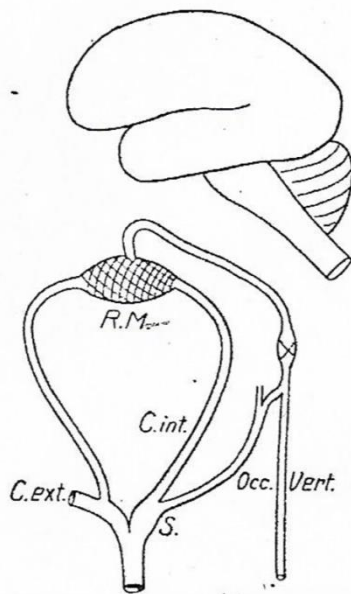


Fig. 44. *Sus scropha* (Artiodactyla).

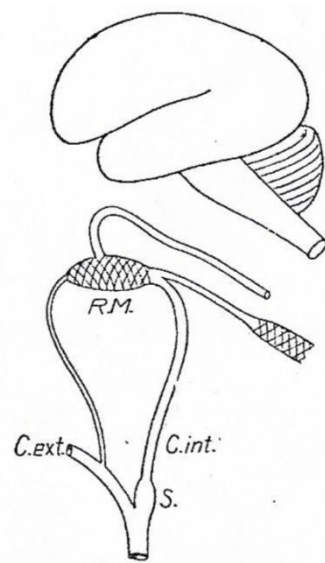


Fig. 33. *Phocaena phocaena* (Cetacea).

**Figura 17** (Ask-Upmark, 1935).

Come si evince dalle immagini della Figura 17, a livello delle anastomosi tra l'arteria carotide interna e l'arteria mascellare interna troviamo una più o meno sviluppata (a seconda della specie) rete mirabile alloggiata nel seno cavernoso, posta "in serie" tra il circolo carotideo ed il circolo arterioso cerebrale, la quale risulta solo rudimentale nel cane e ben sviluppata in felidi ed ungulati.

Il sistema di conduzione arterioso non ha soltanto il compito di rifornire i tessuti di sangue ossigenato, ma anche di fornire loro calore.

In condizioni di sforzo intenso tuttavia, può non esserci un adeguato dissipamento di questo calore, dovuto ad un aumento del flusso senza un proporzionale raffreddamento del sangue, ed in uno studio è stato evidenziato come in animali dotati di una rete carotidea come quella sopra descritta, l'encefalo venga protetto contro l'accumulo eccessivo di calore (*overheating*) anche in condizioni di stress fisico elevato. (Baker e Chapman, 1977)

Questo perché la rete carotidea intracranica, così come accade in altri distretti corporei (ad esempio il plesso pampiniforme), con il suo andamento tortuoso e le molte diramazioni, rallenta il sangue arterioso e ne aumenta il tempo di contatto con quello venoso del seno cavernoso (più freddo, grazie alla dissipazione di calore avvenuta a livello di naso e bocca), di fatto riducendo la temperatura del sangue in arrivo all'encefalo.

In particolare, nel cane, quando l'animale ansima, la dispersione di calore a livello di naso e bocca aumenta per mezzo dell'evaporazione e l'encefalo viene mantenuto ad una temperatura inferiore rispetto al resto dell'organismo (nelle specie prive di rete, la temperatura intracranica è uguale a quella degli altri distretti corporei anche in caso di *overheating*).

Ovviamente, più è sviluppata la rete e più il meccanismo di raffreddamento sarà efficiente, ad esempio nel gatto e nella pecora il sangue della rete carotidea può essere raffreddato di più di 1°C (Baker e Chapman, 1977).

Dato che i "parenti" terrestri più stretti degli odontoceti sono gli ungulati, essi rappresentano un buon punto di partenza per discutere l'anatomia dell'irrorazione encefalica.

### **1.9.a Suidae**

La rete carotidea dei suini, così come quella degli altri mammiferi descritti, si sviluppa lungo il corso dell'arteria carotide interna e la maggior parte di essa è localizzata intracranialmente all'interno del seno cavernoso, in cui può venire a contatto con il sangue venoso, mentre un suo piccolo segmento si estende extracranialmente attraverso il *foramen lacerum* per svilupparsi ventralmente al *foramen* stesso.

La porzione extracranica dell'arteria carotide interna conferisce l'apporto principale di sangue alla rete carotidea, la sua porzione intracranica invece, dopo aver superato la dura madre, si unisce al circolo arterioso cerebrale.

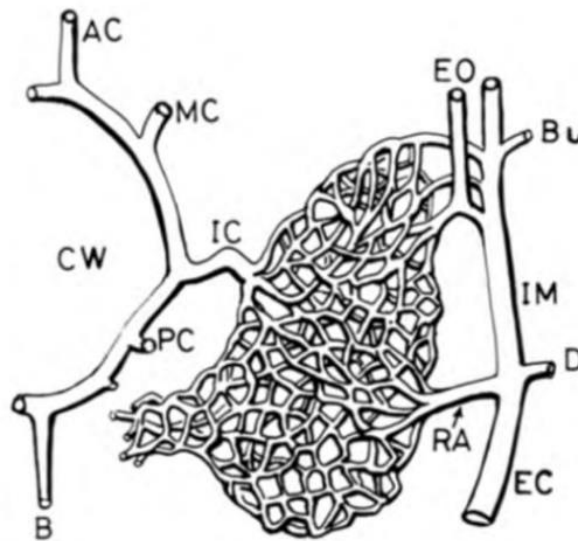
Una seconda rete caudale extracranica è localizzata a livello epidurale in corrispondenza dell'atlante: essa riceve sangue dalla porzione terminale dell'arteria vertebrale ed è connessa con il circolo arterioso cerebrale per mezzo dell'arteria basilare.

Nessuna connessione diretta è stata rinvenuta tra la rete mirabile carotidea (rostrale) e la rete mirabile epidurale (caudale) (Ghoshal e Khamas, 1985).

### 1.9.b Bovidae

Piccoli e grandi ruminanti sono, tra i mammiferi terrestri, quelli con la più stretta parentela con i cetacei, dato che fanno parte dello stesso ordine: *Cetartiodactyla*.

Nelle specie di questa famiglia il sangue arterioso destinato al circolo arterioso cerebrale deve prima attraversare una rete carotidea intracranica molto ben sviluppata, inoltre l'arteria carotide interna è generalmente obliterata ed assente nell'animale adulto (mentre può essere ancora patente nei giovani), se non per la sua porzione terminale che si distacca dalla rete carotidea per immettersi nel circolo arterioso cerebrale, diventando di fatto esclusivamente un vaso efferente la rete.



**Figura 18** Rappresentazione schematica della rete carotidea e dei suoi vasi afferenti ed efferenti: EC, a. carotide esterna; IM, a. mascellare interna; RA, ramo anastomotico; D, a. dentale; Bu, a. buccinatoria; EO, a. oftalmica ed etmoidale; IC, a. carotide interna; MC a. cerebrale media; AC, a. cerebrale anteriore; PC, a. comunicante posteriore; B, a. basilare; CW, circolo di Willis (Diéguez et al., 1983).

### Bue

La rete carotidea intracranica è alloggiata all'interno del seno cavernoso, quindi al di sotto della dura madre, e consiste di due metà simmetriche poste attorno all'ipofisi, collegate anteriormente e caudalmente da numerose anastomosi.

La rete si estende dal *foramen* orbito-rotondo (anteriormente) fin dietro al *foramen* ovale (posteriormente).

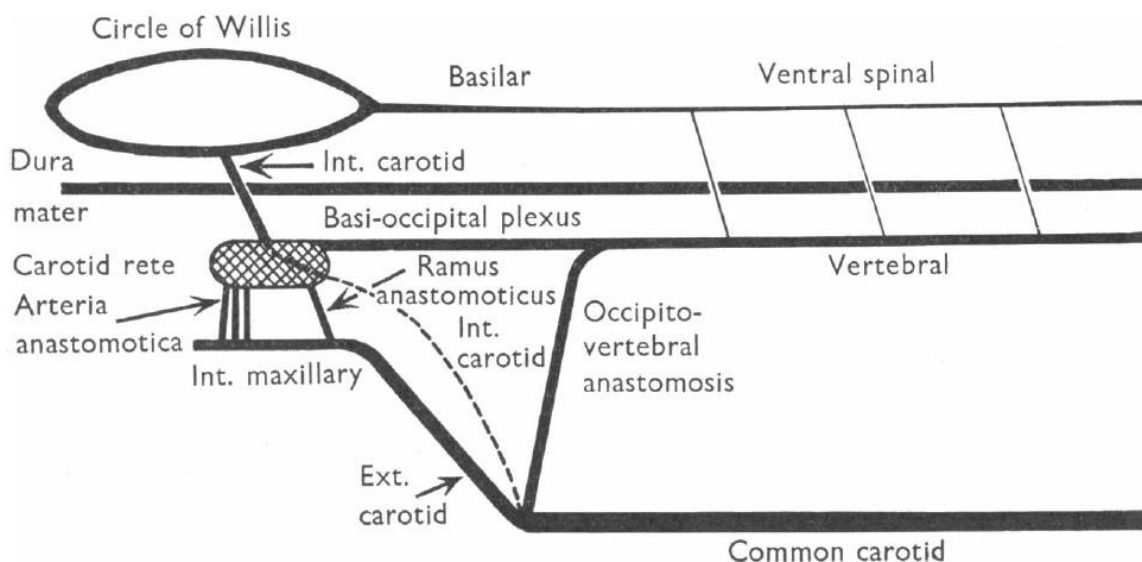
Il sangue arterioso destinato al circolo arterioso cerebrale deve obbligatoriamente passare attraverso questa rete, la quale riceve il sangue afferente all'encefalo dai due rami dell'arteria mascellare interna (continuazione dell'arteria carotide esterna): l'arteria anastomotica, la principale contribuente, ed il ramo anastomotico.

Altro sangue arterioso proviene dal plesso basi-occipitale, il quale riceve il sangue dall'arteria vertebrale, posteriormente, ed occipitale (ramo della carotide esterna), lateralmente.

La rete carotidea possiede un solo vaso efferente, ovvero la porzione più distale della carotide interna, che la collega al circolo arterioso cerebrale: essa infatti si divide in un ramo anteriore ed uno posteriore, che formano il circolo, i quali a loro volta diramano le arterie cerebrale anteriore, cerebrale media e cerebrale posteriore.

Il circolo è completato dall'arteria comunicante posteriore e dall'arteria comunicante anteriore (più piccola).

Differentemente che in altre specie (pecora compresa, si veda oltre), il contributo delle arterie vertebrali al circolo arterioso cerebrale non viene dato dall'arteria basilare (con la quale la comunicazione è quasi inesistente), ma dal plesso comunicante con la rete carotidea, rendendo l'arteria basilare un semplice ramo collaterale del circolo piuttosto che uno dei suoi vasi principali.



**Figura 19** Schema dell'andamento delle arterie cefaliche nel vitello. La linea tratteggiata sta ad indicare che l'arteria carotide interna non persiste nell'individuo adulto (Baldwin, 1964).

### **Pecora**

La struttura della rete carotidea nella pecora è simile a quella vista nel bue, ma la sua struttura in generale è meno complessa, perciò ci si limiterà ad evidenziarne solo la differenza principale: nella pecora, infatti, il sangue arterioso proveniente dall'arteria vertebrale non ha accesso alla rete carotidea, per via della completa mancanza del plesso basi-occipitale.

Tuttavia, come nel bue, l'arteria basilare è degradata a semplice ramo collaterale del circolo arterioso cerebrale e la sua comunicazione con le arterie vertebrali è minima, tanto che il sangue



proveniente dalle arterie vertebrali sembra andare ad irrorare solamente il tratto cervicale del midollo spinale e forse il midollo allungato.

In entrambe le specie è presente un'anastomosi tra l'arteria occipitale, ramo dell'arteria carotide esterna, e l'arteria vertebrale (Baldwin, 1964).

**In quelle specie con reti mirabili più estese, il maggior sviluppo di queste strutture sembra essere saldamente correlato all'obliterazione dell'arteria carotide interna o ad una riduzione sostanziale del suo calibro.**

### **1.9.c *Delfinidae***

Nei cetacei il sangue arterioso non raggiunge il circolo encefalico per mezzo dell'arteria carotide interna, la cui porzione terminale dopo la nascita regredisce a livello di cavità timpanica, a formare un legamento, perdendo ogni connessione con la porzione intracranica e con la rete mirabile carotidea (Costidis e Rommel, 2016a).

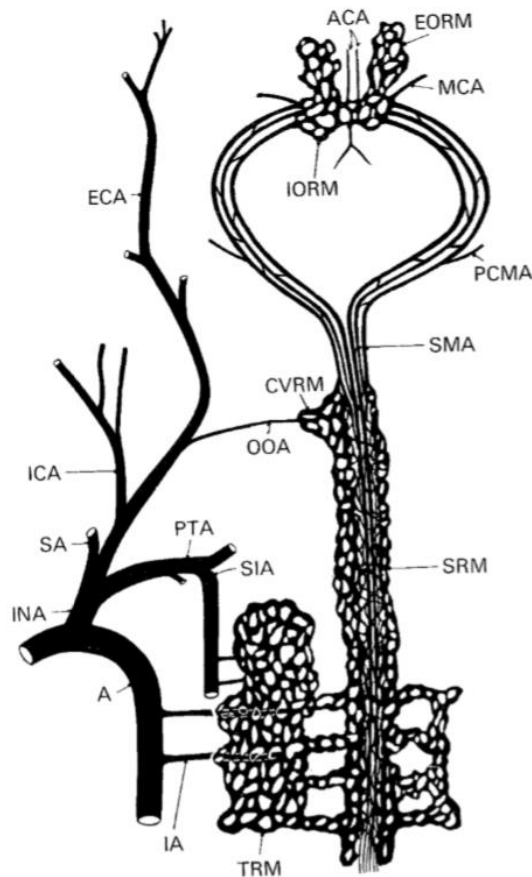
Ulteriore carattere peculiare di questi animali è la totale assenza del circolo arterioso cerebrale (Ridgway et al., 2006), oltre che delle arterie vertebrali e basilare (McFarland et al., 1979).

L'encefalo infatti è irrorato quasi esclusivamente dal sistema delle arterie spinali meningei, attraverso la rete mirabile cervicale, e in certa misura dall'arteria occipitale.

Questa rete mirabile cervicale costituisce una continuazione diretta della rete mirabile midollare contenuta nel canale vertebrale, la quale a sua volta deriva dalla rete mirabile toracica.

La rete mirabile toracica si continua poi posteriormente con la rete mirabile lombare.

Appare quindi necessaria una descrizione accurata dei vasi afferenti ed efferenti queste numerose reti, così da comprenderne appieno la distribuzione ed i siti d'irrorazione.



**Figura 20** Rappresentazione schematica del tipico pattern vascolare dei cetacei: A, aorta; ACA, anterior cerebral artery; CVRM, cervical rete mirabile; ECA, external carotid artery; EORM, external ophthalmic rete mirabile; IA, intercostal artery; ICA, internal carotid artery; INA, innominate artery; IORM, internal ophthalmic rete mirabile; MCA, middle cerebral artery; OOA, omo-occipital artery; PCMA, posterior cerebral meningeal artery; PTA, posterior thoracic artery; SA, subclavian artery; SIA, supreme intercostal artery; SMA, spinal meningeal artery; SRM, spinal rete mirabile; TRM, thoracic rete mirabile (McFarland et al., 1979).

A partire dall'arco aortico le due arterie coronarie si distaccano per prime, seguite dal tronco brachiocefalico, dal quale immediatamente si dirama l'arteria toracica posteriore destra.

Quest'ultima segue lateralmente trachea ed esofago, emette l'a. tiroidea profonda (ramo cefalico) e l'a. intercostale superiore (ramo caudale).

Dall'aorta discendente emergono anche una serie di arterie intercostali che alla loro origine formano un tronco comune, eccettuato per il secondo paio che è a sé stante.

L'arteria toracica posteriore destra e le arterie intercostali (compresa la superiore) costituiscono i vasi afferenti della rete mirabile toracica.

Attraverso i fori intervertebrali la rete mirabile toracica si continua nella rete mirabile midollare (*rete arteriales columnae vertebralis*, Slijper, 1936), alloggiata all'interno del canale vertebrale e posta a rivestimento del midollo spinale.

Come già detto, posteriormente la rete mirabile toracica si continua nella rete mirabile lombare, mentre in avanti la rete mirabile midollare si continua nella rete mirabile cervicale.

Quest'ultima è situata alla base del teschio, ventralmente ai condili occipitali, e riceve un'afferenza da parte dell'arteria occipitale (ramo dell'arteria carotide esterna).

I vasi efferenti delle reti toracica, midollare e cervicale sono le arterie meningeo spinali, le quali si prolungano rostralmente attraverso il *foramen magnum*.

Una volta passato il *foramen*, queste arterie si dirigono al seno cavernoso a formare la rete carotidea intracranica.

La rete mirabile del seno cavernoso riceve quindi sangue proveniente sia dalla rete toraco-midollare sia dalla carotide esterna, attraverso l'arteria occipitale e la rete mirabile cervicale.

Il tronco brachiocefalico destro invece, una volta staccatosi dall'aorta, si divide immediatamente in due rami: l'arteria succlavia e l'arteria carotide comune.

Dall'arteria succlavia si dipartono l'a. toracica interna e l'a. occipitale, la quale a livello di condilo occipitale emette un robusto ramo che afferrisce appunto alla rete mirabile cervicale; l'arteria succlavia si continua invece nell'arteria ascellare.

L'arteria carotide comune si divide invece in arteria carotide esterna ed arteria carotide interna, quest'ultima scorre medialmente lungo la trachea ed emette arterie tributarie per la laringe e, come già detto, la sua porzione distale si oblitera gradualmente a formare un cordone solido che si continua fino alla regione della rete mirabile oftalmica interna.

In accordo con McFarland et al (1979), la porzione extracranica dell'arteria carotide interna nel tursiope adulto sembrerebbe essere in grado di contribuire all'irrorazione del sistema nervoso centrale attraverso alcuni rami arteriosi secondari che andrebbero a terminare nella rete mirabile cervicale, tuttavia questo rinvenimento viene smentito da diversi autori (Galliano et al., 1966; Costidis e Rommel, 2016a), secondo i quali i rami secondari diretti alla rete altro non sono che collaterali dell'arteria occipitale.

Per quanto riguarda l'arteria carotide esterna, essa scorre più profondamente, lateralmente al muscolo sternocleidomastoideo e all'osso tiroideo, per poi incrociarsi con l'ansa cervicale (*ansa hypoglossi*).

La carotide esterna entra poi nella fossa pterigoidea, medialmente al ramo della mandibola, e si continua come arteria mascellare esterna; questa, durante il suo decorso, dà vita a numerose diramazioni: alveolari, infraorbitali ed afferenti il melone.

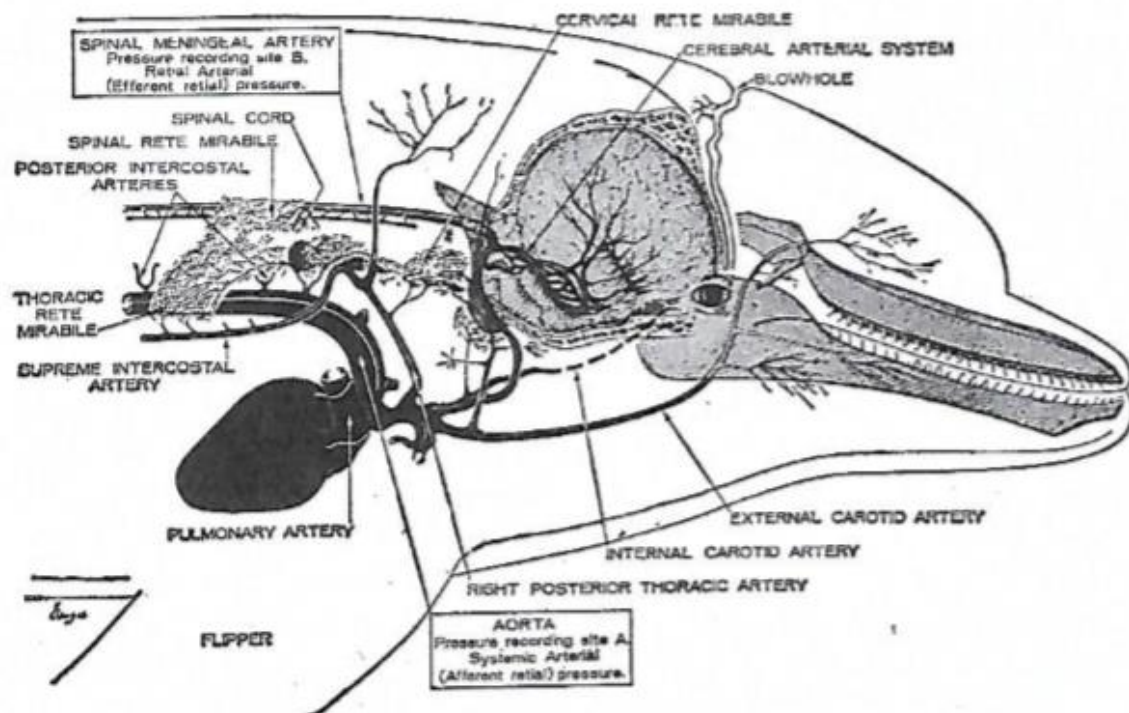
Diversi studi, recenti e non, riportano la presenza di un possibile apporto dell'a. mascellare (e quindi della carotide esterna) al circolo endocranico attraverso la rete oftalmica (Ask-Upmark, 1935; Nakajima, 1961), tuttavia i rilievi sono discordanti: McFarland et al. (1979) riportano la totale

assenza di tali connessioni, mentre Costidis e Rommel (2016a) riportano di averle riscontrate tra la porzione extracranica dell'a. oftalmica esterna, la rete oftalmica alloggiata all'interno dell'orbita ed infine la rete carotidea intracranica, il dibattito pertanto è ancora aperto.

Come l'arteria carotide interna, la carotide esterna non contribuisce direttamente al circolo encefalico ed è stata sperimentalmente legata unilateralmente in animali vivi senza dare apparente sintomatologia clinica (Galliano et al., 1966).

Il tronco brachiocefalico sinistro si distribuisce similmente a quello destro, esso è assente nello Zifio ed in altre specie (Costidis e Rommel, 2016a).

Dato che il drenaggio venoso dell'uomo e dei cetacei non concerne specificamente questa tesi e al fine di evitare una trattazione troppo lunga, per completezza esso è riportato nel capitolo "Allegati".



**Figura 21** Rappresentazione schematica dell'irrorazione toracica e cervicale nel tursiope (*Tursiops truncatus*) (Nagel et al., 1968).

## 1.10 Anatomia microscopica

Lo studio al microscopio ottico della rete carotidea nel suino, evidenzia una rete arteriosa di vasi a parete prevalentemente muscolare, con calibro da piccolo a medio, dotati comunque di una ben sviluppata lamina elastica, sia interna sia esterna.

I rami arteriosi sono rivestiti esternamente dall'endotelio proprio del seno cavernoso, in cui alloggiato (la stessa organizzazione è stata rinvenuta anche nella pecora e nel bue), si può quindi affermare che i rami arteriosi e il seno cavernoso condividono una tunica avventizia comune.

Essa contiene fibre elastiche ad andamento circolare che seguono il contorno del vaso ed anche nella tunica media è presente, seppur ridotto, un certo numero di fibre elastiche, tra le miofibrille del tessuto muscolare liscio.

Questa organizzazione sembrerebbe favorire lo scambio controcorrente di calore dal sangue arterioso a quello venoso, andando a regolare la temperatura dell'encefalo.

In alcune sezioni sono state viste delle evaginazioni dello strato muscolare della tonaca media rassomiglianti delle strutture valvolari.

Sono stati trovati anche un numero significativo di punti intra-arteriosi inspessiti, con un core fibroso o fibromuscolare che, assieme alle strutture valvolo-simili, potrebbero controllare la gittata del flusso sanguigno proveniente dai rami collaterali.

Il diametro luminale delle arteriole varia fra 98  $\mu\text{m}$  e 134  $\mu\text{m}$ , lo spessore della tunica media fra 45,6  $\mu\text{m}$  e 257,4  $\mu\text{m}$ , in base anche all'età e alle variazioni individuali degli animali analizzati.

Il numero di strati di tessuto muscolare liscio varia invece tra 3 e 7.

Un grande numero di fibre nervose mielinizzate sono facilmente evidenziabili attorno e nel mezzo dei vasi sanguigni (Ghoshal e Khamas, 1984).

In uno studio invece effettuato su campioni di rete mirabile prelevati in corrispondenza del *foramen magnum* e del *foramen mandibolare* nella balena boreale (Pfeiffer e Kinkead, 1990), le reti mirabili hanno mostrato avere una struttura mista, sia venosa sia arteriosa (anche se la componente arteriosa risulta sempre preponderante), con presenza di anastomosi arterovenose.

Così come negli ungulati, i rami arteriosi mostrano una tunica media particolarmente sviluppata ed un sottostante sottile strato di fibre elastiche.

I rami di natura venosa, invece, sono più simili ai rami venosi dei mammiferi terrestri e le loro pareti sono costituite da un esiguo numero di fibre muscolari lisce ed una considerevole quantità di tessuto collagene ed elastico.

Rilevante è stato il ritrovamento di plessi nervosi (gangli) all'interno della tunica media.

## 1.11 Conclusioni

Tutti gli studi e le osservazioni fin qui analizzate suggeriscono che le reti mirabili siano coinvolte nei meccanismi regolatori del calibro e dell'afflusso sanguigno a diversi distretti corporei, attraverso due meccanismi principali:

- la dispersione di calore dall'ambiente più caldo (arterioso) al comparto più freddo (venoso);
- il rallentamento del flusso dovuto alla suddivisione del ramo di immissione arterioso in più arterie (arteriole) di calibro inferiore (aumento della resistenza).

Esistono 4 fattori idrodinamici che possono venir influenzati dall'interposizione al flusso di una rete vascolare: velocità del flusso, pressione del flusso, riserva di sangue e ampiezza della pulsazione (Nagel et al., 1968).

La dispersione del calore, seppur intuibile senza bisogno di dimostrazione, trova legittimazione nella formula:

$$H' = AsC (T_b - T_a)$$

Dove H' sta per "conductive heat loss", As è la superficie attraverso cui il calore viene ceduto, C la conduttanza termica del corpo, Tb la temperature corporea e Ta quella ambientale.

Nel nostro caso As è rappresentata dalla rete arteriosa (infatti più si ramifica la componente arteriosa, più aumenta la superficie di scambio), C è costante dato che lo scambio avviene all'interno del corpo, Tb è da considerarsi come la temperatura del sangue arterioso e Ta come quella del sangue venoso.

Con l'aumentare della superficie e della differenza di temperatura, la cessione di calore aumenta.

La seconda considerazione è anch'essa facilmente dimostrabile attraverso 3 semplici passaggi:

1. Secondo la legge di Darcy, il flusso sanguigno si muove secondo gradiente pressorio (cioè da un comparto a pressione maggiore verso uno a pressione minore) ed è inversamente proporzionale alla resistenza vasale (se aumenta la resistenza, il flusso diminuisce).

$$Q = \frac{\text{Differenza di pressione } (\Delta P)}{\text{Resistenza (R)}}$$

2. La resistenza vasale è anch'essa quantificabile come

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

(con  $\eta$  viscosità del sangue)

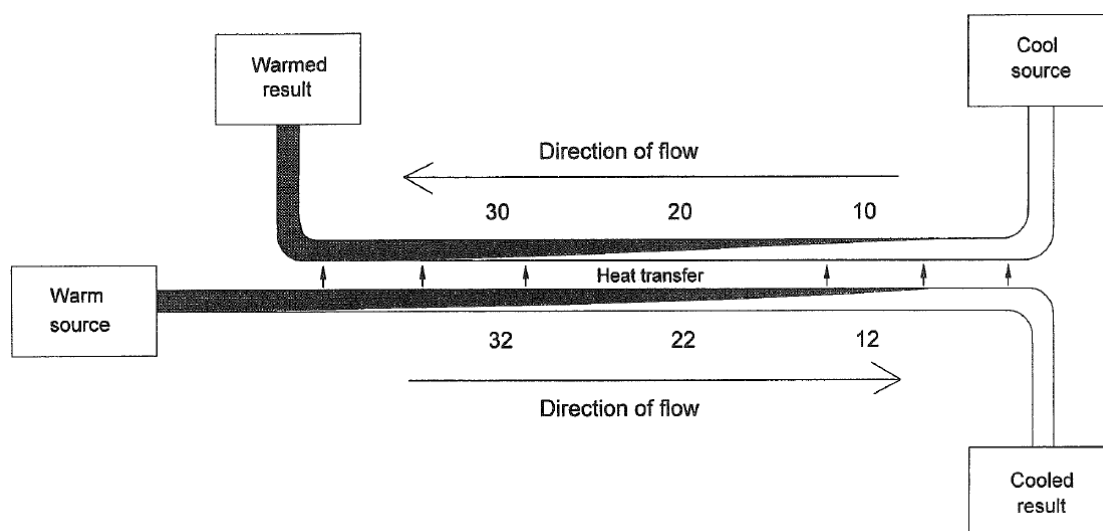
3. Dalle due precedenti, sostituendo R, si ottiene la Legge di Poiseuille:

$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \eta L}$$

Se ne deduce come, a pressione arteriosa in ingresso costante, variazioni della lunghezza e soprattutto del raggio dei vasi influenzino enormemente il flusso: più si restringe il lume e più aumenta la lunghezza, più il flusso sanguigno diminuisce.

Il rallentamento a sua volta è funzionale ad aumentare il tempo di esposizione reciproca dei due ambienti, attraverso il contatto tra le pareti vascolari.

Essendo il sangue arterioso più caldo, il contatto relativamente prolungato con le pareti delle ampie lacune dei seni meningei, contenenti sangue venoso più freddo, contribuiscono al raffreddamento del sangue diretto all'encefalo.

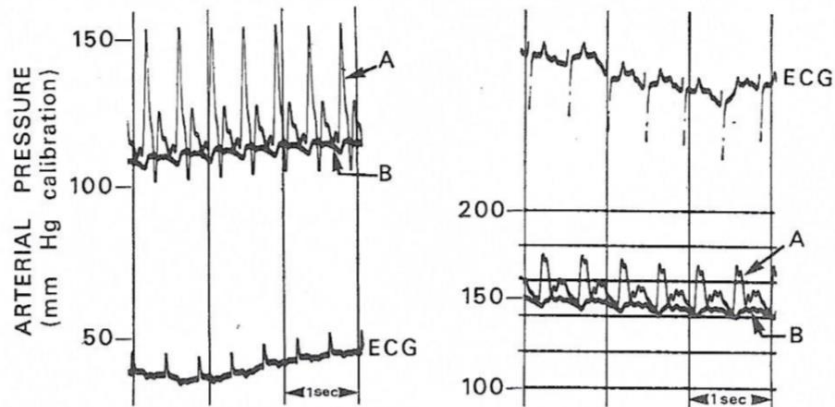


**Figura 22** Rappresentazione grafico del principio dello scambio di calore contro-corrente (Reynolds e Rommel, 1999).

Bisogna inoltre considerare che la suddivisione in più vasi, spesso seguita da una riunificazione dei vasi arteriosi in fuoriuscita dai seni venosi, ha un effetto generale di *buffer* pressorio (dimostrato nella capra da Lluch et al., 1985), ovvero di regolazione della pressione arteriosa nei vasi diretti al cervello e in particolare ai derivati prosencefalici.

Tale considerazione viene avvalorata dalla natura delle pareti vasali, costituite principalmente da tessuto muscolare liscio, che suggeriscono una più o meno diretta regolazione del flusso ematico attraverso restringimento e dilatazione del calibro vasale (con conseguente modifica della resistenza).

La sua funzione di smorzamento pressorio è stata dimostrata attraverso la cateterizzazione dell'aorta attraverso l'arteria carotide esterna (Nagel et al., 1968), che ha permesso di vedere come la pressione di tipo pulsatile caratteristica dei vasi afferenti alla rete, venga da essa convertita in una pressione di tipo non-pulsatile (Figura 23).

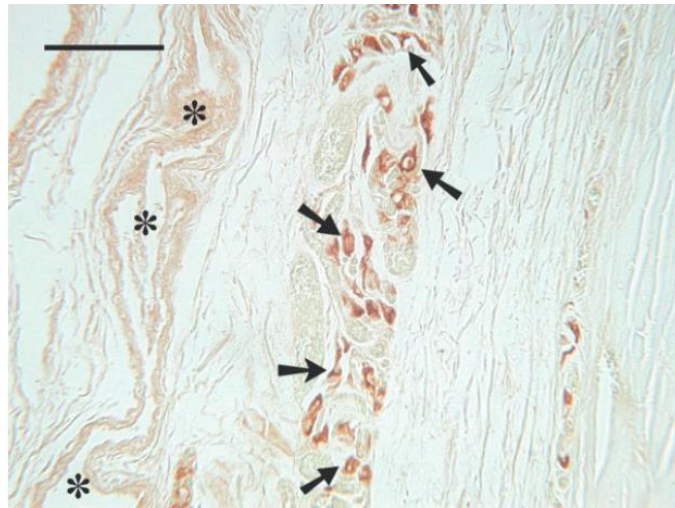


**Figura 23** Tracciato della pressione arteriosa misurato a livello di arteria afferente (aorta) ed efferente (a. spinale meningea); il tracciato elettrocardiografico è anch'esso riportato. A livello dell'aorta (A) è possibile vedere un'alta pressione di tipo pulsatile (30-50 mmHg), mentre a livello di arteria spinale meningea (B) la pressione delle pulsazioni raggiunge solo 5-6 mmHg (Nagel et al., 1968).

Non è al momento noto se tale tipo di regolazione possa essere di tipo attivo o passivo: Cozzi et al., in uno studio del 2005, hanno evidenziato neuroni positivi alla caratterizzazione immunostochimica con anticorpi anti-NOS, lungo lo strato endoteliale delle lacune poste a livello della sottomucosa tracheale (neuroni quindi appartenenti ad un ganglio intramurale sotto controllo parasimpatico) nella stenella striata (*Stenella coeruleoalba*), come si vede in Figura 24:

Un meccanismo simile, quindi attivo e sotto controllo di impulsi nervosi, è ipotizzabile anche per le reti mirabili, tuttavia non è noto se esso possa essere di tipo parasimpatico, come nel caso delle lacune sottomucosali della trachea, o di tipo simpatico: tale vuoto può essere colmato solamente dalla ripetizione dell'analisi immunostochimica su sezioni di rete mirabile.





**Figura 24** Le frecce nere indicano i neuroni contenenti ossido nitrico a livello di sottomucosa della trachea. Gli asterischi indicano invece le lacune vascolari (Cozzi et al., 2005).



## 2. SCOPO

Lo scopo di questa tesi è quello di indagare la struttura e le funzioni delle reti mirabili in generale, ma in particolare di quelle encefaliche e toraco-vertebrali, attraverso un approccio multidisciplinare, così da ottenerne una visione quanto più possibile completa e di porre le basi per ulteriori studi in un futuro quanto più prossimo.

Dati i presupposti, lo studio si articolerà nelle seguenti fasi:

- indagine morfologica microscopica attraverso l'analisi al microscopio ottico di sezioni colorate con ematossilina-eosina e calcolo dei volumi attraverso programmi d'immagine;
- indagine microscopica-funzionale attraverso reazioni di immunoistochimica specifiche per i tessuti del sistema nervoso (anticorpi anti-NOS);
- strutturazione di un bilancio di tipo emo-dinamico per lo studio della fisiologia dell'immersione.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 *Animali e organi campionati*

Nel corso del presente studio sono stati utilizzati i tessuti acquisiti da 10 animali appartenenti a 4 diverse specie: *Tursiops truncatus* (6 esemplari), *Grampus griseus* (2 esemplari), *Ziphius cavirostris* (1 esemplare) e *Stenella coeruleoalba* (1 esemplare).

Seguono le schede dettagliate per i tursiopi sui quali è stata improntata la maggior parte dello studio, per maggiori dettagli sugli altri esemplari si veda il capitolo “Allegati”.

#### **ID 196**

Soggetto: Tursiope (*Tursiops truncatus*), M, adulto, cm 300, kg 219.

Località: Cervia (RA)

Data prima segnalazione: 15.05.11

Evento: spiaggiamento.

Stato di conservazione: fresco

Note: l'intero midollo spinale è stato asportato e conservato in formalina; nel corso di questa tesi si è provveduto a ridurre il tessuto e ad includerlo in paraffina (foto).



**Figura 25** Midollo completo di ID 196.



**Figura 26** Campionamento sezioni toracica (craniale e caudale), lombare e della *cauda equina* di ID 196.

### **ID 319**

Soggetto: Tursiope (*Tursiops truncatus*), M, adulto, cm 310ca., kg /

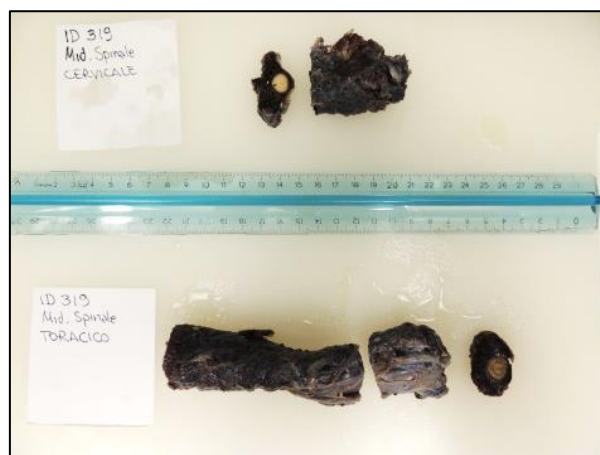
Località: Goro (FE)

Data prima segnalazione: 0.6.05.14

Evento: /

Stato di conservazione: buono.

Note: l'intero midollo spinale è stato asportato e conservato in formalina; nel corso di questa tesi si è provveduto a ridurre il tessuto e ad includerlo in paraffina (foto).



**Figura 27** Campionamento sezioni cervicale e toracica di ID 319.



**Figura 28** Campionamento sezioni lombare e della *cauda equina* di ID 319.

### **ID 344**

Soggetto: Tursiope (*Tursiops truncatus*), M, giovane?, cm 195, kg 98,5.

Località: Muggia (TS)

Data prima segnalazione: 02.02.15

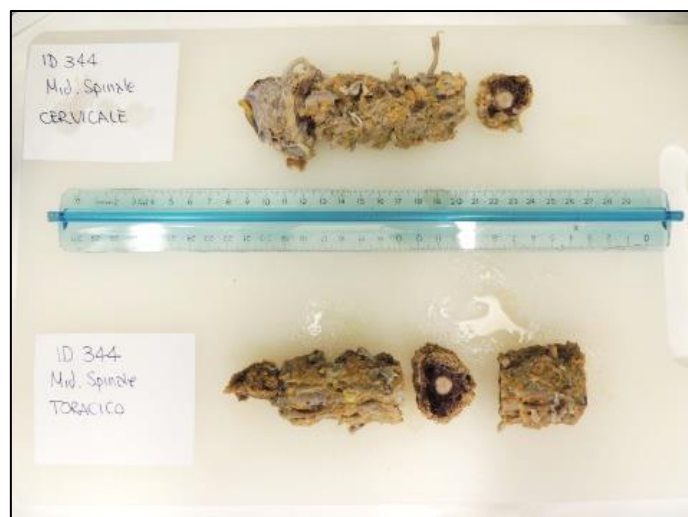
Evento: /

Stato di conservazione: buono

Note: l'intero midollo spinale è stato asportato e conservato in formalina; nel corso di questa tesi si è provveduto a ridurre il tessuto e ad includerlo in paraffina (foto).



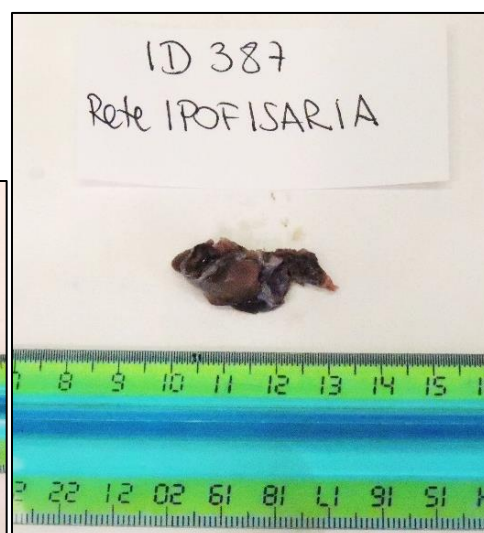
**Figura 29** Campionamento sezioni cervicale e toracica di ID 344.



**Figura 30** Campionamento sezioni lombare e della *cauda equina* di ID 344.



**Figura 31** Rete mirabile toracica di ID 387.



**Figura 32** Rete mirabile ipofisaria di ID 387.

## **ID 195**

Soggetto: Tursiope (*Tursiops truncatus*), M, età ignota, cm 270, kg /.

Località: Isola del Bacan (VE)

Data prima segnalazione: 23.03.11

Evento: esemplare rinvenuto sulla costa

Stato di conservazione: mummificato

Note: utilizzata solamente la colonna vertebrale, per le foto si veda il paragrafo relativo al calcolo dei volumi.



**ID 192**

Soggetto: Tursiope (*Tursiops truncatus*), F, età ignota, cm 240, kg 178,5.

Località: Rosolina (RO)

Data prima segnalazione: 08.09.10

Evento: /

Stato di conservazione: /

Note: utilizzata solamente la colonna vertebrale, per le foto si veda il paragrafo relativo al calcolo dei volumi.

**ID 202**

Soggetto: Tursiope (*Tursiops truncatus*), F, età ignota, cm 264, kg /.

Località: Cesenatico (FC)

Data prima segnalazione: 06.07.11

Evento: cattura in rete volante

Stato di conservazione: fresco

Note: l'esemplare è stato in tempi precedenti congelato e sezionato in fette di circa 4 cm per la sua intera lunghezza, per le foto si veda il paragrafo relativo al calcolo dei volumi.

**3.2 Preparazione dei campioni: fissaggio, inclusione, taglio**

Al momento della necropsia, dagli animali descritti nel precedente paragrafo sono stati prelevati da diverse sedi dei campioni di rete mirabile, i quali sono stati posti in formalina (aldeide formica al 4%) così da permetterne la conservazione e ritardarne il deterioramento.

L'aldeide formica è il principale fissativo impiegato per la conservazione dei preparati biologici in laboratorio, dato che ne preserva la morfologia attraverso la formazione di legami idrogeno e covalenti con gli amminoacidi del tessuto.

In questo modo vengono rallentati i processi autolitici, si evita la precipitazione degli acidi nucleici e i fosfolipidi vengono resi insolubili nei solventi lipofili.

Dopo una settimana, una volta avvenuta la fissazione, i campioni sono stati ridotti in parti minori al fine di selezionarne l'area di maggior interesse e permettere il loro inserimento in biocassette di adeguato spessore.

Le biocassette sono poi state lasciate riposare in acqua corrente per 12-18 ore così da eliminare la formalina in eccesso, infine i campioni sono stati processati (disidratati con scala ascendente di alcoli e xiloli) tramite processatore automatico ed inclusi in paraffina.

Ogni campione è stato poi appoggiato in un contenitore metallico di adeguate dimensioni e ricoperto da paraffina liquida in volume tale da riempire il contenitore, al di sopra della paraffina è stata appoggiata la base della biocassetta riportante l'identificazione del campione.

Dopo un adeguato raffreddamento su superficie refrigerante è stato possibile estrarre il blocchetto di paraffina solida contenente il tessuto in esame.

Il taglio è stato eseguito per mezzo di un microtomo, previo raffreddamento dei blocchetti in criostato, ad uno spessore variabile dai 5 ai 9  $\mu\text{m}$ , in base alle caratteristiche di taglio dei singoli blocchetti.

Le sezioni ottenute, dopo essere state poste in acqua fredda, sono state lasciate per circa un minuto in un bagnetto di acqua a circa 38°C, così da permetterne la distensione, per poi essere montate su vetrini porta-oggetto del tipo tespato (per le indagini istologiche) e super frost (per le analisi immunoistochimiche).

I vetrini sono stati fatti asciugare per circa un'ora su piastra riscaldata a 38°C e poi per 24 ore a temperatura ambiente.

### ***3.3 Analisi Istologiche ed Immunoistochimiche***

#### ***3.3.a Ematossilina-Eosina***

Affinché le sezioni di tessuto venissero a contatto con le diverse soluzioni in maniera omogenea, i vetrini porta-oggetto sono stati posizionati in una rastrellino porta-vetrini, equidistanti gli uni dagli altri.

Sono stati quindi posti in xiloli e scala decrescente di alcoli, in modo da rimuovere la paraffina (la cosiddetta "sparaffinatura") e, dopo essere stati sciacquati in acqua distillata, sono stati immersi per 8 minuti in ematossilina di Harris.

L'ematossilina è un colorante basico, quindi affine alle sostanze basofile (acide) presenti nelle cellule, e per questo va a fissarsi ai nuclei cellulari (ricchi di acidi nucleici) conferendo loro una colorazione tendente al blu.

Trascorsi gli 8 minuti, i vetrini sono stati sciacquati in acqua di fonte ed immersi in alcool acidulato 11% per alcuni secondi, in modo da eliminare l'eccesso di ematossilina e rendere il vetrino più leggibile al microscopio ottico.

Dopo ulteriore sciacquo, sono stati immersi per 30-40 secondi in eosina.

L'eosina è un colorante a carattere acido che va a fissare le sostanze acidofile (basiche) presenti nelle cellule, conferendo al citoplasma un colore tendente al rosa.

Dopo un passaggio in scala ascendente di alcoli e xiloli, sui vetrini è stata posta una goccia di balsamo su cui è stato velocemente appoggiato, facendo attenzione a non creare bolle d'aria, un vetrino copri-oggetto.

Sono poi stati lasciati ad asciugare sotto cappa aspirante per una notte.

Per una descrizione dettagliata del protocollo, si rimanda al capitolo “Allegati”:

### **3.3.b Immunoistochimica**

L'analisi immunoistochimica è un mezzo di ricerca basato sul principio della coniugazione tra antigene e anticorpo, utilizzato per individuare in maniera precisa gli antigeni presenti nelle sezioni di tessuto, rendendoli visibili al microscopio ottico mediante sfruttamento di una reazione di tipo enzimatico.

In questo studio il target è costituito dall'ossido nitrico sintasi (NOS), nello specifico quella di origine neuronale.

La tecnica immunoistochimica qui utilizzata sfrutta il complesso Avidina-Biotina-Perossidasi (ABC) ed è basato sull'elevata affinità dell'avidina (glicoproteina dell'albume d'uovo) per la biotina (contenuta invece nel tuorlo).

Questo metodo permette di amplificare il segnale generato dal legame dell'anticorpo primario con i siti antigenici del tessuto, ed è quindi indicato qualora si vogliano ricercare antigeni poco presenti o di alterata immunogenicità a causa della fissazione in formalina (Haines e Chelack, 1991).

Infatti i legami crociati che vanno a crearsi tra il fissativo e le proteine dei tessuti, quando questi vengono conservati in formalina, causano il mascheramento di molti siti antigenici.

Per questo motivo è stato necessario trattare enzimaticamente le sezioni, in modo da liberare i siti di legame, immergendo i vetrini per 30 minuti in una soluzione di tripsina a 37°C (il cosiddetto “smascheramento dell'antigene”).

I vetrini poi sono stati sottoposti all'inattivazione delle perossidasi endogene, così da eliminare eventuali reazioni indesiderate tra queste ultime e il sistema di rilevazione enzimatica del legame antigene-anticorpo: in questo modo è stata eliminata la possibilità di avere un “segnale di fondo” e si è reso il vetrino più leggibile.

Dopo aver incubato i vetrini *overnight* in una soluzione contenente l'anticorpo primario anti-NOS, dato che il solo complesso antigene-anticorpo non risulta visibile al microscopio ottico, i vetrini sono stati messi in contatto con un anticorpo secondario biotinilato, specifico per l'anticorpo primario, e dopo un'ora ad esso è stato fatto coniugare il complesso Avidina-Biotina-Perossidasi.

In questo modo si è sfruttata l'affinità di legame dell'avidina per la biotina, ottenendo la formazione di complessi proteici dotati di attività enzimatica legati ai siti antigenici attraverso gli anticorpi.

Il complesso proteico è stato poi evidenziato attraverso l'utilizzo di un cromogeno, il Diaminobenzidinatetraidrocloreuro o DAB, solubile nella sua forma ridotta.

Con la reazione catalizzata dalla perossidasi, la DAB assume la sua forma ossidata andando a formare dei precipitati insolubili che conferiscono al sito di reazione una colorazione marrone, osservabile al microscopio ottico.

Per una descrizione dettagliata del protocollo, si rimanda al capitolo "Allegati":

### ***3.4 Acquisizione immagini***

Le immagini dei vetrini colorati con ematossilina-eosina delle sezioni cervicale, toracica e lombare dei midolli degli animali ID 196, ID 319 e ID 344 sono state acquisite con il microscopio D-Sight (Menarini group, Firenze, IT), un microscopio digitale automatico che permette l'acquisizione di immagini di alta qualità e una loro analisi computerizzata per mezzo del programma D-Sight Viewer (Menarini group, Firenze, IT).

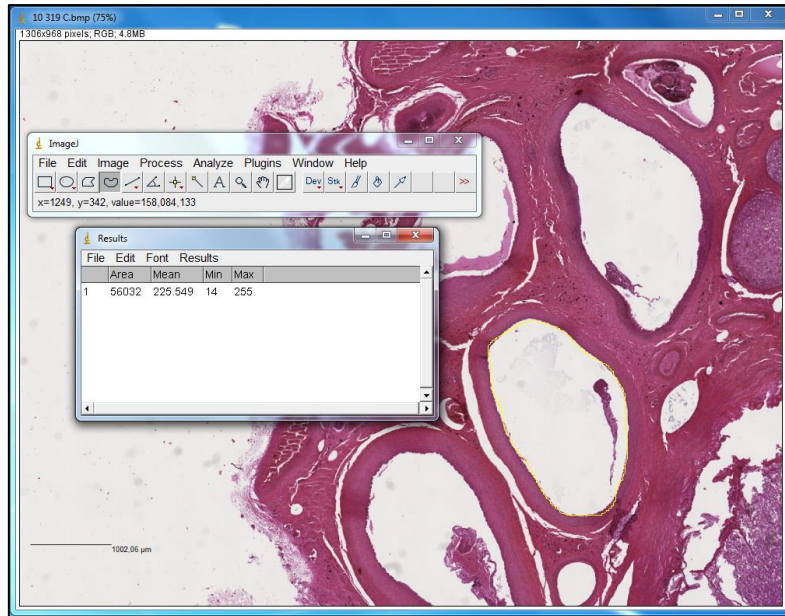
Il campionamento è stato effettuato ad ingrandimento 20x.



**Figura 33** Microscopio digitale D-Sight.

### 3.5 Analisi delle immagini

Sono stati utilizzati i programmi D-Sight Viewer ed ImageJ (Figura 34), un altro programma informatico per la digitalizzazione delle immagini, sviluppato dalla National Institutes of Health (U.S.A.).



**Figura 34** Analisi delle immagini attraverso il programma Image J.

Per ogni vetrino dei 9 totali è stata misurata l'area di ogni singolo vaso, in modo da ottenere una sommatoria di aree da rapportare alla superficie totale della fetta di tessuto presente sul vetrino.

In questo modo è stato possibile ricavare la percentuale di superficie occupata dai vasi della rete mirabile (e quindi dalla rete stessa) per ogni vetrino, il che ha permesso di approssimare la superficie percentuale media della rete mirabile midollare.

Una volta ottenute le superfici percentuali medie per ogni tratto della colonna vertebrale, le sezioni cervicale e toracica sono state unite e considerate come una sola sezione, in modo da semplificare i calcoli successivi.

I dati ottenuti sono riportati in Tabella 3.

Esemplare	Aree rete mirabile ( $\mu\text{m}^2$ )	Aree vetrino ( $\mu\text{m}^2$ )	Aree vetrino (-) midollo ( $\mu\text{m}^2$ )	%	C+T (%)
ID 196 C	87068274,62	331268730	244567140,3	35,6	29,8
ID 196 T	72638168,05	408739626	301970875,4	24,1	
ID 196 L	8424940	144603961,3	/	5,8	
ID 319 C	84384865	276141674	206367404	40,9	30,8
ID 319 T	58098339	349991899	280957944,3	20,7	
ID 319 L	21667933	222799206	/	9,7	
ID 344 C	58375800	264532091	184178100	31,7	29,9
ID 344 T	75689874	269531158,5	/	28,1	
ID 344 L	11940804	151158571,6	/	7,9	

**Tabella 3** Calcolo della percentuale di superficie occupata dalla rete mirabile per ogni vetrino. L'area di ogni rete è stata messa in proporzione con l'area del vetrino occupata dal preparato, tolto il midollo spinale (nei preparati lombari e da *cauda equina* il midollo non è presente). Tale proporzione è stata espressa in percentuale.

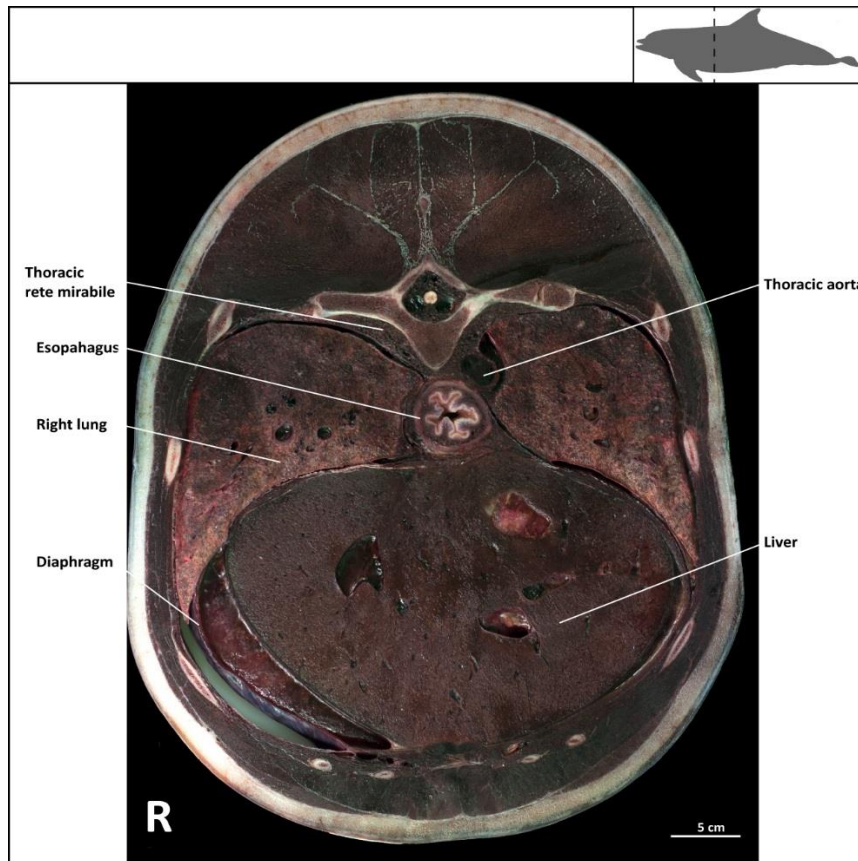
### 3.6 Calcolo dei volumi

Non essendo disponibili gli scheletri degli animali a cui i campioni di rete mirabile midollare appartengono, è stato necessario effettuare alcune misurazioni su esemplari diversi.

Per la misurazione della lunghezza e del volume della colonna vertebrale di un tursiope medio, sono stati quindi impiegati gli esemplari ID 202, ID 192 e ID 195.

ID 202 (Figura 35) è stato, in tempi precedenti, congelato e sezionato in fette di circa 4 cm per la sua intera lunghezza ed ogni sezione è stata fotografata ed archiviata.

Per mezzo quindi del programma ImageJ, il volume e la lunghezza della sua colonna vertebrale sono stati ricavati per approssimazione attraverso l'analisi dei fotogrammi delle sezioni complete.



**Figura 35** Sezione trasversale del tursiope ID 202.

Conoscendo il numero di sezioni in cui è stato diviso l'animale, è stata ricavata la lunghezza del canale vertebrale (52 frames di 4 cm ciascuno), mentre la superficie in sezione trasversale (tramite programma ImageJ) è stata ottenuta dalla media di 6 diverse superfici in 6 diversi punti (vertebre) dell'animale.

La lunghezza ricavata è stata poi corretta tenendo conto della perdita di tessuto causata dal seghetto utilizzato per il taglio delle fette.

In un secondo momento si è provveduto al calcolo dei volumi anche di 2 colonne vertebrali facenti parte della Banca Tessuti ed appartenenti ai tursiopi ID 192 e ID 195: i due scheletri sono stati ricomposti (Figura 36) e si è misurata la loro lunghezza totale, mentre per ottenere il volume del canale si è misurata la superficie interna di un numero campionario di vertebre (due per ogni tratto della colonna: cervicale, toracico e lombare), sempre attraverso il programma ImageJ.



**Figura 36** Colonna vertebrale completa di ID 192.



**Figura 37** Vertebre toraciche di ID 195.

Attraverso lo sviluppo di un foglio di calcolo Excel, è stato ottenuto il volume interno medio del canale vertebrale dalla media dei tre animali (ID 202, ID 195 e ID 192), il quale è stato poi suddiviso in sezione cervico-toracica e lombare, in modo da semplificare i calcoli successivi.

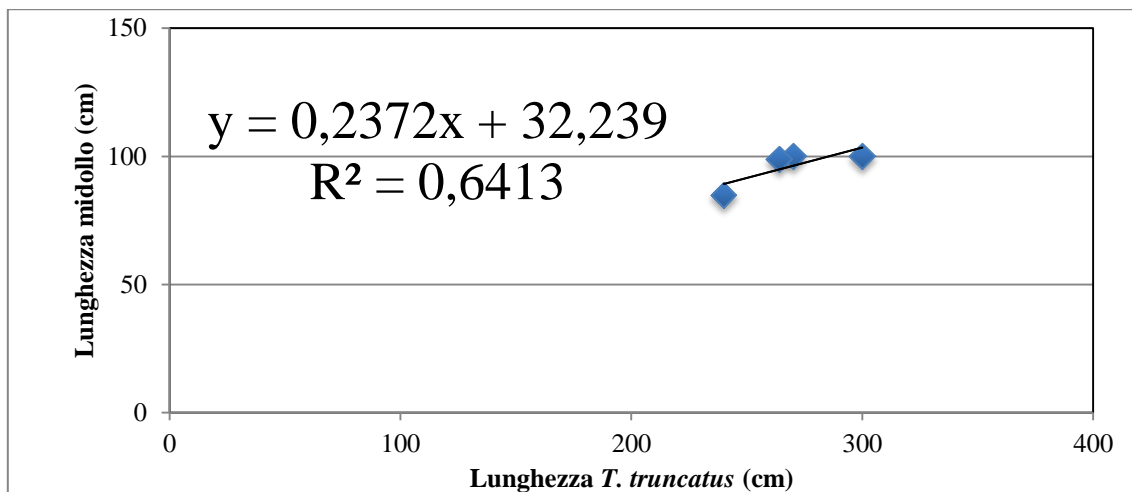
L'area della porzione cervico-toracica è stata rapportata alla superficie percentuale media delle reti mirabili cervicali e toraciche ottenuta in precedenza, ovvero 29,8 % per il tursiope ID 196, e l'area della porzione lombare è stata rapportata alla superficie percentuale media della rete mirabile lombare e della *cauda equina*, quindi 5,8 % per ID 196 (Tabella 3).

In questo modo è stato possibile ricavare, sommando i risultati, il volume di sangue che la rete midollare può contenere all'interno del canale vertebrale.

Il valore risultante è stato successivamente corretto sottraendo il volume del midollo stesso: l'area media di una sezione midollare dei soggetti ID 196, ID 319 e ID 344 è stata misurata e poi moltiplicata per le lunghezze dei midolli, in questo modo si è ottenuto un valore più accurato.

Per la misura della lunghezza midollare, essa è stata assimilata alla lunghezza del canale osseo vertebrale fino alla prima vertebra caudale ed è stato quindi possibile stabilire una correlazione anche tra la lunghezza dell'animale in vivo (dati provenienti dalla Banca Tessuti) e la lunghezza del midollo spinale (Figura 38): ne risulta che la lunghezza midollare è circa i 2/3 della lunghezza dell'animale.





**Figura 38** Rapporto tra lunghezza del tursiope e lunghezza del midollo spinale.

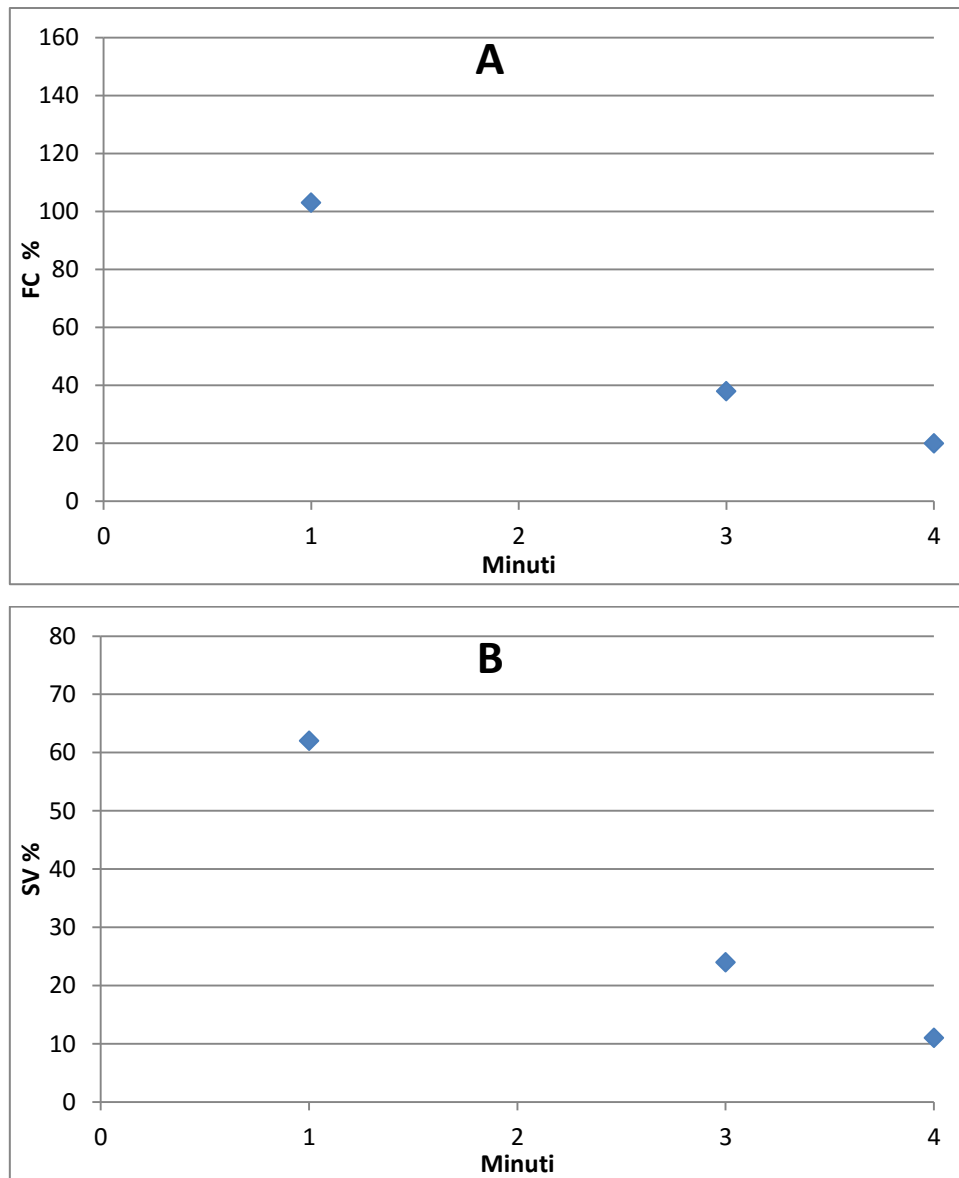
### ***3.7 Elaborazione del foglio di calcolo Excel***

Per l'elaborazione di un bilancio di tipo emo-dinamico, ovvero una simulazione della distribuzione del sangue all'interno dell'organismo *Tursiops truncatus*, si è proceduto come prima cosa ad un'accurata ricerca bibliografica per poi strutturare il lavoro in tre passaggi:

- I. Calcolo della correlazione tra frequenza cardiaca e *stroke volume* (ovvero l'eiezione cardiaca ad ogni battito) in funzione del tempo;
- II. Simulazione delle condizioni fisiologiche in superficie, nella fase di pre-immersione;
- III. Simulazione delle condizioni fisiologiche e para-fisiologiche in condizioni di immersione e di rallentamento progressivo della frequenza cardiaca.

#### ***3.7.a Correlazione tra frequenza cardiaca e stroke volume***

Miedler et al. nel loro lavoro del 2015 hanno elaborato graficamente la variazione percentuale della frequenza cardiaca (FR %) e dello *stroke volume* (SV%) in un tursiope sotto sforzo a diversi intervalli di tempo ( a 1, 3 e 4 minuti), come si vede in Figura 39.



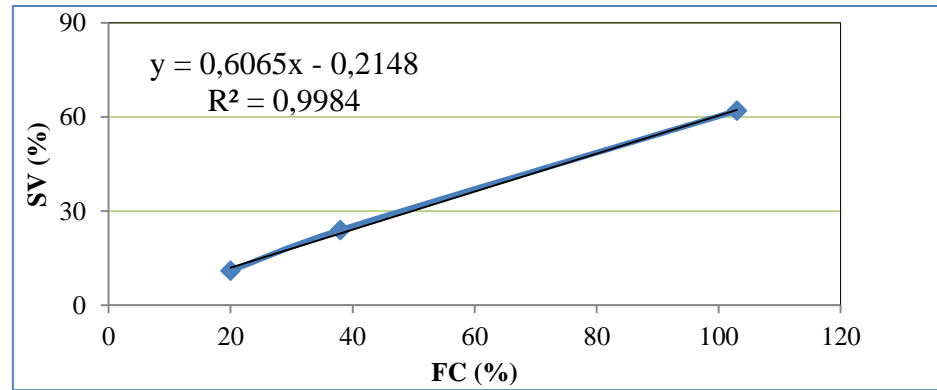
**Figura 39** Cambiamento percentuale di frequenza cardiaca (A) e *stroke volume* (B) in funzione del tempo rielaborati da Miedler et al., 2015.

Si tratta di variazioni percentuali espresse a partire dalla condizione di riposo, che costituisce il punto 0, ovvero un tursiope avente una frequenza cardiaca di 41 bpm e nessun aumento dello *stroke volume*.

Essendo, come si può notare, sia la frequenza cardiaca sia lo *stroke volume* stati espressi come variabili in funzione della stessa unità di misura, ovvero il tempo, è stato possibile correlare le due variazioni e metterle in relazione tra di loro: la loro correlazione viene rappresentata in Tabella 4 ed in Figura 40.

tempo (min)	FC % (X)	SV % (Y)
0	0	0
1	103	62
3	38	24
4	20	11

**Tabella 4**



**Figura 40**

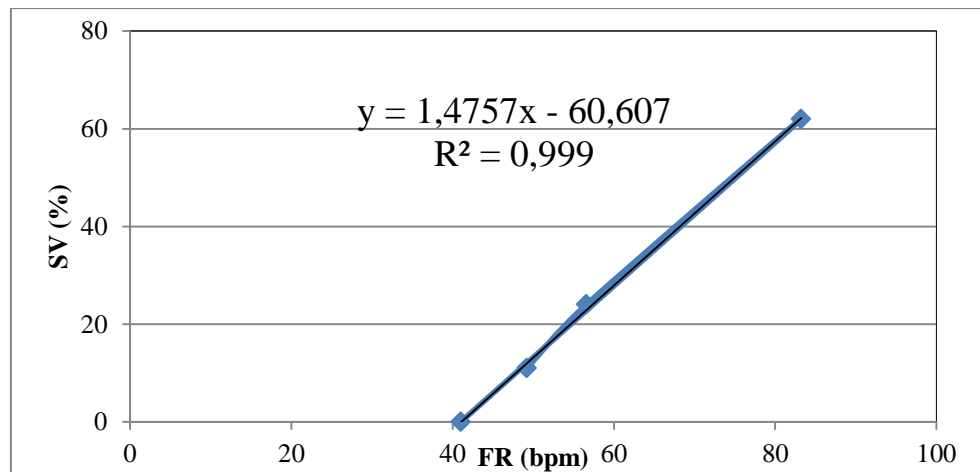
**Tabella 4** Incrementi percentuali di frequenza cardiaca e *stroke volume* in relazione al tempo.  
**Figura 40** Rappresentazione grafica.

Essendo quindi nota la condizione di riposo e gli incrementi percentuali della frequenza cardiaca sotto sforzo, è stato possibile calcolare i valori reali della frequenza cardiaca al variare del tempo, ovvero ai minuti 0, 1, 3 e 4, mentre lo *stroke volume* è stato mantenuto sotto forma di variazione percentuale.

Ciò che si ottiene è quanto visibile in Tabella 5 ed in Figura 41, ovvero una relazione che mantiene l'andamento lineare che già era stato evidenziato in Figura 40, ma che si esprime secondo i valori reali della frequenza cardiaca.

tempo (min)	FR bpm (X)	SV % (Y)
0	41	0
1	83,23	62
3	56,58	24
4	49,2	11

**Tabella 5**



**Figura 41**

**Tabella 5** Frequenze cardiache reali corrispettive di ogni incremento, sono state ottenute aggiungendo alla frequenza a riposo (41 bpm) l'incremento riportato nella seconda colonna della Tabella 1.

**Figura 41** Rappresentazione grafica dell'andamento dello *stroke volume* (in ordinata) in funzione della frequenza cardiaca (in ascissa).

L'equazione di tipo lineare che si ottiene è quella riportata in Figura 41:  $y = 1,4757x - 60,607$  con uno scarto quadratico medio (o deviazione standard) pari a 0,999 (e quindi un buon grado di precisione nelle misurazioni), dove la variabile indipendente "X" rappresenta la frequenza cardiaca, la variabile dipendente "Y" lo *stroke volume*.

Sostituendo all'interno di questa equazione i valori della frequenza cardiaca da 100 bpm a 10 bpm in scala decrescente, otteniamo i valori che vengono riportati in Tabella 6, ovvero la corrispettiva variazione dell'output cardiaco rispetto alla fase 0 di riposo per ogni fase di immersione (durante la quale i battiti diminuiscono).

FC (bpm)	SV (%)
100	86,96
90	72,21
80	57,45
70	42,69
60	27,94
50	13,18
40	-1,58
30	-16,34
20	-31,09
10	-45,85

**Tabella 6** Calcolo dello *stroke volume* (SV) e del volume sanguigno in circolo secondi differenti frequenze cardiache (FC).

In questo modo è stata esplicitata la variazione della gittata cardiaca (che altro non è se non la moltiplicazione dello *stroke volume* per il numero di battiti) a seconda della frequenza cardiaca (quindi della profondità) e dello sforzo compiuto dall'animale; questo ha reso possibile procedere con i due step successivi, ovvero la simulazione del nuoto in superficie e sotto condizioni di immersione.

### 3.7.b Simulazione delle condizioni di superficie e d'immersione

Questa parte del lavoro è stata articolata in due momenti separati, ovvero:

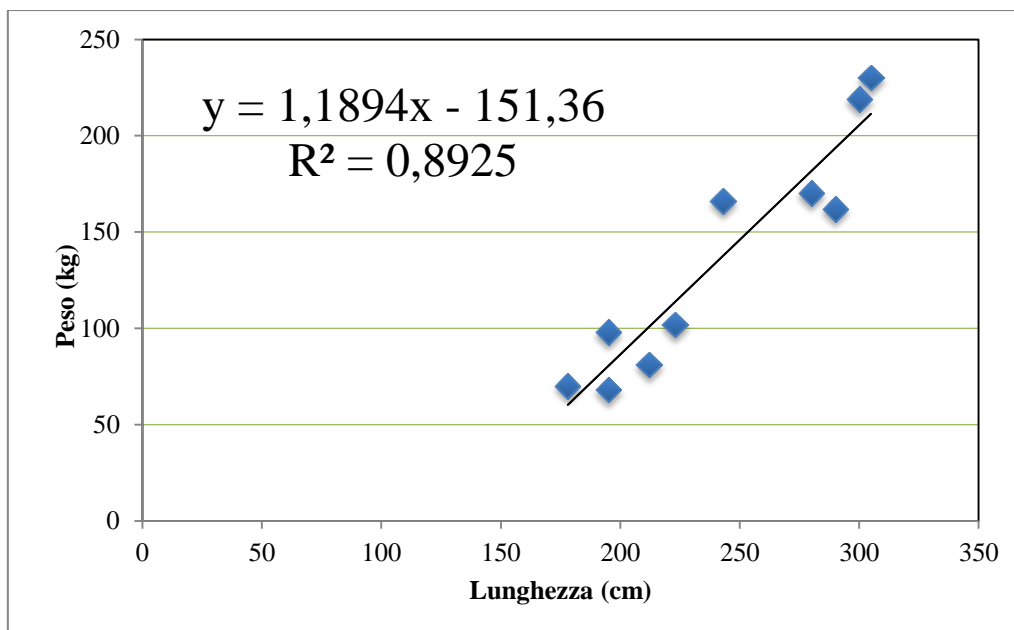
- Calcolo del volume sanguigno circolante all'interno dell'organismo *Tursiops truncatus*;
- Bilancio sanguigno di tale volume di sangue attraverso i compartimenti dell'organismo.

#### Calcolo dei volumi

Scopo di questa prima fase è stato determinare il volume di sangue dell'animale e la sua circolazione per unità di tempo (1 minuto).

Come prima cosa, essendo il dato riguardante il peso del tursiope ID 319 non presente nella documentazione della Banca Tessuti, esso è stato desunto stabilendo una correlazione tra peso e lunghezza corporea di altri 10 tursiopi, la cui documentazione era invece completa, compresi ID 196 ed ID 344.

L'equazione ottenuta, visibile in Figura 42, avendo uno scarto quadratico medio di 0,8925, ha mostrato una buona correlazione e pertanto il peso stimato di ID 319 è risultato essere 217 kg.



**Figura 42** Rappresentazione grafica dell'equazione lineare esplicitante il rapporto tra lunghezza (asse X) e peso dell'animale (asse Y) con  $R^2 = 0,8925$ .

Essendo noto che il peso del sangue è calcolabile come il 7,4% del peso corporeo (Reynolds e Rommel, 1999), oppure come 71 ml per chilo di peso (Ridgway e Johnston, 1966 e Ponganis, 2015), per ogni animale (in questo esempio il tursiope ID 319) il volume sanguigno è facilmente ottenibile avendo cura di correggere il dato tenendo conto della densità del sangue rispetto all'acqua, che in questo studio viene considerata come pari a 1,06, ovvero  $1060 \text{ kg/m}^3$  (Cutnell e Johnson, 1998).

Una volta calcolato il quantitativo di sangue che l'organismo tursiope alloggia al proprio interno, si è passati al calcolo della gittata cardiaca (l/min), ovvero quanto sangue viene fatto circolare dalla pompa cardiaca all'interno dell'organismo ad ogni minuto.

Ci si è basati sui dati forniti sempre da Miedler et al. (2015), i quali hanno calcolato come lo *stroke volume*, in un animale a riposo, sia pari a  $0,788 \pm 0,135$  ml per ogni kg di peso corporeo.

Correggendo tale dato con quanto riportato in Tabella 6, ovvero conteggiando la percentuale di incremento dello *stroke volume* in condizioni di sforzo data una frequenza cardiaca di 100 bpm (quindi +87%), si ottengono i litri circolanti nell'animale ad ogni minuto (Equazione 1).

$$\text{Volume circolante/min} = (\text{stroke volume a riposo} + \text{incremento \% SV}) * \text{FC}$$

#### Equazione 1

Che, applicata ad una condizione di nuoto superficiale, diventa quindi:

$$\begin{aligned} \text{Volume circolante/min} &= 0,788 \text{ ml/kg} + (0,788 \text{ ml/kg} * 0,87) * 100 \\ \text{Volume Circolante (ID 319)/min} &= 31,98 \text{ l/min} \end{aligned}$$

Si è anche provveduto al calcolo del rapporto tra la gittata cardiaca, alla frequenza cardiaca data, ed i litri di sangue di cui è composto l'animale preso in considerazione, il quale chiaramente rimane invariato a prescindere dalle condizioni esterne.

Se il rapporto risultasse essere maggiore ad 1, questo implicherebbe che l'animale fa circolare più di una volta il proprio volume di sangue per unità di tempo, mentre se risultasse inferiore ad 1 significherebbe che l'animale movimentata solo una frazione del proprio sangue.

Se il rapporto fosse uguale a 1, vorrebbe dire che l'animale movimentata una volta il proprio volume sanguigno per ogni minuto.

Come si evince dall'Equazione 1, i prerequisiti sui quali si regge tutto il lavoro di bilancio sono quindi il peso dell'animale (che permette, per ogni individuo, di calcolarne gittata cardiaca e volume sanguigno) e la frequenza cardiaca unitamente alla percentuale di incremento dello *stroke volume* (che permettono di simulare le condizioni di immersione).

## Bilancio sanguigno

Una volta stabiliti i volumi si è proceduto, attraverso un'accurata ricerca bibliografica, con lo stabilire come essi si distribuiscano all'interno di un animale in fase di nuoto superficiale, ovvero nel momento di pre-immersione.

Mantenendo sempre l'unità di tempo costante (quindi 1 minuto), la perfusione è stata suddivisa tra i vari distretti corporei secondo la perfusione minima; laddove non siano stati rinvenuti dati sui tursiopi o quantomeno sui cetacei, si è fatto riferimento a dati di fisiologia umana.

I comparti per i quali è stato possibile stabilire la perfusione minima sono: encefalo, tratto gastrointestinale, fegato, cuore, polmone, rene, scheletro, blubber e cute, muscolo.

A questi comparti è stata aggiunta una ulteriore possibilità di allocamento, ovvero le reti mirabili, che nell'equazione di bilancio idrodinamico che si è venuta a delineare costituiscono quindi una quota incognita.

L'equazione, che descrive il flusso sanguigno per unità di tempo in un animale in superficie, noti peso e/o lunghezza, è la seguente:

Volume circolante =	Encefalo
	Apparato Digerente
	Fegato
	Cuore
	Polmone
	Rene
	Apparato Scheletrico
	Blubber + cute
	Apparato Muscolare
	<b>Reti Mirabili</b>

In questo modo ci si propone di andare ad indagare la distribuzione dei volumi in un animale non in immersione e di valutare eventuali deficit od eccessi di sangue circolante.

I dati fisiologici utilizzati e le loro fonti sono riportati in Tabella 7.

Frequenza cardiaca	100 bpm		Bibliografia
Stroke volume	0,788 ml/kg + 62%		Miedler et al., 2015
Organo	% peso corporeo	ml/100g	
Sangue	7,4		Reynolds e Rommel, 1999; Ridgway e Johnston, 1966
Encefalo	1750 g * <sup>1</sup>	50	Cozzi (unpublished); Hall, 2010
Cuore	0,93	70	Slijper, 1979; Hall, 2010
Polmoni* <sup>2</sup>	3,5	25	Slijper, 1979; Hall, 2010
Rene	1,1	360	Slijper, 1979; Hall, 2010
Fegato	2,2	30	Slijper, 1979; Klinke et al., 2012
Tratto gastro-intestinale	3,36	70	Slijper, 1979; Tomilin, 1967; Klinke et al., 2012
Scheletro	16	3	Slijper, 1979; Hall, 2010
Muscolo	36	14,9 ± 4,9 * <sup>3</sup>	Ponganis, 2015; Jobsis et al., 2001
Blubber+cute	30,9	3	Tomilin, 1967; Hall, 2010

**Tabella 7** Parametri base in un tursiope durante la fase di nuoto superficiale, i valori sono stati calcolati a partire da dati bibliografici.

\*<sup>1</sup> per l'encefalo il dato viene considerato come una media unitaria per i Tursiopi adulti.

\*<sup>2</sup> il dato si riferisce sempre al circolo bronchiale.

\*<sup>3</sup> dato derivante da studi sulla foca comune (*Phoca vitulina*) (Jobsis et al., 2001).

Il calcolo del peso dell'intestino ha richiesto una serie particolare di passaggi: essendo nota la sua lunghezza, dopo il decesso dell'animale, espressa come percentuale rispetto alla lunghezza corporea (tenendo però conto del rilassamento post-mortale della muscolatura liscia intestinale, il quale causa un allungamento del tratto di circa il 200-300%) sia per il capodoglio sia per il tursiope (Slijper, 1979) ed essendo note le lunghezze corporee media delle due specie, ma essendo noto il peso del pacchetto intestinale solamente nel capodoglio (Tomilin, 1967), è stato possibile impostare una proporzione che ha permesso di esprimere il peso del pacchetto intestinale del tursiope come percentuale rispetto alla lunghezza corporea.

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

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

Questa rappresenta la nostra situazione iniziale, o momento zero, in totale assenza del riflesso d'immersione.



Lo step successivo è stato simulare come il sangue venga ridistribuito in condizioni di immersione, quindi in presenza del *diving reflex*.

Si è scelto di articolare il processo di immersione, basandosi sempre sull'Equazione 1, attraverso diminuzioni progressive della frequenza cardiaca da 100 bpm a 10 bpm, riducendola ad ogni step di 10 bpm, andando anche ad adattare per ogni fase l'aumento (o la diminuzione) percentuale di *stroke volume* così come riportato in Tabella 6.

Le variazioni per ogni step d'immersione sono riportate in Tabella 8.

FC	SV a riposo (ml/kg)	Incremento SV (%)	Volume circolante (l/min)
100	0,788 * peso corporeo	86,96	31,98
90		72,21	26,50
80		57,45	21,55
70		42,69	17,08
60		27,94	13,13
50		13,18	9,68
40		-1,58	6,73
30		-16,34	4,29
20		-31,09	2,36
10		-45,85	0,93

**Tabella 8** Variazioni della gittata cardiaca per step d'immersione, il tursiope considerato è il soggetto ID 319.



## 4. RISULTATI

### 4.1 *Analisi istologica: anatomia microscopica delle reti mirabili*

Le reti mirabili in sezione trasversale hanno riportato una predominanza di vasi di tipo arterioso, dello spessore medio di 200  $\mu\text{m}$ , alcuni dei quali (soprattutto nel tursiope ID 319) circondati da tessuto adiposo, con la presenza in minor numero di vasi di tipo venoso disposti lungo quelli arteriosi principali.

Tali arterie sono di tipo principalmente muscolare, tuttavia un terzo della loro parete mostra di essere di tipo elastico.

Ciò si mostra in accordo con quanto descritto da Lillie et al. (2013), ma non essendo stata usata una colorazione specifica per le fibre di tipo elastico, non si sono potute evidenziare tutte le strutture da loro descritte.

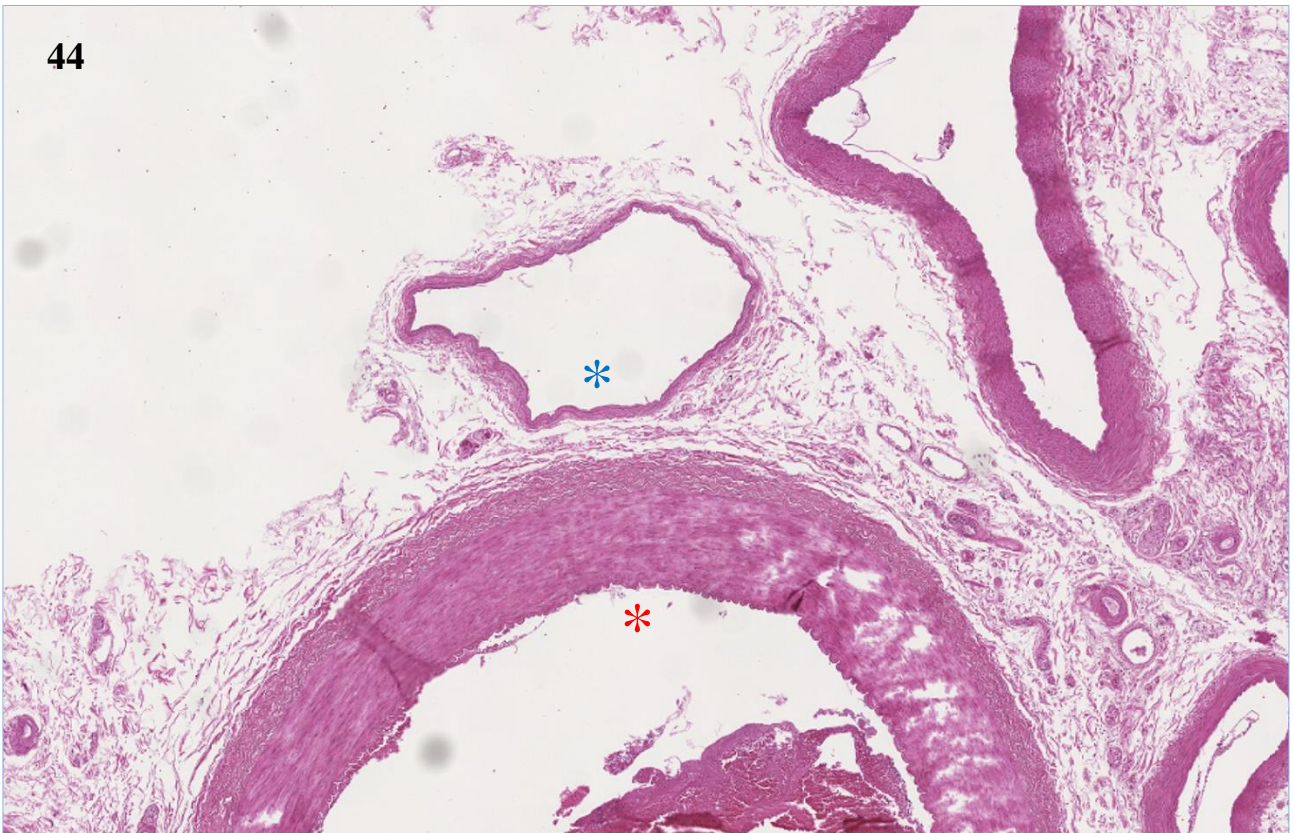
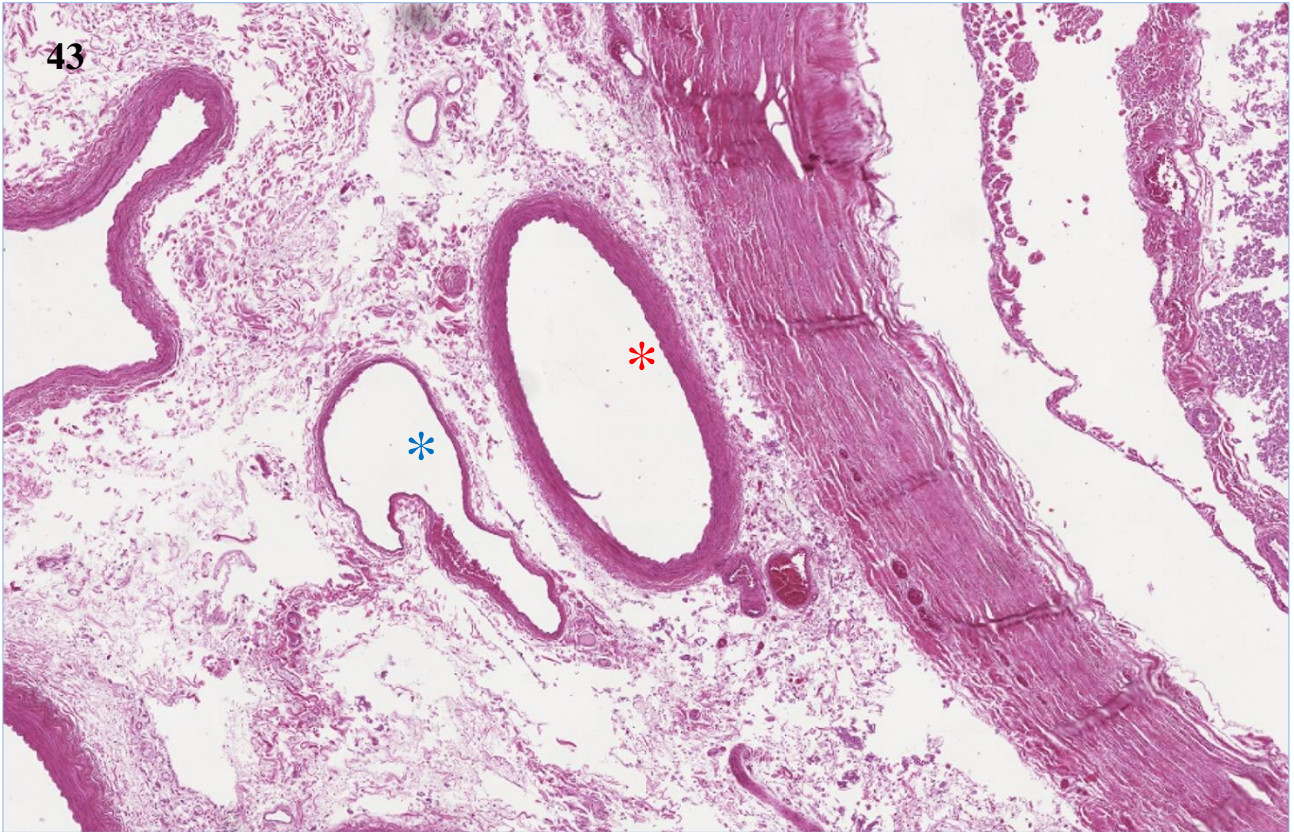
Infatti non è possibile riconoscere la lamina interna e nemmeno le fibre di elastina non lamellare o quelle di collagene, che nello studio vengono descritte come frammiste al tessuto muscolare all'interno della tunica media.

#### 4.1.a *Sezioni cervicali e toraciche*

Al centro di ogni vetrino è presente il midollo spinale in sezione trasversale, attorno al quale si dispone il fitto letto vascolare della rete mirabile, costituita essenzialmente da vasi di tipo arterioso e venoso immersi in uno strato di tessuto connettivale ed elastico più o meno sviluppato.

I vasi di tipo arterioso (la maggior parte) si distinguono per via della spessa parete di tipo prevalentemente muscolare avente uno spessore variabile fra 90  $\mu\text{m}$  e 312  $\mu\text{m}$ , esse possiedono un diametro pari a 1-5 mm (in accordo con Lillie et al., 2015) e nel caso del soggetto ID 319 sono attornati da tessuto adiposo (Figura 45).

Attorno ai vasi arteriosi, in particolare a quelli di maggior calibro, è costante la presenza di vasi venosi, riconoscibili per via della parete molto più sottile e di composizione prettamente elastica (Figura 43).



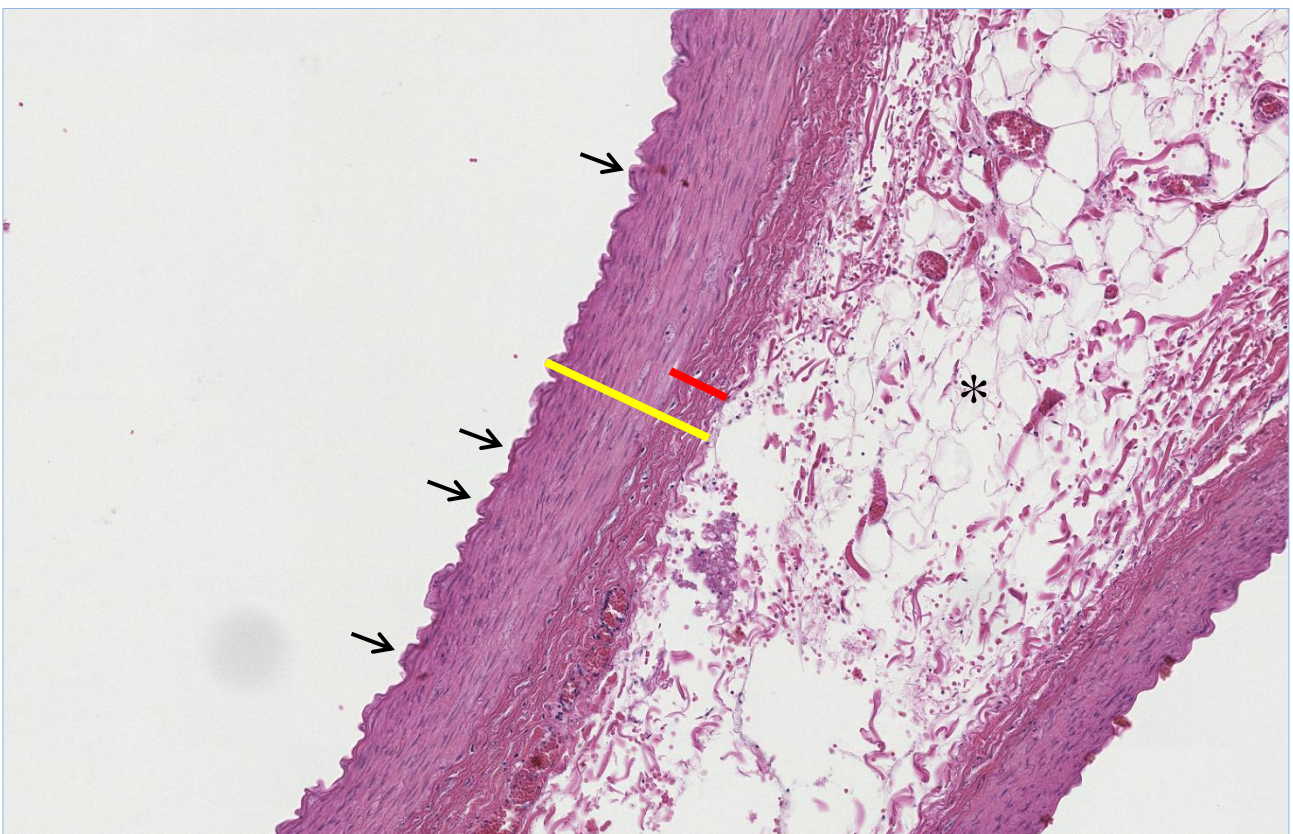
**Figura 43 e 44** Tursiope ID 196, porzioni cervicale (43) e toracica (44) ad ingrandimento 4x: si nota molto bene l'associazione pressoché costante tra vasi di tipo arterioso (\*), a parete molto spessa, e di tipo venoso (\*), a parete più sottile.

I vasi scorrono tutti nella medesima direzione, ovvero parallelamente alla colonna vertebrale e perpendicolari quindi alla superficie di taglio, come è deducibile dalla totale assenza di vasi tagliati in sezione longitudinale.

Ad un maggiore ingrandimento è possibile osservare più nel dettaglio la struttura della parete di questi vasi arteriosi: procedendo dal lume verso l'esterno si osservano le cellule endoteliali dalla forma fusiforme e disposte in monostrato al di sopra della lamina interna, la quale è visibile come una sottile linea eosinofila.

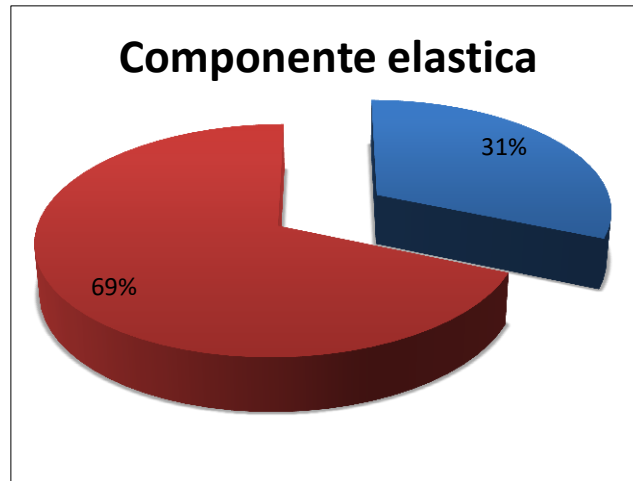
La tunica media costituisce la maggior parte della parete ed è composta per due terzi da fibre muscolari lisce pluristratificate e dal nucleo allungato, il cui andamento longitudinale o circolare non è però ben distinguibile nei preparati in esame.

Il restante terzo della tonaca media è costituito da fibre di tipo elastico pluristratificate (Figura 45, 46 e 47).

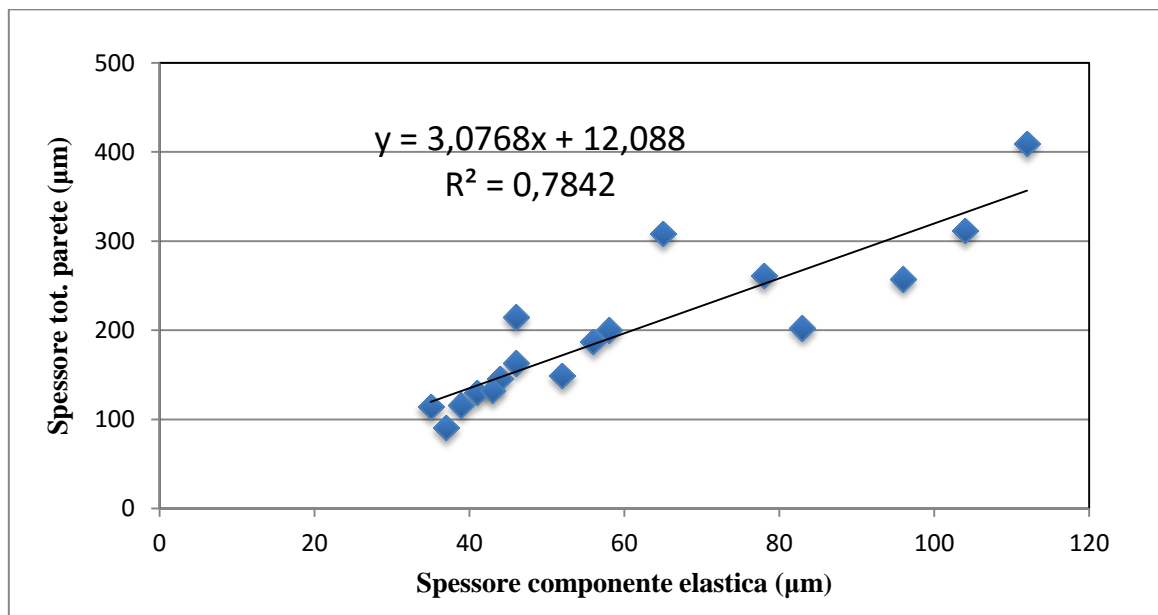


**Figura 45** Particolari delle pareti vascolari del tursiope ID 319, porzione toracica, ad ingrandimento 10x: anche ad occhio nudo si vede come la componente elastica (in rosso) della tonaca media sia circa un terzo dello spessore totale della parete (in giallo). Tra le due pareti vasali sono visibili numerosi adipociti (\*). Le frecce indicano il monostrato di cellule endoteliali.

Il diverso contributo percentuale delle componenti della tonaca media è stato calcolato misurando lo spessore della parete e dello strato elastico di un numero rappresentativo di vasi arteriosi, come si vede in Figura 47.



**Figura 46** Rappresentazione grafica della componente percentuale elastica nelle pareti dei vasi.

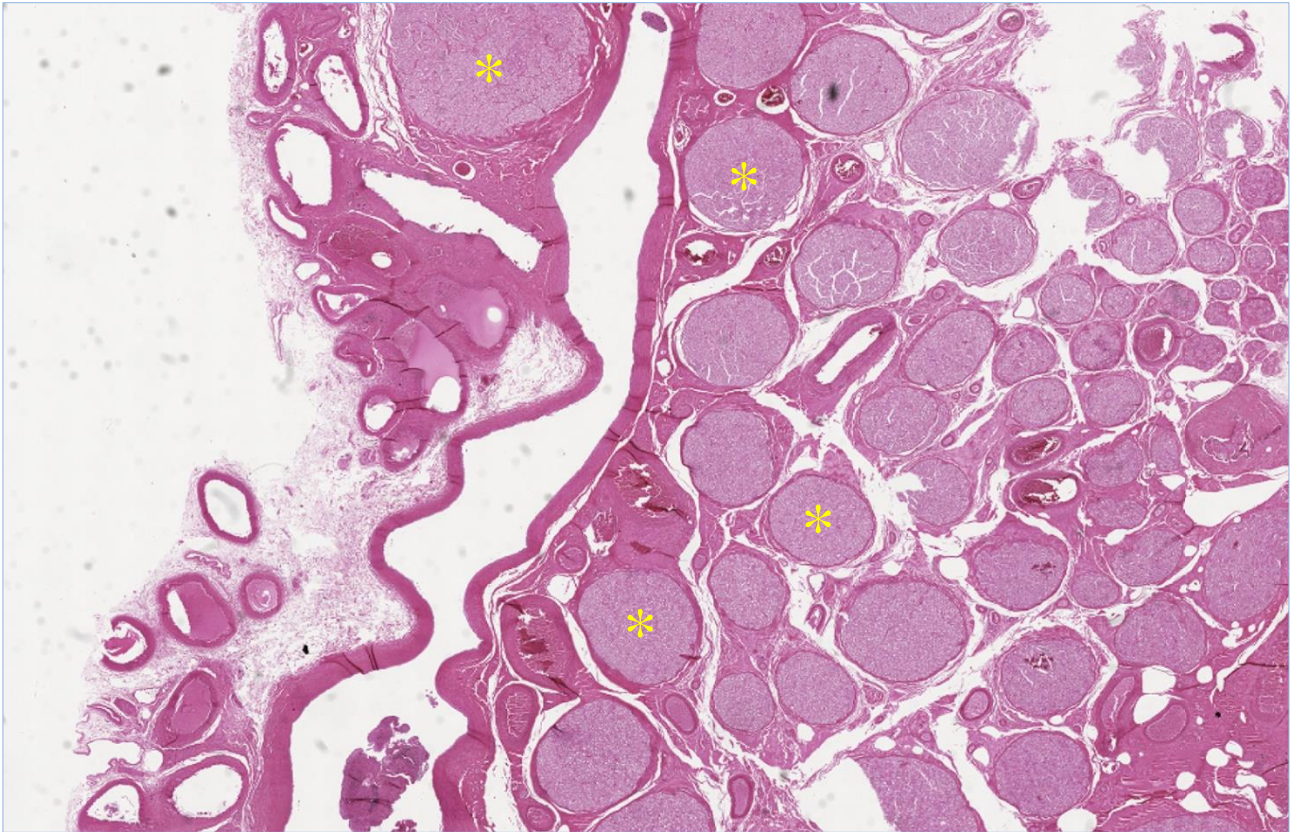


**Figura 47** Equazione di correlazione tra lo spessore della parete e lo spessore della componente elastica.

#### 4.1.b Sezioni lombari e della cauda equina

Come si riscontra in Figura 48, le porzioni lombari (ed ancora di più quelle provenienti dalla *cauda equina*) mostrano una diminuzione della componente vascolare appartenente alle reti mirabili.

In sezione trasversale la quasi totalità del preparato è occupata da fasci nervosi appartenenti alla *cauda equina* ed i pochi vasi di tipo arterioso presenti possiedono le stesse caratteristiche descritte nel precedente paragrafo per quelli appartenenti alle porzioni cervicali e toraciche.



**Figura 48** Tursiope ID 319, particolare della porzione lombare ad ingrandimento 1x, sono ben visibili i fasci nervosi della *cauda equina* (\*).

#### **4.2 Analisi immunoistochimica**

Non è stata riscontrata immunoreattività significativa per l'ossido nitrico sintasi, in quanto le positività rinvenute sono state poche, deboli ed aspecifiche, in misura tale da non giustificare la messa in atto di ulteriori tentativi.

Tali reperti sono in linea con quanto considerato per il narvalo (*Monodon monoceros*) da Lillie et al. (2013) i quali riportano come, malgrado ampie fascicolazioni nervose scorrono in prossimità delle reti mirabili, le connessioni dirette di tipo adrenergico risultino essere molto scarse (in accordo anche con Vogl et al., 1981).

Anche Pfeiffer e Kinkead (1990), durante lo studio di reti arteriose non toraciche di una balena artica (*Balaena mysticetus*) sono giunti ad una conclusione simile basandosi sull'osservazione di complessi simili ai gangli all'interno della tunica media, ma di nessun corpo neuronale.

Cozzi et al. (2005) hanno dimostrato la presenza dell'enzima ossido nitrico sintasi nei neuroni periferici posti lungo le lacune venose della mucosa tracheale nella stenella striata (*Stenella coeruleoalba*), tuttavia il presente studio sembra non dimostrare un coinvolgimento dell'ossido nitrico neuronale nella regolazione del flusso delle reti mirabili.

### 4.3 Volume della rete mirabile midollare

Quanto emerso dall'analisi microscopica dei preparati va ad arricchire studi precedenti nei quali è stata misurata la superficie percentuale delle reti mirabili.

Per quanto riguarda la porzione cervico-toracica della rete midollare, la superficie occupata dal lume delle arterie è stata rinvenuta essere in media del 30,17% (Tabella 9), quindi circa il doppio di quanto riportato da Lillie et al. nel 2013 per la rete toracica di una balenottera comune (15%) e circa un terzo in più di quanto riportato nel 1982 da Vogl e Fisher nel narvalo, *Monodon monoceros*, e nel beluga, *Delphinapterus leucas* (22 %).

Per quanto riguarda invece il tratto lombo-caudale, la componente vascolare è risultata essere molto più ridotta con una percentuale di superficie del 7,82 % in media (Tabella 9).

La rete mirabile midollare è quindi molto più sviluppata lungo tutta la lunghezza del midollo spinale, a suggerire che essa svolga un ruolo relativo al suo equilibrio pressorio e termogenetico, mentre si dirada notevolmente nel tratto di colonna privo di midollo e contenenti solamente i fasci nervosi della *cauda equina*.

Esemplare	%	Media (%)
ID 196 C	35,6	30,17
ID 319 C	40,9	
ID 344 C	31,7	
ID 196 T	24,1	
ID 319 T	20,7	
ID 344 T	28,1	
ID 196 L	5,8	7,82
ID 319 L	9,7	
ID 344 L	7,9	

**Tabella 9** Percentuali di superficie delle diverse sezioni di rete mirabili nei tursiopi ID 196, ID 319 e ID 344. C, cervicale; T, toracica; L, lombare.



Per quanto riguarda invece il volume di sangue che è possibile allocare all'interno della rete, esso è risultato essere di circa 170 ml, come riportato in Tabella 10.

Pur potendo sembrare un volume ridotto, esso risulta essere quasi il triplo del volume del midollo spinale, che è pari in media a  $0,059 \text{ dm}^3$ , ovvero 59 ml.

Si conferma quindi quanto detto in precedenza: un tale volume di sangue non può avere come solo scopo l'ossigenazione o la nutrizione del tessuto nervoso, ma deve avere uno o più ulteriori ruoli (a tale riguardo, si veda il capitolo "Discussione").

Esemplare	Volume finale (dm3)
ID 196	0,172
ID 319	0,206
ID 344	0,134
Media	0,171

**Tabella 10** Volume di sangue contenuto all'interno delle reti mirabili midollari nei Tursiopi ID 196, ID 319 e ID 344.

#### ***4.4 Distribuzione del sangue nel nuoto in superficie e in immersione***

Il primo dato ad emergere dallo studio della fase di nuoto superficiale deriva da un semplice calcolo: il rapporto tra la gittata cardiaca a 100 bpm (ovvero durante la fase tachicardica caratteristica) e il volume di sangue circolante al minuto è infatti pari a 1,99, il doppio rispetto ad un mammifero terrestre a riposo.

Ciò significa che un tursiope è in grado, per ogni unità di tempo, di far circolare praticamente due volte il proprio volume di sangue.

Dato che con il raddoppio della gittata, si raddoppia anche il sangue che va ad irrorare il polmone ad ogni minuto, è possibile in questo modo ottenere una massimizzazione della sua ossigenazione.

Dopo aver ottenuto questo dato preliminare, si è proceduto ad indagare la distribuzione del sangue durante i vari step d'immersione.

Battiti al minuto	SV (%)	Vol. sangue (l/min)	Irrorazione (l/min)			Volume minimo (l/min)	Riduzione circolo sanguigno (%)	Deficit sangue (l/min)	Reti mirabili + Fegato (l/min)
			Encefalo	Cuore	Polmone				
100	86,96	31,98	0,87	1,41	1,90	4,18	0	0	3,39
90	72,21	26,50	0,87	1,41	1,90	4,18	17,12	-5,48	3,39
80	57,45	21,55	0,87	1,41	1,90	4,18	18,70	-10,43	3,39
70	42,69	17,08	0,87	1,41	1,90	4,18	20,72	-14,90	3,39
60	27,94	13,13	0,87	1,41	1,90	4,18	23,12	-18,84	3,39
50	13,18	9,68	0,87	1,41	1,90	4,18	26,30	-22,30	3,39
40	-1,58	6,73	0,87	1,41	1,90	4,18	30,46	-25,25	3,39
30	-16,34	4,29	0,87	1,41	1,90	4,18	36,20	-27,68	3,39
20	-31,09	2,36	0,87	1,41	1,90	4,18	45,12	-29,62	3,39
10	-45,85	0,93	0,87	1,41	1,90	4,18	60,70	-31,05	3,39

**Tabella 11** Distribuzione del volume sanguigno nei diversi step d'immersione per il tursiope ID 319. Al di sotto dei 20 bpm (il cui step è evidenziato in verde), a causa della riduzione di *stroke volume* (SV) e portata, evidenziati in rosso, l'animale non dovrebbe essere in grado di perfondere encefalo, cuore e polmone.

Come si può vedere in Tabella 11, a partire dalla condizione di nuoto superficiale (quindi 100 bpm) è stato ricavato il volume di sangue circolante (in litri) per ogni minuto e sono state poste come fisse le quote di distribuzione ad encefalo, cuore e polmone, per un totale di 4,18 l/min (nell'esempio si è sempre usato il tursiope ID 319).

Dopo aver stabilito la quota ignota, ovvero il sangue risultante in eccesso una volta soddisfatta la perfusione minima di ogni apparato, essa è stata attribuita alle reti mirabili (nel caso in esempio: 1,96 l/min).

In mancanza di dati sulle riserve costituite dalle lacune epatiche, è stato assunto che il fegato possa costituire un serbatoio per un volume di sangue pari alla propria irrorazione al minuto (1,43 l/min).

Le reti mirabili e il fegato sono stati quindi considerati come una quota fissa, ovvero il loro volume di superficie è stato mantenuto costante all'interno dell'equazione durante le fasi di immersione: l'intento è stato quello di caratterizzarle come una sorta di riserva di sangue, all'interno delle quali il volume sanguigno venga fatto circolare più lentamente rispetto al resto dell'organismo così da risultare di fatto stoccato e disponibile in caso di bisogno, da parte dell'animale, di un surplus di sangue ossigenato.

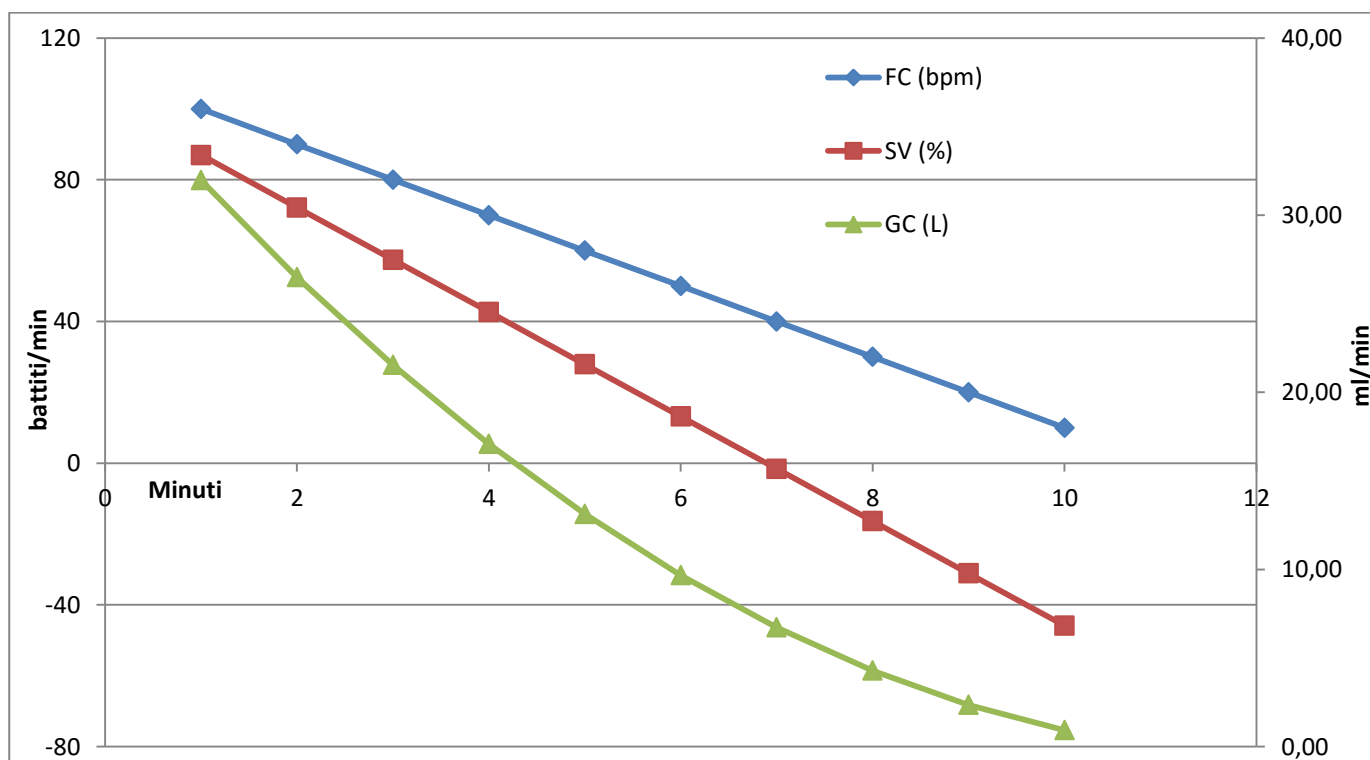
Per fare un paragone, le reti mirabili e le lacune epatiche assumono il ruolo di una sorta di bombola di ossigeno, a cui l'animale può ricorrere in caso di necessità (ovvero condizioni di vasocostrizione estreme).

Durante la fase di immersione dai 90 ai 10 bpm, sempre in Tabella 11, è ben evidenziato come già a 90 bpm, a causa della riduzione della gittata cardiaca del 17,12 %, l'organismo vada incontro ad un deficit volumetrico di sangue (nell'esempio, ID 319 a 90 bpm è in deficit di 5,48 l/min).

Con la progressiva diminuzione della frequenza cardiaca, e quindi con l'aumentare della profondità d'immersione, si assiste ad riduzione della gittata cardiaca e parallelamente ad un aumento del deficit di sangue sempre più marcati.

A 40 bpm la gittata cardiaca si riduce addirittura al di sotto della condizione di riposo (-1,58 %).

L'andamento della riduzione della gittata cardiaca è raffigurato in Figura 49:



**Figura 49** Elaborazione grafica della variazione di: frequenza cardiaca (FC), *stroke volume* (SV) e gittata cardiaca (GC).

Come si può notare, una volta al di sotto dei 60 bpm la riduzione progressiva della gittata cardiaca inizia a diminuire, andando ad assumere graficamente le caratteristiche di un *plateau*, che si accentua notevolmente una volta scesi sotto i 30 bpm.

A a 30 bpm in ogni caso, la situazione è ancora da ritenersi come non critica, in quanto la gittata cardiaca è sufficiente, anche se con poco margine, al mantenimento dell'afflusso minimo ai tre apparati suddetti, con 4,29 l/min.

Una volta sceso al di sotto dei 20 bpm, il sangue eiettato dal cuore ad ogni minuto (2,36 l/min) non è più sufficiente a mantenere i 3 distretti principali, ovvero encefalo, cuore e polmone, il cui fabbisogno minimo è di 4,18 l/min (Tabella 11).

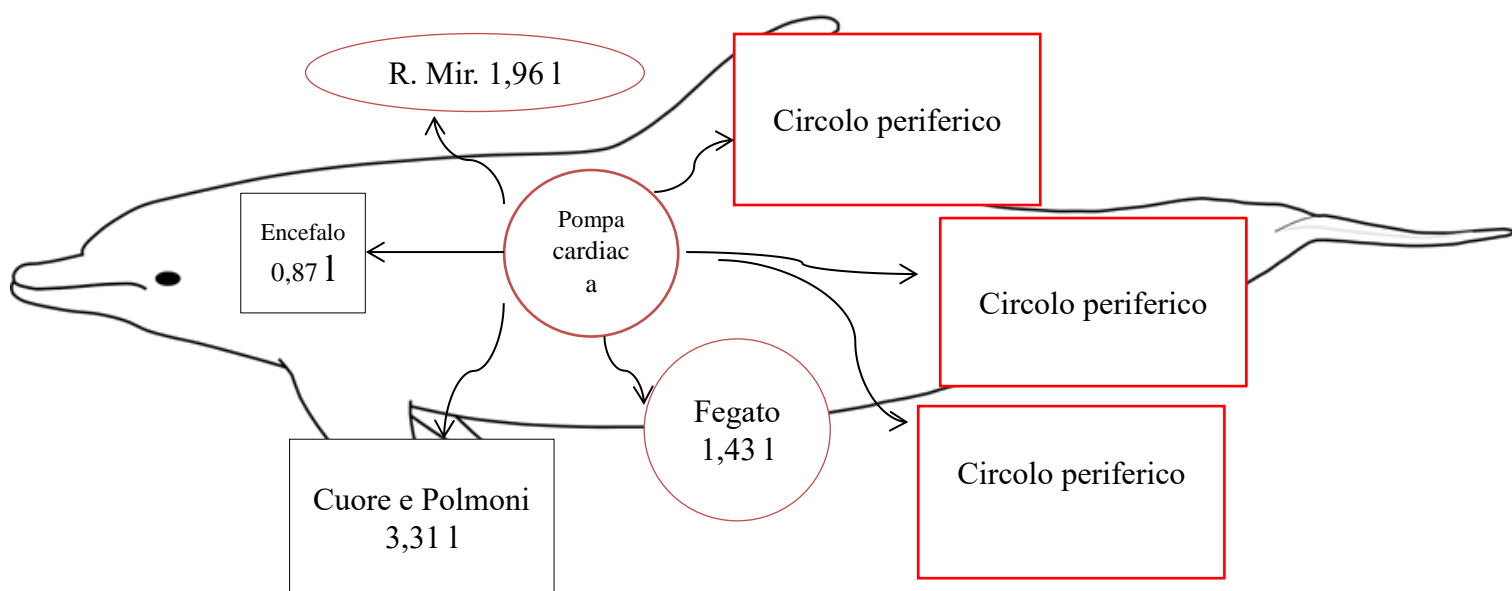
Dato che nel tursiope sono ben documentati livelli di frequenza cardiaca inferiori ai 20 bpm (Elsner et al., 1966; Ridgway, 1976), l'unico modo che esso ha per supportare l'ossigenazione dei tre distretti è quello di attingere alle riserve costituite dalle reti mirabili e dalle lacune epatiche, che fino a questo momento sono state mantenute intatte.

Nel presente esempio quindi la soglia dei 20 bpm rappresenta il *cut-off* per l'utilizzo delle reti mirabili, il cui ruolo in condizioni d'immersione critica appare giustificato.

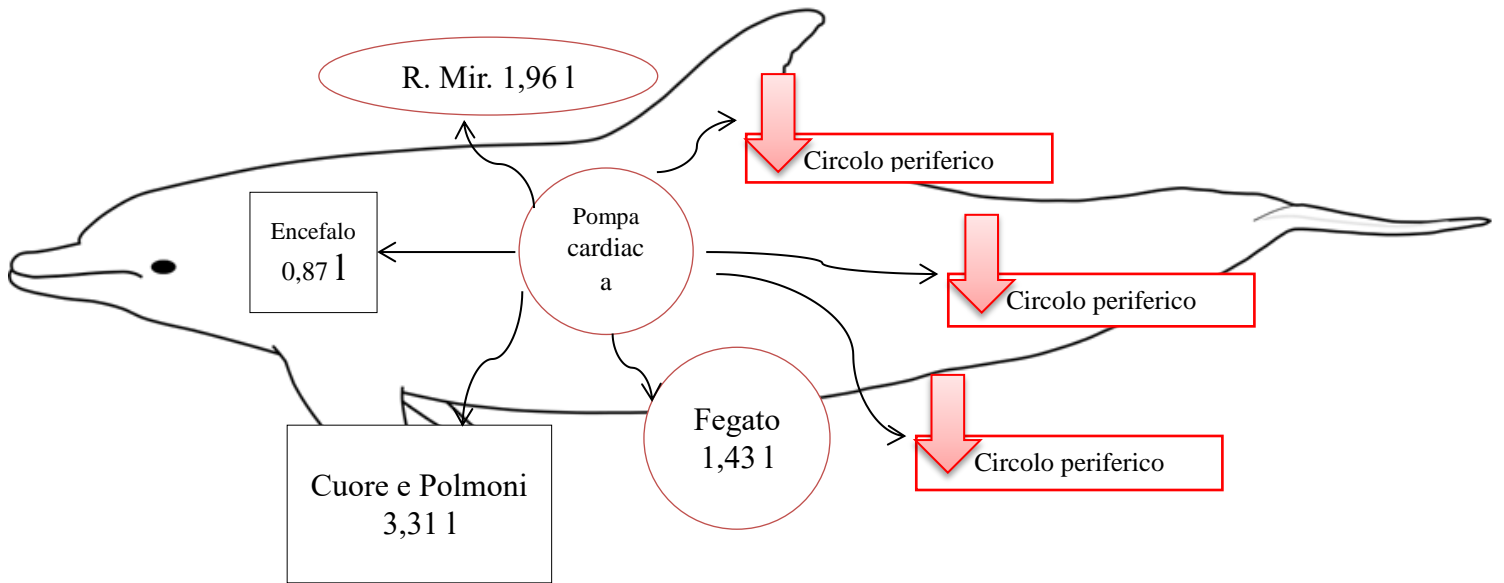
Attraverso una simulazione, mediante l'equazione oggetto del presente studio è possibile affermare che un tursiope potrebbe arrivare a ridurre la propria frequenza cardiaca fino a 5 o anche 1 bpm riuscendo comunque a mantenere perfusi, grazie alle riserve di cui sopra, i tre apparati critici.

Va tenuto tuttavia presente come in condizioni normali un tursiope non si spinga al di sotto di una frequenza cardiaca di 40-50 bpm, rimanendo quindi in condizioni molto meno estreme rispetto ai 10-20 bpm che qui sono stati presi in considerazione; in tali condizioni il ruolo delle reti mirabili può essere ipotizzato essere quello di buffer pressorio, e non di riserva di sangue ossigenato.

Tale argomento è oggetto di discussione nel capitolo successivo.



**Figura 50** Schematizzazione della distribuzione del volume sanguigno in un tursiope durante la fase di nuoto superficiale a 100 bpm.



**Figura 51** Schematizzazione della distribuzione del volume sanguigno in un tursiope durante la fase d'immersione.



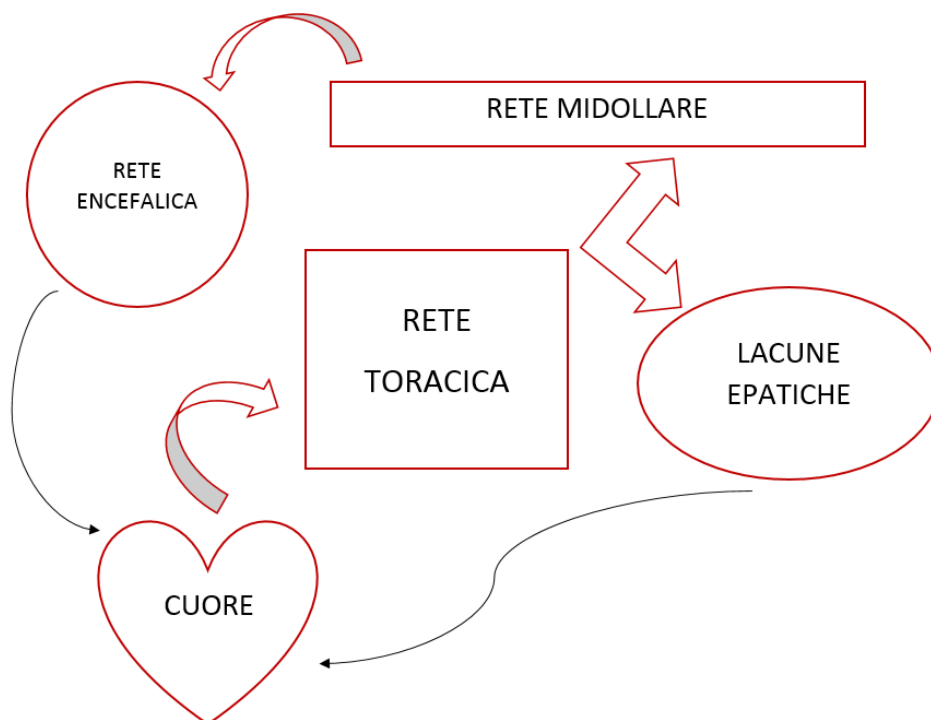
## 5. DISCUSSIONE

L'analisi della struttura e delle funzioni delle reti mirabili si è dimostrato essere un lavoro articolato, dato che ha coinvolto diversi ambiti disciplinari: dall'analisi microscopica ed immunoistochimica ai principi idraulici della bio-dinamica.

Ad ogni modo, i risultati ottenuti si sono dimostrati incoraggianti e tali da permettere ulteriori indagini sui diversi fronti che questa tesi ha affrontato.

Va sottolineato che, al meglio delle conoscenze disponibili e non avendone trovati di equivalenti in letteratura, questo risulta essere il primo studio di tipo dinamico sull'andamento della vasocostrizione in fase di immersione e ci si auspica che possa essere di stimolo per un nuovo approccio ed ulteriori studi sull'argomento per chi si occupa di queste strutture vascolari.

Prima di procedere con la discussione, si ricorda la collocazione anatomica delle reti: esse sono distribuite "in serie", interposte tra i grandi vasi del circolo generale e gli organi dei distretti fisiologicamente fondamentali, come si vede in Figura 52.



**Figura 52** Rappresentazione schematica del flusso sanguigno all'interno delle reti mirabili.

### ***5.1 Le reti mirabili come riserva di sangue ossigenato***

Lo studio emodinamico delle fasi di nuoto superficiale e di immersione eseguito delinea chiaramente una possibile funzione delle reti come riserva di sangue ossigenato.

Va precisato che non si tratta di una vera e propria riserva, come potrebbe essere ad esempio nel caso della milza, poichè all'interno delle reti il sangue continua a scorrere, seppur più lentamente.

Il loro apporto sanguigno viene garantito ad ogni minuto, ma per via di calibro, lunghezza, rigidità e toruosità (secondo la legge di Poiseuille), al loro interno la velocità del flusso cala.

Un altro fattore che fa diminuire la velocità del torrente circolatorio è l'abbassarsi della frequenza cardiaca: i litri perfusi per ogni minuto calano progressivamente.

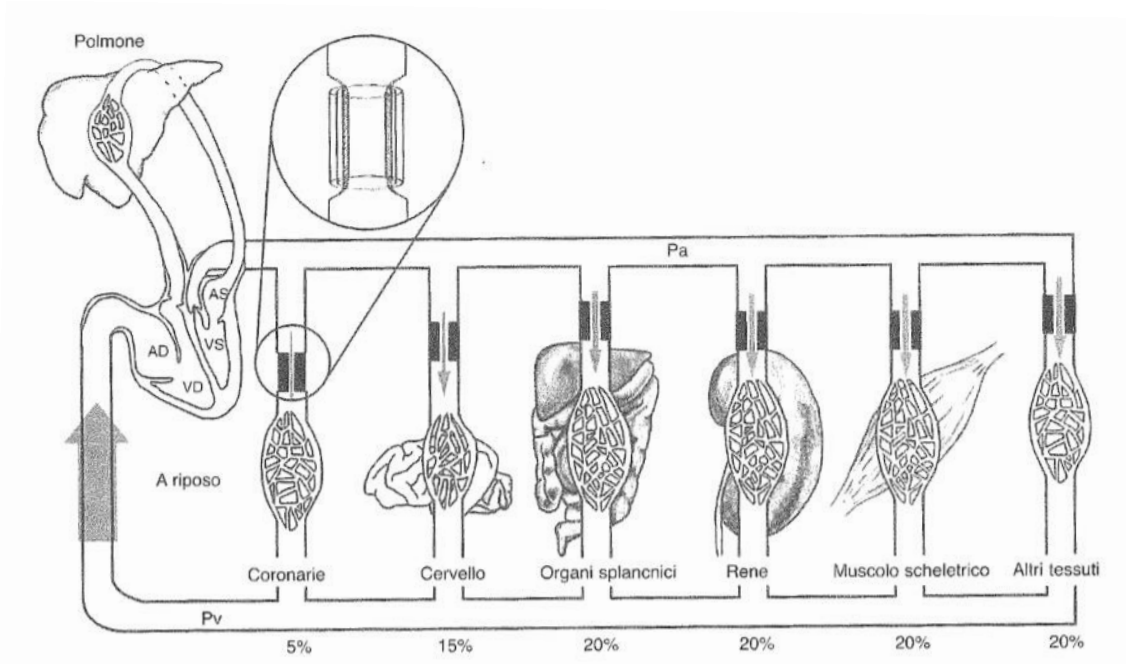
Le reti quindi, una volta incamerato il sangue, lo fanno progredire verso i distretti d'interesse (encefalo, cuore e polmone) con un andamento lento e costante, privo di interruzioni.

Questo, unitamente alla sviluppata capacità di vasocostringere il circolo periferico in fase di immersione (Elsner et al., 1966; Ridgway, 1976; Williams et al., 2014), peraltro comune alla maggior parte delle specie a vita acquatica (Fahlman e Schagatay, 2014), permette ai cetacei di ottimizzare l'utilizzo delle proprie riserve di ossigeno e di raggiungere profondità impensabili per le specie di ambiente terrestre.

Tale capacità emerge essere, in questo studio, di tipo progressivo e si suppone che essa sia corrispondente alla riduzione della gittata cardiaca.

Se quindi a 90 bpm un tursiope riduce la propria gittata cardiaca di circa il 17%, vi sarà una vasocostrizione periferica di un corrispondente 17%, quindi organi splancnici, cute e blubber, muscolo ed apparato scheletrico riceveranno il 17% di sangue in meno, e così via per ogni step d'immersione analizzato.





**Figura 53** Schema dell'irrorazione e della vasocostrizione del circolo sanguigno (Cunningham, 2006).

Non è ancora possibile stabilire la quota di vasocostrizione particolare per ogni apparato; la si può forse ricavare per la muscolatura a partire da studi effettuati sulla foca comune, *Phoca vitulina* (Jobsis et al., 2001; Ridgway e Howard, 1979).

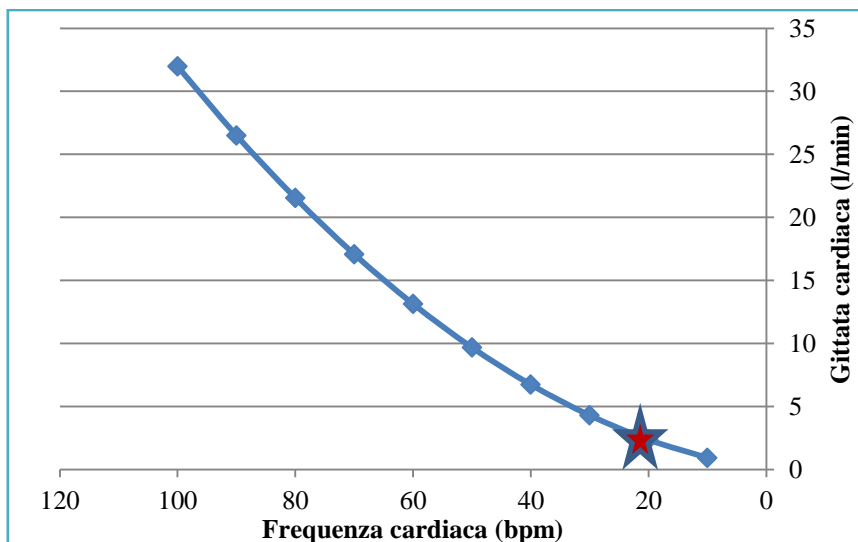
Tuttavia non ci sono indicazioni che l'apparato muscolare del tursiope venga del tutto escluso dal circolo, anzi sembra che nei cetacei una minima perfusione venga costantemente mantenuta (Ridgway e Howard, 1979).

In ogni caso, una media della vasocostrizione periferica in immersione non era mai stata calcolata in precedenza e questo pone le basi per studi approfonditi su ogni singolo apparato.

Come già detto, dallo studio emo-dinamico emerge come grazie al riflesso bradicardico ed alla vasocostrizione degli altri organi e apparati, il tursiope riesca a mantenere la perfusione completa dei tre distretti critici (encefalo, cuore e polmone) fino al raggiungimento di una frequenza cardiaca di 20 bpm (evidenziata in Figura 54).

Oltre tale soglia, infatti, un tursiope come ID 319 non potrebbe, senza ulteriori apporti, sopravvivere e mantenere un'adeguata irrorazione dei tre organi, essendo la portata ridotta a soli 2,36 l/min (l'irrorazione minima di encefalo, cuore e polmone è 4,18 l/min).

La medesima considerazione vale per lo step di immersione a 10 bpm, durante il quale la portata si riduce addirittura a 926 ml/min.



**Figura 54** Andamento della vasocostrizione del circolo sanguigno nel tursiope in immersione, in relazione alla frequenza cardiaca, è ben evidenziato il punto di *cut-off* a 20 bpm.

Tuttavia, la documentazione sulla capacità dei tursiopi di scendere sotto tale soglia di frequenza è molto ampia (Elsner et al., 1966), e sebbene tali gradi di riduzione della gittata cardiaca possano durare solo per pochi secondi, esse non dovrebbero essere compatibili con la vita.

Una possibile spiegazione è che il tursiope sia in grado di attingere sangue da altri distretti.

Trova così fondamento l'ipotesi che le riserve di sangue ossigenato siano allocate all'interno delle reti mirabili e delle lacune epatiche, la cui capienza volumetrica, sommata alla gittata cardiaca, soddisfa con poco margine di eccesso il fabbisogno minimo dei tre distretti critici.

Se infatti ai 926 ml/min di cui sopra, aggiungiamo i 3,4 l/min forniti da reti mirabili e lacune epatiche, arriviamo ad una portata totale di 4,36 l/min circa.

Essendo l'apporto minimo al minuto di encefalo, cuore e polmone corrispondente a 4,18 l/min, ecco che risulta dimostrato come le riserve di sangue siano in grado di sostenere i tre distretti nel caso in cui la pompa cardiaca, da sola, non possa più farlo.

L'apporto combinato di pompa cardiaca, reti mirabili e lacune epatiche, per puro scopo speculativo, sarebbe in grado di sostenere il tursiope anche a 1-5 bpm (tale frequenza cardiaca è riportata per il capodoglio e per altri *deep-divers*, mentre nei tursiopi essa è riferita solo aneddoticamente).

## ***5.2 Altre funzioni delle reti mirabili***

Le reti mirabili si sono confermate essere, sia allo studio macroscopico in fase di necropsia sia allo studio microscopico, delle strutture dalla fitta ramificazione e dotate di una importante componente muscolare all'interno della parete dei propri vasi.

I rilievi effettuati sono in linea con altri lavori che abbiano indagato la loro struttura microscopica, a cui si aggiunge l'evidenza di una maggior componente percentuale di superficie nel tursiope (30%) rispetto ad altre specie (15% balenottera comune, 22% narvalo e beluga da Lillie et al., 2013).

All'analisi immunostochimica non è emersa l'evidenza di un controllo di tipo neuro-mediato, questa teoria va quindi esclusa dal ventaglio delle ipotesi proposte in questa tesi.

Si sottolinea tuttavia la necessità di compiere ulteriori studi riguardanti il controllo attivo delle reti (si veda il paragrafo 5.3 di questa Discussione).

In ogni caso, in questo capitolo ci si concentrerà sull'ipotesi di un funzionamento di tipo non neuro-mediato: vi sono infatti evidenze (suggerite anche da altri autori) che le reti possano svolgere il loro ruolo di buffer pressorio e di stoccaggio sanguigno anche in assenza di un controllo da parte del Sistema Nervoso Viscerale (si veda oltre).

Quella che segue è una valutazione critica delle svariate ipotesi (sia quelle già esistenti sia quelle emerse durante questo studio) riguardanti il funzionamento delle reti mirabili, alla luce di quanto emerso dai Risultati.

Le ipotesi sui possibili ruoli delle reti mirabili sono:

- Vantaggi anatomici;
- Incomprimibilità a protezione del midollo spinale;
- Termoregolazione;
- Buffer pressorio;
- Prevenzione del tromboembolismo;

## 5.2.a Vantaggi anatomici

Come prima cosa, vanno considerati i vantaggi anatomici della presenza delle reti mirabili, ancor prima di quelli fisiologici od idrodinamici.

Se si pensa ad un qualsiasi animale terrestre che venga posto in una condizione di sforzo fisico, oltre un certo livello di fatica si avrà l'immissione in circolo di nuovo sangue ossigenato proveniente dalla milza.

Questo organo funziona come una riserva di sangue, e contraendosi in caso di necessità, ne eietta un certo surplus (situazione familiare a chiunque pratichi sport: l'acuta sensazione di dolore che si percepisce a livello di fianco sinistro, dopo un certo tempo di esercizio, altro non è che la milza che si contrae).

Come viene messo in evidenza da Ridgway et al. (1969) e da Lillie et al. (2013) nei loro studi, anche i cetacei devono poter disporre di un *pool* di sangue ossigenato di riserva.

Tale caratteristica va quindi ad associarsi alla capacità di vasocostrizione ed alla marcata resistenza all'anaerobiosi dei tessuti: tutte e tre queste componenti sono essenziali per garantire il mantenimento delle funzionalità vitali durante la fase d'immersione.

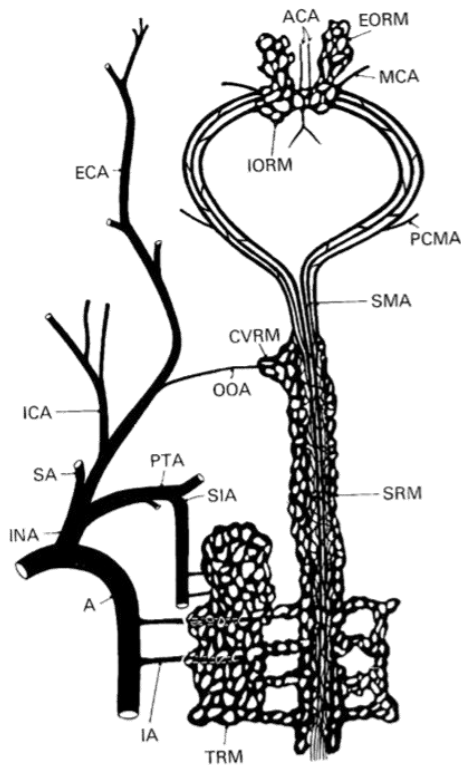
La milza dei cetacei tuttavia è poco sviluppata, decisamente sproporzionata a confronto di quella dei mammiferi terrestri e quindi inadatta allo stoccaggio di grandi quantità di sangue (Cowan and Smith, 1999).

A tutto ciò si aggiunge una problematica di ingombro spaziale: dato che la cavità addominale dei cetacei è poco espandibile, a causa della spessa muscolatura e dello strato di blubber che la circondano, un eventuale ingrossamento della milza per l'immagazzinamento di grandi volumi di sangue causerebbe una sovradistensione della cavità, procurando un'intensa sensazione dolorifica all'animale.

Ovviamente i cetacei non possono aver "rinunciato" all'avere una riserva di sangue ossigenato, dato che nelle loro condizioni di vita questa risorsa appare indispensabile.

Tale riserva è stata semplicemente spostata altrove (almeno in parte, dato che la milza è comunque presente), la sua capacità aumentata e ridistribuita in più distretti corporei attraverso le reti mirabili e le lacune epatiche.

Una tale capillarità di distribuzione (Figura 20 del paragrafo 1.9.c) fa sì che, anche in caso di aumento volumetrico, esso non sia tale da comportare disturbi all'animale, dato che il sangue viene distribuito su una superficie molto ampia e non localizzata in un unico organo.



**Figura 20 (dal paragrafo 1.9.c)** Rappresentazione schematica del tipico pattern vascolare dei cetacei: A, aorta; ACA, anterior cerebral artery; CVRM, cervical rete mirabile; ECA, external carotid artery; EORM, external ophthalmic rete mirabile; IA, intercostal artery; ICA, internal carotid artery; INA, innominate artery; IORM, internal ophthalmic rete mirabile; MCA, middle cerebral artery; OOA, omo-occipital artery; PCMA, posterior cerebral meningeal artery; PTA, posterior thoracic artery; SA, subclavian artery; SIA, supreme intercostal artery; SMA, spinal meningeal artery; SRM, spinal rete mirabile; TRM, thoracic rete mirabile (McFarland et al., 1979).

### 5.2.b Incomprimibilità

Una prima ipotesi emersa nel corso di questo studio è stata che la rete mirabile midollare possa funzionare da rivestimento incomprimibile a protezione del midollo spinale.

Tale idea aveva alla base due concetti: l'incomprimibilità dei fluidi e le caratteristiche anatomiche di questa rete.

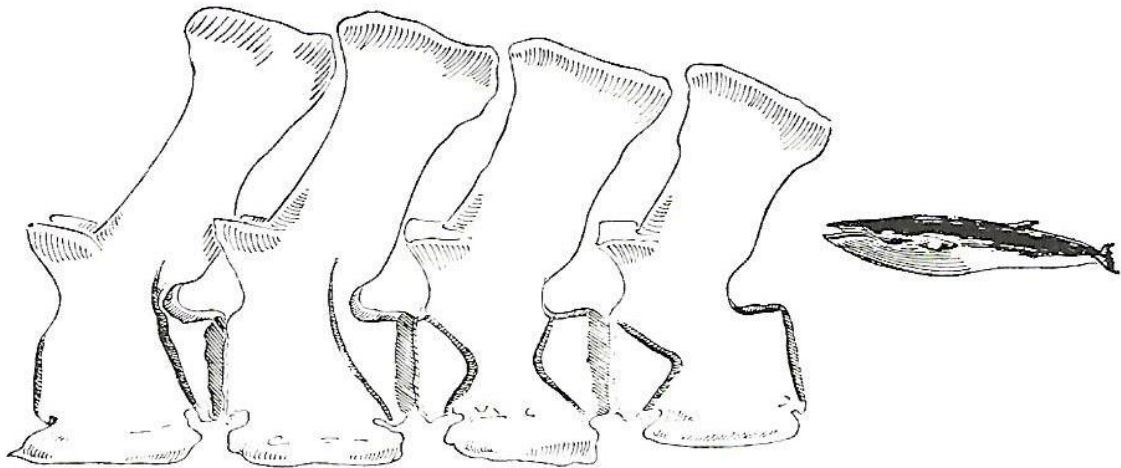
Essendo i vasi arteriosi distribuiti secondo un'unica direzione (paralleli cioè al midollo spinale stesso), avendo un calibro molto piccolo ed una parete muscolare relativamente rigida, potrebbero servire ad impedire lo schiacciamento del midollo spinale a grandi profondità d'immersione, in presenza di una pressione esterna notevole.

Per comprendere appieno il concetto, basti pensare alla differenza che si riscontra nel comprimere un tubo di plastica rispetto al comprimere un fascio di tubicini dello stesso diametro del tubo: il fascio di tubicini oppone una resistenza di molto maggiore alle forze di pressione esterne, tanto più se questi sono riempiti di liquido incomprimibile.

Tuttavia tale ipotesi deve essere scartata, dato che viene confutata da due osservazioni:

1. Il midollo spinale è già protetto, contro la pressione dell'ambiente esterno, dal canale osseo della colonna vertebrale (Figura 55), pertanto un tale ruolo svolto dalla rete midollare risulterebbe superfluo;
2. Se l'incomprimibilità del midollo dovesse basarsi esclusivamente sulle reti mirabili, l'effetto sarebbe controproducente, poichè non ci sarebbe un'azione di smorzamento, ma anzi il fluido (incomprimibile) trasmetterebbe *in toto* la pressione al midollo spinale, comportandone lo schiacciamento.

Molto più utile a tale scopo risulta essere invece il tessuto adiposo, presente all'interno del canale, il quale è in grado di deformarsi parzialmente assorbendo la forza di pressione, funzionando da cuscinetto.



**Figura 55** Rappresentazione delle vertebre lombari di una balenottera rostrata (*Balaenoptera acutorostrata*) (Slijper, 1936).

### 5.2.c Termoregolazione

I vasi arteriosi della rete midollare sono stati trovati, allo studio istologico, costantemente associati con vasi minori di tipo venoso.

Se si prende in considerazione una struttura molto nota all'anatomia ed alla fisiologia umana, il plesso pampiniforme, è facile osservare una certa somiglianza nella struttura ed è altrettanto facile ipotizzare una similarità di funzione.

A livello delle reti mirabile il sangue rallenta per via del restringimento del lume e dell'aumento della lunghezza, come spiega la legge di Poiseuille:

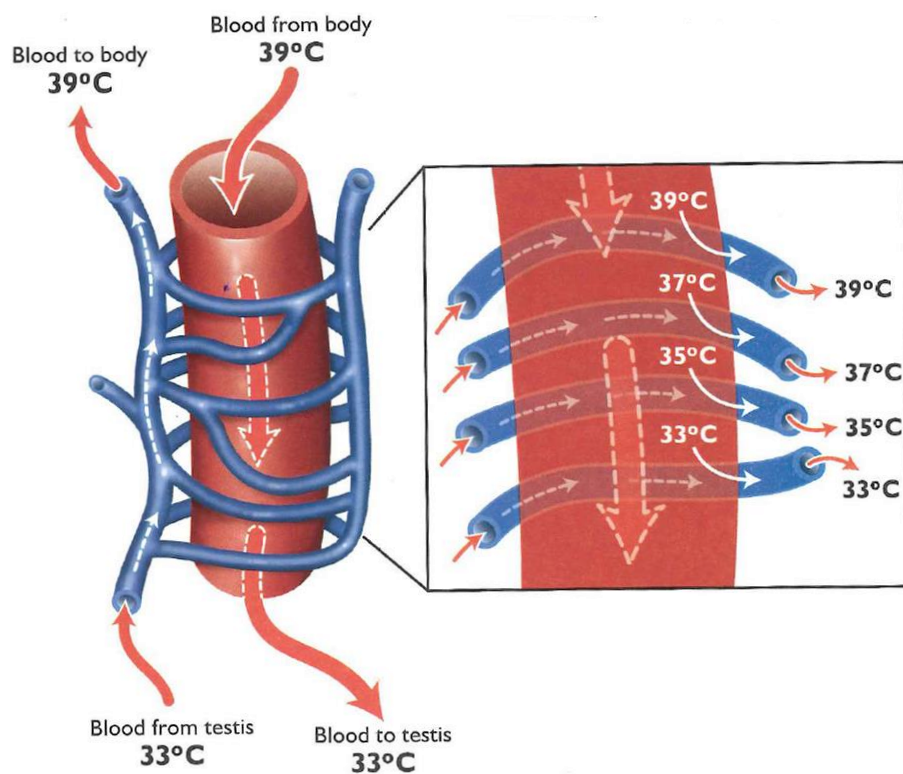
$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \eta L}$$

Il sangue arterioso e quello venoso pertanto, restano in contatto (indirettamente) per un lungo periodo di tempo, scorrendo in direzioni opposte.

In questo modo il sangue arterioso più caldo cede calore a quello venoso, più freddo, garantendo un raffreddamento del sangue afferente i distretti irrorati.

La rete mirabile midollare analizzata in questo studio potrebbe quindi funzionare come regolatore della temperatura; la medesima funzione, attribuita alla rete carotidea intracranica, è già stata dimostrata per i mammiferi terrestri che ne sono in possesso (Sjaastad, 2010).

La conclusione che si propone è che quindi tutte le reti mirabili funzionino da scambiatori contro corrente di calore.



**Figura 56** Il plesso pampiniforme come scambiatore controcorrente in fisiologia umana: il sangue arterioso caldo (39°C) viene raffreddato lungo il suo percorso verso i testicoli grazie all'apposizione delle vene, le quali riportano al corpo sangue più freddo (33°C) creando un gradiente di temperatura (Senger, 2010).

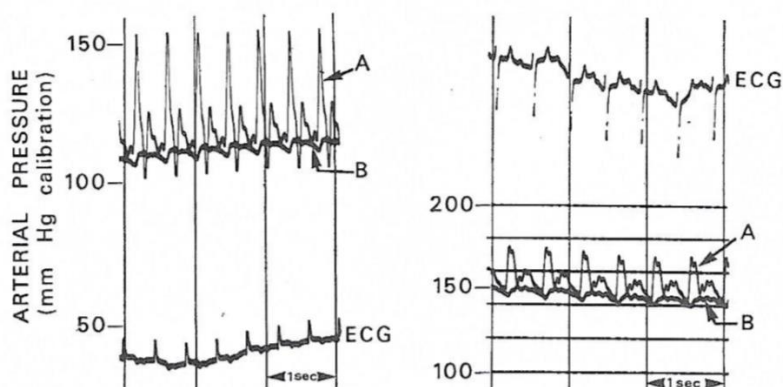
### 5.2.d Buffer pressorio

Dopo aver valutato l'anatomia delle reti mirabili ed i collegamenti anastomotici che esse possiedono tra di loro, se ne conclude che essendo esse poste in serie, vadano a riempirsi in maniera consecutiva, una dopo l'altra: prima la toracica, poi la midollare e per ultima l'encefalica, come è ben esplicitato in Figura 52.

Ogni rete quindi deve raggiungere una propria "pressione-soglia" di riempimento così da far fluire il sangue nella rete successiva.

Nagel et al. (1968) riportano come la pressione a livello di arterie spinali meningeae (i principali vasi efferenti la rete mirabile toracica) si dimostri notevolmente diminuita rispetto alla pressione misurata a livello delle arterie afferenti la rete (ovvero le arterie toracica posteriore e le intercostali) e come ciò si accompagni ad un tempo di transito decisamente lungo, dovuto alla lunghezza ed alla tortuosità dei vasi arteriosi.

Il flusso sanguigno di fatto diviene non pulsatile a livello dei vasi efferenti delle reti, garantendo in tal modo un afflusso encefalico il quanto più costante ed uniforme possibile, senza variazioni di portata o di pressione.



**Figura 23 (dal paragrafo 1.11)** Tracciato della pressione arteriosa misurato a livello di arteria afferente (aorta) ed efferente (a. spinale meningeae); il tracciato elettrocardiografico è anch'esso riportato. A livello dell'aorta (A) è possibile vedere un'alta pressione di tipo pulsatile (30-50 mmHg), mentre a livello di arteria spinale meningeae (B) la pressione delle pulsazioni raggiunge solo 5-6 mmHg (Nagel et al., 1968).

Ciò era già stato ipotizzato anche da Ask-Upmark (1935), il quale nei suoi lavori conclude che, a causa della struttura delle reti, in loro corrispondenza il circolo sanguigno debba incontrare una massiccia resistenza.

La conferma è da ricercarsi nella legge di Poiseuille: essa spiega infatti che, con il diminuire del diametro dei vasi e con l'aumento della loro lunghezza, la resistenza vasale aumenta.



A ciò si aggiunge il fatto che la struttura dei vasi sia di tipo rigido ed impedisca loro di collassare, fornendo quindi una resistenza al flusso ancora maggiore e contemporaneamente garantendo costantemente la pervietà del passaggio del sangue.

Il flusso quindi rallenta e perde di pulsatilità a causa delle caratteristiche fisiche delle reti: lunghezza, diametro e rigidità.

Per il problema della regolazione delle reti mirabili, si rimanda al capitolo 5.3.

### **5.2.e Tromboembolismo**

La capacità del tursiope di ridurre drasticamente la propria frequenza cardiaca durante la fase di immersione, solleva il problema della coagulazione intravasale del sangue.

Negli animali terrestri, qualora vi sia un ristagno sanguigno all'interno dei vasi, l'animale va incontro al rischio di formazione di trombi.

Queste formazioni possono poi andare incontro a distacco e dare vita a degli emboli, i quali andranno ad occludere i vasi di distretti posti a valle del sito primario di ristagno sanguigno.

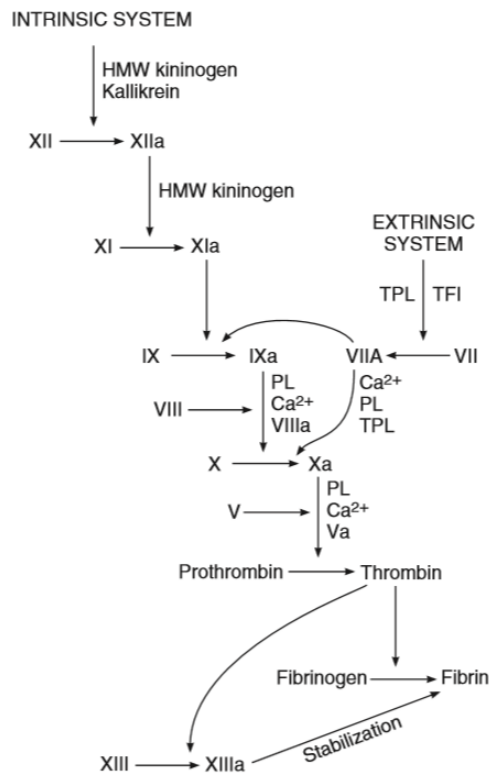
Gli organi più a rischio, dal punto di vista della sopravvivenza dell'animale, sono encefalo e cuore, ed è proprio a livello delle concamerazioni cardiache che il rischio di coagulo è maggiore.

Dalle camere cardiache gli emboli possono spostarsi, attraverso le coronarie, al miocardio (causando un infarto cardiaco) ed all'encefalo attraverso le diramazioni dell'aorta (causando un ictus o un'ischemia encefalica).

I meccanismi con i quali l'organismo dei cetacei sembra prevenire, o quantomeno contenere, i danni causati da eventuali tromboembolismi sono due:

- Il deficit del Fattore XII o di Hageman (Semba et al., 1998);
- Le reti mirabili.

Grazie all'assenza del Fattore XII, il primo per importanza nella cascata della coagulazione intrinseca (Figura 57), il fenomeno della coagulazione intravasale nei cetacei è enormemente rallentato (Ridgway, 1976; Tibbs et al., 2005).



**Figura 57** La cascata di coagulazione (via intrinseca ed estrinseca): a, active form; TFI, tissue factor pathway inhibitor; TPL, tissue thromboplastin.

Anche in caso quindi di rallentamento del circolo e di ristagno del sangue, il lasso di tempo richiesto per la formazione di un trombo è maggiore che nei mammiferi terrestri.

Per quanto riguarda invece le reti mirabili, sappiamo come esse suppliscano il circolo encefalico andando a sostituirsi completamente alle arterie carotidi, in particolare alla carotide interna, che risulta oblitterata.

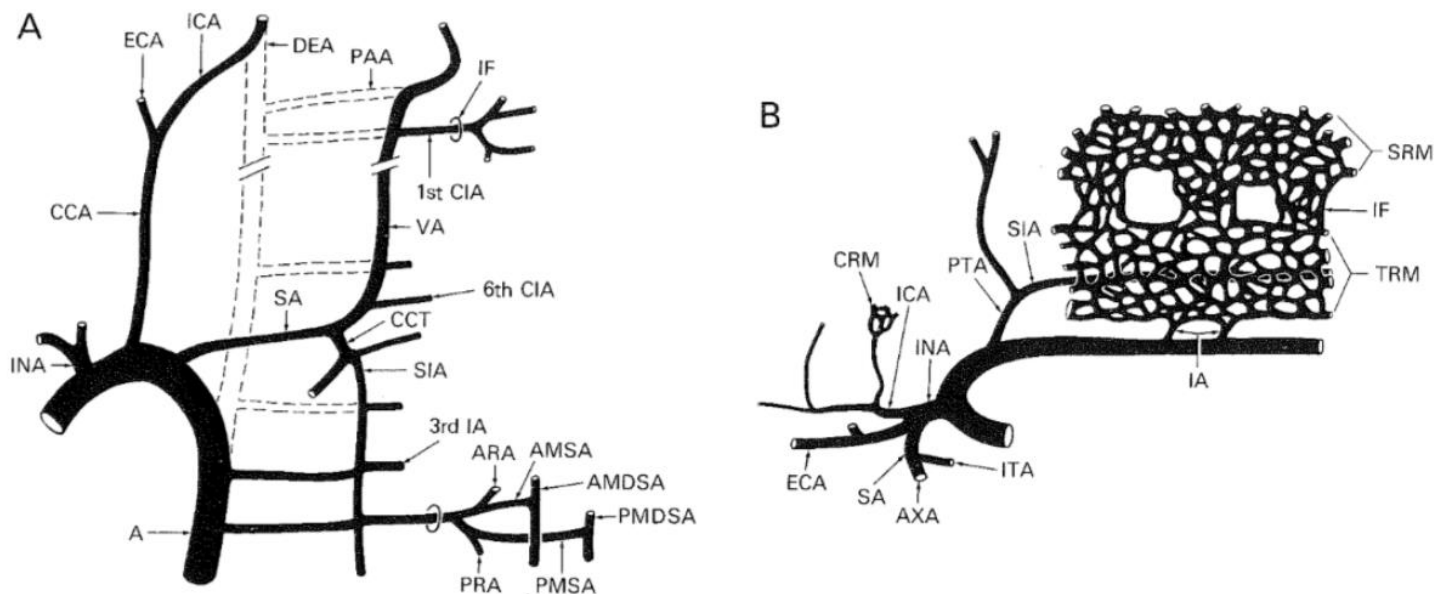
Nell'uomo e nell'orso, *Ursus americanus* (Anderson et al., 1989) l'ostruzione di una sola delle carotidi, che rappresentano la principale via di afflusso sanguigno all'encefalo, causerebbe la morte del soggetto.

La situazione è diversa in altri mammiferi terrestri, come il cane, dove la legatura monolaterale delle carotidi permette comunque la sopravvivenza dell'animale (Whisnat et al., 1956).

Questo per via dell'apporto delle arterie vertebrali e basilare: nel cane e negli artiodattili terrestri sono infatti queste le principali vie di ossigenazione dell'encefalo, e non le carotidi.

Inoltre, è importante considerare la presenza del circolo arterioso cerebrale, il quale connette il circolo delle arterie vertebrali e basilare con quello delle carotidi comuni, permettendo l'irrorazione anche delle aree supplite dalle carotidi.

Tuttavia, anche nel cane e negli artiodattili terrestri, un'occlusione delle arterie vertebrali e basilare, causata da un embolo, andrebbe ad intaccare l'ossigenazione dei tessuti encefalici malgrado la presenza dei circoli secondari, comportando la morte dell'animale.



**Figura 58** Confronto tra la configurazione arteriosa toraco-spinale classica e quella dei cetacei: A, aorta; AMDSA, anterior median spinal artery; AMSA, anterior medullary segmental artery; ARA, anterior radicular artery; AXA, axillary artery; CCA, common carotid artery; CCT, costocervical trunk; CRM, carotid rete mirabile; DEA, dorsal embryonic aorta; ECA, external carotid artery; IA, intercostal artery; ICA, internal carotid artery; IF, intervertebral foramen; INA, innominate artery; ITA, internal thoracic artery; PAA, pro-atlantal intersegmental artery; PMDSA, posterior median spinal artery; PMSA, posterior medullary segmental artery; PRA, posterior radicular artery; PTA, posterior thoracic artery; SA, subclavian artery; SIA, supreme intercostal artery; SRM, spinal rete mirabile; TRM, thoracic rete mirabile; VA, vertebral artery (McFarland et al., 1979).

I cetacei invece, come sappiamo, non possiedono un circolo arterioso cerebrale che possa fungere da circolo secondario e l'unico apporto di sangue all'encefalo avviene attraverso l'arteria toracica posteriore e le arterie intercostali.

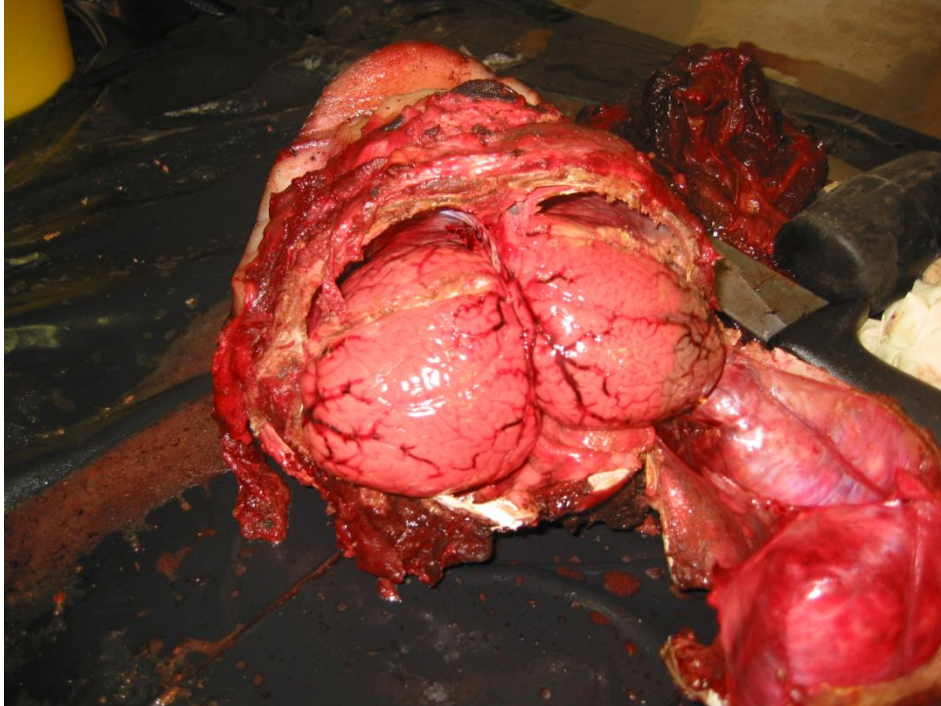
La strategia su cui si basa il loro meccanismo per prevenire le patologie da tromboembolismo, oltre la maggiore fluidità del sangue, non può basarsi quindi su un circolo secondario.

Infatti, piuttosto che avere dei vasi di grosso calibro come afferenze cerebrali, essi hanno le reti mirabili: le arterie si diramano in tanti piccoli vasi, i quali diminuiscono di calibro, aumentano la propria lunghezza e la propria toruosità.

In questo modo non esiste una via di afferenza principale, ma soltanto centinaia di vie secondarie, all'interno delle quali eventuali emboli possono andare ad arenarsi, magari ostruendo uno o più vasi, ma senza intaccare l'apporto sanguigno complessivo, dato che gli altri vasi infatti resteranno pervi e garantiranno l'afflusso di sangue.

La rete mirabile funziona quindi da filtro, impedendo il passaggio di emboli.

In questo modo i cetacei sono doppiamente protetti contro i rischi di tromboembolismo, sebbene, come si può vedere in Figura 59, in casi estremi tale fenomeno possa ancora verificarsi (*personal communication*).



**Figura 59** Necropsia eseguita ad Imperia su una stenella striata (*Stenella coeruleoalba*) in data 23.03.2004: a livello di encefalo sono stati rinvenuti emboli di natura ematica e gassosa (si ringrazia il dottor. Walter Mignone).

### ***5.3 Il problema della regolazione delle reti mirabili***

Per comprendere appieno il perché sia necessario che le reti mirabili siano sottoposte a qualche tipo di controllo, bisogna prima riassumere gli agenti pressori che influiscono sulla circolazione sanguigna.

Come detto anche precedentemente, i fluidi scorrono attraverso i vasi sanguigni secondo un gradiente di pressione, ovvero da un punto a pressione maggiore verso un punto a pressione minore. Il volume di fluido trasportato per unità di tempo aumenta all'aumentare del gradiente di pressione e diminuisce con l'aumentare della resistenza (R).

Quindi il Flusso (Q) è pari a:

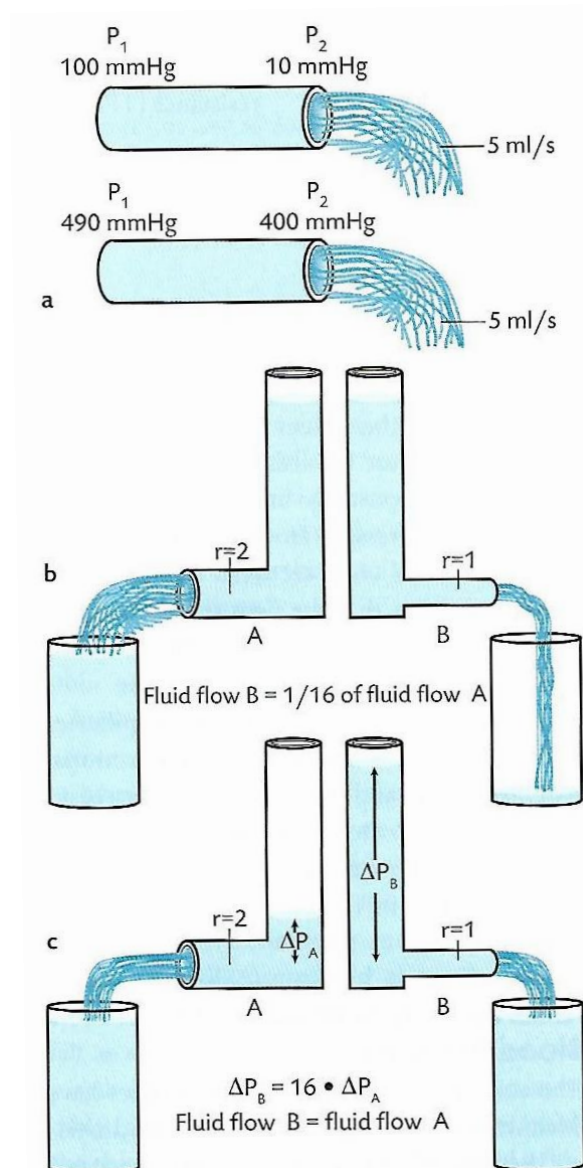
$$Q = \frac{\text{Differenza di pressione } (\Delta P)}{\text{Resistenza (R)}}$$

Si noti come sia la differenza di pressione, e non il valore assoluto delle pressioni a monte e a valle, a determinare il flusso.

Come già sappiamo, la Resistenza è direttamente proporzionale alla viscosità del sangue ed alla lunghezza dei vasi, inversamente proporzionale al raggio al quadrato.

Da ciò consegue che, in caso di aumento della resistenza vasale, il cuore dovrà generare più forza di eiezione per mantenere una circolazione adeguata.

La Figura 60 risulta in questo caso molto esplicativa.



**Figura 60** Rappresentazione degli effetti di pressione e diametro sul flusso attraverso un tubo: **a)** è la differenza di pressione tra la fine e l’inizio del tubo, e non il valore assoluto della pressione, ad influenzare la portata del flusso. **b)** il flusso varia secondo la potenza alla quarta del raggio del tubo. **c)** quando il raggio del tubo è dimezzato, la portata del flusso può essere mantenuta con un incremento della pressione di 16 volte (Sjaastad et al., 2010).

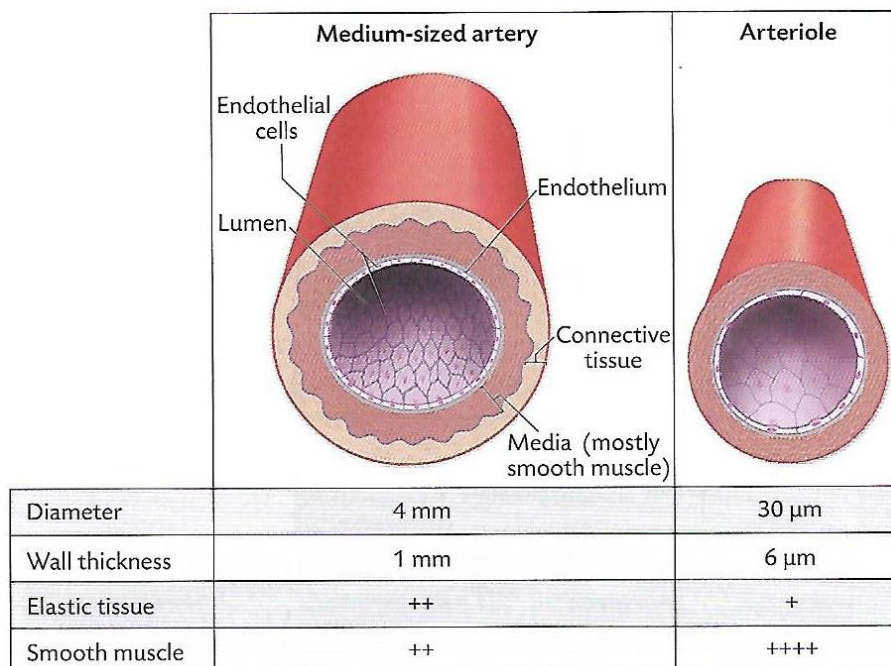
Con l’aumentare quindi della ramificazione dei vasi, la velocità del flusso sanguigno cala proporzionalmente, e questo è maggiormente vero in presenza delle reti mirabili, le quali vanno a costituire dei veri e propri labirinti di vasi arteriosi.

In assenza di un sistema di controllo pressorio per queste reti, il sangue non sarebbe in grado di arrivare a perfondere gli organi vitali a causa dell’enorme resistenza vasale posta in serie tra il cuore e l’encefalo.

Un qualche tipo di controllo deve essere quindi per forza presente.

Allo studio istologico le reti mirabili si sono dimostrate avere una parete composta per due terzi da muscolatura liscia e per un terzo da fibre elastiche.

In questi termini possiedono quindi caratteristiche intermedie tra un'arteria di medio calibro e delle arteriole, come si evince dalla Figura 61.



**Figura 61** Aspetti strutturali dei vasi sanguigni della circolazione sistemica: arterie di medio calibro e arteriole (Sjaastad et al., 2010).

Quali sono i meccanismi che, negli animali domestici, regolano il flusso all'interno di questi due tipi di vasi?

Per dimensioni, i vasi delle reti mirabili sono più simili alle arteriole, le quali nei mammiferi terrestri sono sotto controllo di due diversi meccanismi:

- Esterno, tramite regolazione neuro-ormonale;
- Locale, tramite autoregolazione, la quale può essere di tipo metabolico o pressorio.

Regolazione neuro-ormonale: nei mammiferi terrestri le arteriole sono normalmente innervate da fibre di tipo simpatico, le quali possono avere come mediatore la norepinefrina oppure l'acetilcolina; fibre di tipo parasimpatico sono invece presenti negli organi sessuali a funzione erettile (pene e clitoride).

La possibilità di indagare il tipo di innervazione dei vasi arteriosi delle reti mirabili non è tuttavia stata attuabile nel corso di questa tesi, dato che allo studio immunohistochimico i risultati sono stati negativi.

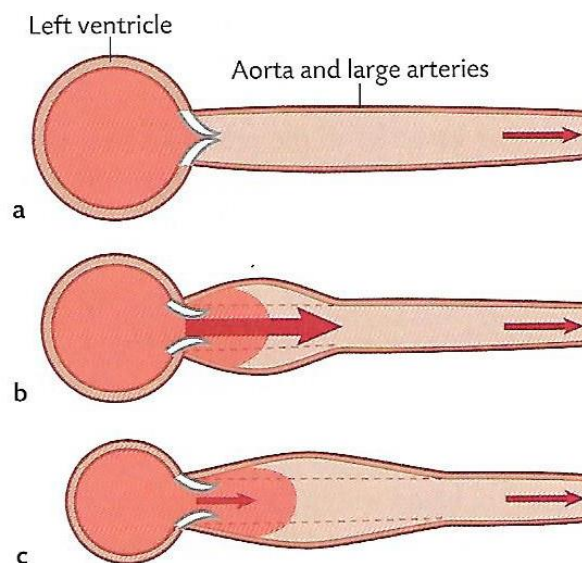
Autoregolazione: cambiamenti locali nella composizione del liquido extracellulare ( $pO_2$ ,  $K^+$  e  $pH$ ) unitamente alla produzione di ossido nitrico (NO) da parte delle cellule endoteliali, portano solitamente ad una vasodilatazione delle arteriole (regolazione locale di tipo metabolico).

Similmente, quando si ha una caduta della pressione intravasale, si assiste ad una vasodilatazione grazie al rilassamento della muscolatura liscia parietale, mentre in caso di aumento della pressione intravasale si assiste ad una vasocostrizione per contrazione delle miofibrille muscolari lisce (autoregolazione pressoria).

Entrambi questi meccanismi potrebbero essere validi per i vasi arteriosi delle reti mirabili, tuttavia bisogna tener conto anche della componente elastica che essi possiedono.

Un'altra possibilità infatti è che essi agiscano in maniera simile all'aorta: le relative proprietà elastiche delle loro pareti potrebbero permettere di incamerare, attraverso lo stiramento, parte della forza pulsatile prodotta dal cuore.

Se ciò fosse vero, tale forza elastica potrebbe poi essere trasmessa, in fase di diastole, al sangue così da sostenere il flusso sanguigno (Figura 62).



**Figura 62** Proprietà elastiche dell'aorta: quando il sangue viene eiettato dal ventricolo sinistro, parte dell'energia viene immagazzinata nella parete del vaso sotto forma di stiramento della parete (da **a** a **b**). Durante la fase di diastole (**c**) le pareti del vaso ritornano allo stato iniziale e trasmettono la forza immagazzinata al sangue, sostenendo il flusso sanguigno (Sjaastad et al., 2010).

Questa capacità potrebbe essere estremamente utile nelle fasi di immersione: qualora la frequenza cardiaca calasse drasticamente, le reti mirabili potrebbero funzionare come dei “secondi cuori”.

Da dati di letteratura (Lillie et al., 2013) sappiamo come le reti mirabili siano poco espandibili (solo il 14% nella balenottera comune) tuttavia in questo caso va considerata la grande estensione delle reti.



Le loro minime proprietà elastiche infatti, se sommate, potrebbero comunque garantire l'immagazzinamento di una quantità sufficiente di forza elastica totale, tale da essere in grado di coadiuvare il cuore nel far progredire in maniera efficiente il sangue verso l'encefalo, senza tuttavia conferirgli un flusso di tipo pulsatile.



## 6. PROSPETTIVE FUTURE

- Poiché il presente studio suggerisce l'importanza delle reti mirabili durante la fase di immersione ed il loro ruolo come riserva di sangue ossigenato, la loro regolazione dovrebbe essere approfondita con ulteriori studi, così da poter chiarire le criticità esposte nel capitolo precedente.
- Essendo stata stimata in questo studio la vasocostrizione media del circolo sanguigno in fase di immersione, appare utile per il futuro procedere con il calcolo delle vasocostrizioni specifiche per ogni organo ed apparato.
- Nel corso della ricerca bibliografica preliminare per questa tesi e dello studio della dinamica dei fluidi, ci si è obbligatoriamente confrontati con la problematica dei gas disciolti nel torrente circolatorio e della variazione della loro pressione parziale nel corso delle fasi d'immersione.

Sebbene tale tema non facesse parte del presente studio, è auspicabile che esso venga sviluppato in futuro.

Ancora non è chiaro infatti come sia possibile per i cetacei immergersi a profondità fino a centinaia di volte superiori a quelle che per un mammifero terrestre (uomo compreso) risulterebbero incompatibili con la vita, e le svariate ipotesi includono ancora una volta le reti mirabili.

Esse infatti potrebbero funzionare come una sorta di valvola in grado di “chiudersi” e ridurre l'afflusso di sangue, e quindi dei gas, agli organi vitali durante l'immersione (limitando gli effetti della tossicità da ossigeno) e di “aprirsi” in fase di risalita repentina.

In questo secondo caso, esse andrebbero a costituire una sorta di fondo cieco per gli emboli gassosi (similmente a quanto detto per il fenomeno del tromboembolismo), reclutandoli fino a che essi non si riequilibrino con la pressione sanguigna, permettendo in questo modo ai gas di ri-disciogliersi all'interno del mezzo fluido.



## **7. ALLEGATI**

### ***7.1 Drenaggio venoso di uomo e cetacei***

#### ***7.1.a Dispositivo venoso endocranico nell'uomo***

Il dispositivo venoso che drena il sangue dall'encefalo e da buona parte delle meningi non ricalca il dispositivo arterioso (come invece accade di solito), ma presenta caratteristiche del tutto diverse.

Le vene superficiali e profonde che si sviluppano dagli organi venosi non sono satelliti delle arterie, e risultano sottili ed anastomizzate tra di loro a formare delle grandi maglie.

Le venule più grosse, formatesi per confluenza dei vasi venosi di calibro minore, attraversano lo spazio intra-aracnoideale per sfociare in voluminose formazioni venose situate nello spessore della dura madre o tra di essa ed il tavolato osseo, le quali prendono il nome di seni venosi della dura madre.

Questi vanno poi a confluire in due punti simmetrici alla base del cranio, dove si forma il bulbo venoso dal quale prende origine la vena giugulare interna.

Il seno cavernoso (ovvero quello di nostro interesse) fa parte dei seni della base assieme ai seni intercavernosi e al seno (o plesso) basilare.

Esso è situato ai lati della sella turcica contro il corpo dello sfenoide, possiede un contorno piuttosto irregolare, con un diametro massimo antero-posteriore di 2 cm ed uno spessore trasversale di 1 cm, e la sua cavità è inframmezzata da numerose lamine e trabecole che gli conferiscono un aspetto spugnoso.

Tra le maglie dei vasi passano l'arteria carotide interna ed il nervo abducente, mentre gli altri nervi della base sono contenuti nella sua parete laterale, costituita dalla dura madre.

Il seno cavernoso riceve anteriormente il sangue del sistema venoso dell'orbita attraverso le vene oftalmiche e la vena centrale della retina (rispecchiando, in questo caso, la vascolarizzazione arteriosa).

#### ***7.1.b Drenaggio venoso nei cetacei***

Per quanto riguarda il sistema di drenaggio venoso, molte delle principali vene che drenano la testa degli odontoceti trovano delle analoghe nei mammiferi terrestri, tuttavia esistono alcune divergenze significative, soprattutto nelle regioni associate con corpi grassi a funzione acustica e con il sistema dei seni aerei accessori.

Ancora non è chiaro se i plessi venosi dei seni aerei accessori possano essere considerati omologhi dei plessi pterigoidei di mammiferi domestici come cavallo, vacca e cane, tuttavia lo sviluppo e la complessità che tali plessi hanno raggiunto nei cetacei non ha eguali nelle specie terrestri..

Nei tursiopi (la specie più studiata) i seni cavernosi fungono da connessione tra il circolo venoso cerebrale e i plessi venosi del sistema dei seni accessori.

Essi sono direttamente connessi con le vene meningee medie, i plessi oftalmici, i seni petrosi ventrali, i plessi pterigoidei e le vene emissarie passanti per il *foramen* ovale (Galliano et al., 1966; Costidis e Rommel, 2016a).

Per quanto riguarda il drenaggio della testa, la vena giugulare esterna costituisce, nel tursiope così come nei mammiferi domestici, la principale via di deflusso, soprattutto dell'area pterigoidea, anche se un importante contributo viene dato dalla vena giugulare interna.

Tuttavia nei delfinidi, la vena linguo-facciale non si continua dalla giugulare esterna, ma dal tronco brachiocefalico, e in alcuni emerge assieme alla giugulare interna come un tronco comune.

Anche la vena facciale non segue lo schema classico, dando vita alla vena mandibolare, che nelle specie terrestri deriva invece dalla vena mascellare.

I plessi associati con i corpi adiposi mandibolari e con il sistemi dei seni accessori vengono drenati principalmente da 3 vene: facciale, giugulare esterna, giugulare interna.

- Vena facciale: a livello della cresta para-occipitale ed appena lateralmente al punto di attacco dell'osso timpanoiale, la vena facciale si triforca in: due grosse vene (rispettivamente laterale e ventromediale) e una massa plessiforme mediana di piccole vene.

Il ramo laterale si estende dorsolateralmente passando al di sotto del condilo mandibolare fino a plesso oftalmico esterno, melone, “nasal plugs” e “dorsal lips”.

Questo primo ramo è sostanzialmente assimilabile, per localizzazione e drenaggio, alla vena facciale dei mammiferi terrestri.

La ramificazione mediana può emergere singolarmente o come tante piccole venule, in entrambi i casi si ha la formazione di un plesso che va ad infiltrarsi nel tessuto connettivo associato l'orecchio interno; assieme alle vene del plesso pterigoideo, contribuiscono anche alla formazione di un plesso fibro-venoso attorno alla bolla timpanica.

Il terzo ramo, di calibro molto simile al primo, forma una anastomosi con la vena mascellare, con la quale si unisce a formare una vena più spessa che arriva fino a livello della cartilagine del cheratoioide; a questo livello, la vena emette le più piccole vene linguale e faringea, prima di curvare dorsalmente e proseguire lungo la cresta pterigoidea.

Occasionalmente la vena linguale può non emergere dalla vena mascellare, ma dalla vena facciale.

- Vena giugulare interna: può emergere dal tronco brachiocefalico sia come vaso unico sia assieme alla vena linguofacciale; il suo contributo più caudale è dato da numerose anastomosi che vanno a fondersi con il plesso della giugulare esterna, il quale circonda l'arteria carotide esterna, andando a formare un PAVR (*peri-arterial venous rete*).

Da questo punto in poi, la giugulare esterna continua nella vena mascellare e drena la maggior parte del plesso pterigoideo, così come le regioni nasofaringea, palatina e nasale dorsale (per via delle anastomosi, uno dei ruoli della giugulare interna può essere considerato quello di facilitare il drenaggio di queste regioni).

Un secondo e un terzo ramo originano assieme da una biforcazione distale della giugulare interna: il ramo più prossimale si dirige verso il seno petroso ventrale, mentre l'altro passa attraverso il forame giugulare e costituisce la parte terminale della giugulare interna, andando a fondersi con i seni temporale, sigmoide e trasverso della dura madre, costituendo una delle principali vie di deflusso del circolo encefalico.

- Vena giugulare esterna: emerge direttamente dal tronco brachiocefalico come una struttura plessiforme, composta da piccole e grosse vene che circondano l'arteria carotide esterna.

La porzione ventrale di questo plesso si contraddistingue per la presenza di una vena di calibro nettamente superiore rispetto alle altre e che costituisce la giugulare esterna vera e propria. Procedendo verso la testa, essa riceve numerose anastomosi dalla giugulare interna e dalla vena facciale, per poi continuarsi nella vena mascellare nel suo decorso lungo le creste basioccipitale e pterigoidea.

In tutto il suo decorso, la giugulare esterna forma numerosi rami e innumerevoli piccole anastomosi con altre vene tributarie; i rami principali (come già accennato) si dirigono verso le regioni palatina, nasofaringea e nasale dorsale: nel suo percorso verso la parte rostro-ventrale della scatola cranica, la vena mascellare emette vene plessiformi che si irradiano nei tessuti dorsali della cavità orale, prendendo quindi la denominazione di vene palatine e formando il plesso palatino.

Prima di suddividersi in innumerevoli venule destinate al plesso pterigoideo, il quale riveste le pareti del seno pterigoideo e drena i muscoli pterigoidei, la vena mascellare emette dei rami diretti rostro-dorsalmente fino ai muscoli palato-faringei, dove si anastomizzano con le vene palato-faringee derivanti dalla giugulare esterna e con un plesso faringeo posto attorno alla parte rostrale dell'esofago e alle cartilagini della laringe.

A questo livello la vena mascellare perde la propria singolarità e diventa indistinguibile, andando a formare parte del plesso pterigoideo associato al sistema dei seni accessori (Costidis e Rommel, 2012; Costidis e Rommel, 2016b).

## **7.2 Schede dettagliate per *G. griseus*, *S. coeruleoalba* e *Z. cavirostris***

### **ID 54**

Soggetto: Grampo (*Grampus griseus*), M, adulto, cm 325, kg 296

Località: Genova

Data prima segnalazione: 03.02.04

Evento: appena morto, spiaggiamento

Stato di conservazione: buono

Note: soggetto già presente nella banca dati al momento dell'inizio di questa tesi, le sedi di prelievo delle reti mirabili non sono note.

### **ID 87**

Soggetto: Grampo (*Grampus griseus*), F, adulto, cm 290, kg 270 ca.

Località: Ancona

Data prima segnalazione: 19.06.05

Evento: esemplare recuperato vivo ed ospedalizzato, poi deceduto

Stato di conservazione: buono, soggetto refrigerato subito dopo il decesso

Note: soggetto già presente nella banca dati al momento dell'inizio di questa tesi, le sedi di prelievo delle reti mirabili non sono note.

### **ID 376**

Soggetto: Zifio (*Ziphius cavirostris*), M, cucciolo, cm 305, kg /.

Località: Lampetia-Cetraro (CS)

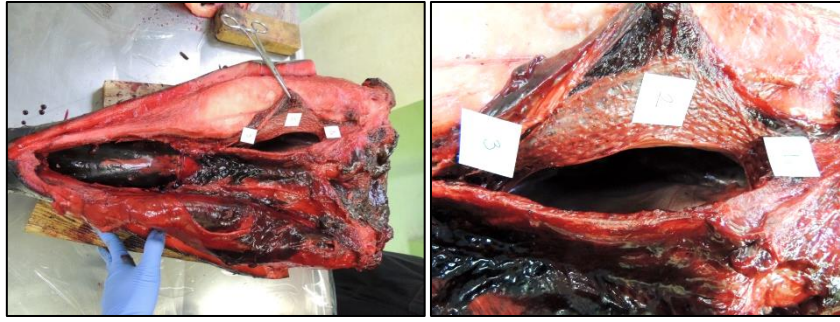
Data prima segnalazione: 02.11.15

Evento: spiaggiamento

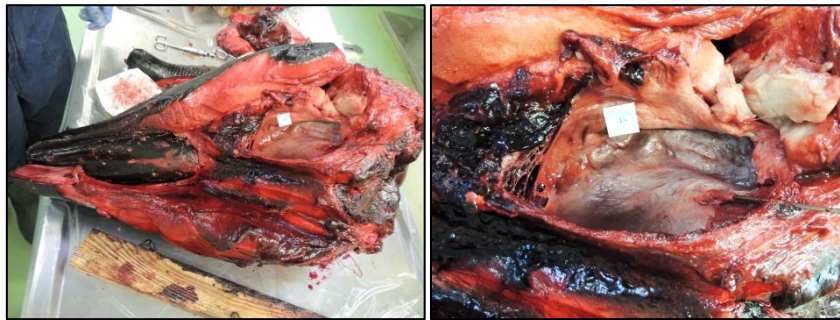
Stato di conservazione: buono

Note: essendo avvenuto il ritrovamento nei mesi di sviluppo di questa tesi, campioni dalla regione della testa sono stati personalmente prelevati, ridotti ed inclusi in paraffina (foto).

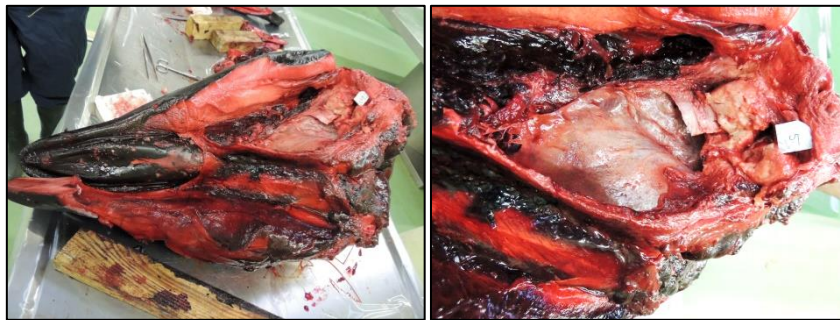




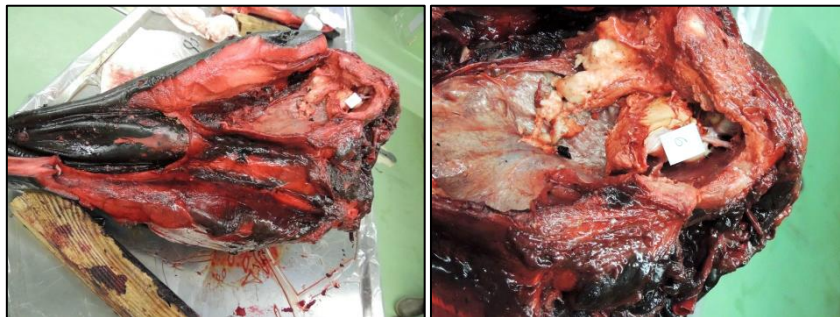
**Figura 63** Seno pterigoideo (1 posteriore, 2 medio e 3 anteriore), a destra: particolare.



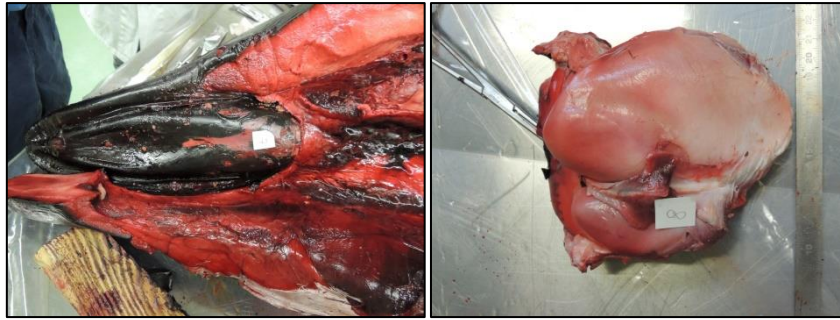
**Figura 64** Seno pterigoideo (profondo), a destra: particolare.



**Figura 65** Seno peribullare superficiale, a destra: particolare.



**Figura 66** Seno peribullare profondo (tolto timpanico), a destra: particolare.



**Figura 67** Palato.

**Figura 68** Setto nasale membranoso.

Il ritrovamento di questo esemplare di zifio ci permette di effettuare un interessante confronto tra le reti mirabili degli odontoceti di bassa profondità, che sono l'oggetto della nostra trattazione, e le reti mirabili degli odontoceti di grande profondità.

### **ID 387**

Soggetto: *Stenella striata* (*Stenella coeruleoalba*), M, adulto, cm 290, kg 91,5.

Località: Laguna di Venezia

Data prima segnalazione: 08.04.16

Evento: soggetto rinvenuto al largo

Stato di conservazione: molto buono

Note: essendo avvenuto il ritrovamento nei mesi di sviluppo di questa tesi, campioni dalla regione della testa sono stati personalmente prelevati, ridotti ed inclusi in paraffina (foto).

### 7.3 Protocollo ematossilina-eosina

#### Soluzioni

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

Sciogliere l'ematossilina in alcool assoluto, aggiungere l'allume che è stato sciolto in acqua calda.

Portare la miscela vicino al punto di ebollizione e aggiungere il sodio iodato.

Raffreddare rapidamente e quando la soluzione è fredda aggiungere l'acido acetico.

B. Eosina. Preparare la soluzione stock:	Eosina	0.2 g
	Floxina	0.5 g
	Acqua d.	40 ml
	Alcool 95°	160 ml

A questa soluzione aggiungere 600 ml di alcool 80° e 4 ml di acido acetico glaciale

C. HCl 1%.

#### Metodica

1. 5 minuti in xilolo 1;
2. 5 minuti in xilolo 2;
3. 5 minuti in xilolo 3;
4. 3 minuti in alcool 100°;
5. 3 minuti in alcool 100°;
6. 3 minuti in alcool 95°;
7. 3 minuti in alcool 70°;
8. Sciacquare in acqua d.;
9. 10-12 minuti in ematossilina di Harris;
10. 5 minuti in acqua di fonte;
11. Sciacquare in acqua d.;
12. Alcuni secondi in HCl 1%;
13. 5 minuti in acqua di fonte;
14. Sciacquare in acqua d.;
15. 30-40 secondi in eosina;
16. Scala ascendente di alcoli;
17. Xiloli e montaggio.

## 7.4 Protocollo immunoistochimica

### GIORNO 1

- Sparaffinatura in xilolo (3 x 5') e scala ascendente alcol (5 x 3');
- **Smascheramento antigene** (uno dei due):
  - a) Tampone citrato pH 6 in autoclave per 4 min a 120°C;  
NB: non avvitare il tappo delle torrette fino in fondo e prima di azionare l'autoclave controllare sempre che la spirale sul fondo sia coperta d'acqua (MilliQ);
  - b) Tripsina 0.1% in Tris-HCl pH 7.2 (0.1 g di tripsina per 100 ml di Tris-HCl) per 10 min a 37°C (pre-riscaldare il tampone!);
- **Inattivazione perossidasi endogene**: incubare in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% in Met-OH o PBS pH 7.4 per 30 min a temperatura ambiente (RT, room temperature);
- 2 x 3 min lavaggi in PBS;
- Preparare soluzione madre da usare per saturazione, anticorpo primario (AbI) e secondario (AbII): PBS pH 7.4 con NGS 5% e Triton 0.2%; per i volumi considerare 100-150 µl di soluzione per vetrino;
- **Saturazione siti specifici**: incubare in soluzione madre per 1 h a RT;
- Eliminare la soluzione senza lavaggi;
- Incubare con AbI 1:500 (controllare sempre la diluizione su datasheet) per 1 h a RT e poi overnight in frigo a 4°C.

### GIORNO 2

- 2 x 3 min lavaggi in PBS;
- Incubare con AbII 1:200 per 1 h a RT;  
NB: mentre agisce l'AbII preparare il complesso SBC (avidina-biotina, kit in frigo) almeno 30 min prima dell'utilizzo: 2.5 ml di PBS + una goccia A + una goccia B
- 2 x 3 min lavaggi in PBS;
- Incubare in ABC per 1 h a RT;  
NB: preparare DAB in apposita boccetta e lasciare in frigo avvolta in stagnola (DAB è fotosensibile): 2.5 ml H<sub>2</sub>O MilliQ + una goccia di buffer + 2 gocce di Dab + 1 goccia di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- 2 x 3 min lavaggi in PBS;
- Aggiungere DAB (controllare a occhio nudo lo sviluppo della colorazione);
- Per interrompere la reazione della DAB immergere i vetrini in H<sub>2</sub>O di rubinetto, poi in H<sub>2</sub>O MilliQ prima della scala ascendente;
- Eventuale controcolorazione con Ematossilina (max 2 min), risciacquo in acqua corrente e poi MilliQ;
- 5 x 3 min alcol + 3 x 5 min xilo.

NB: per eliminare DAB e ciò con cui è venuta in contatto aggiungere varechina e poi gettare nel bidone dei tossici.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abdi M, Navidbakhsh M, Razmkon A (2016) A lumped parameter method to calculate the effect of internal carotid artery occlusion on anterior cerebral artery pressure waveform. *J. Biomed. Phys. Eng.* 6: 33-40.
- Anderson BG, Anderson WD, Seguin RJ (1989) Arterial supply and venous drainage of the brain of the black bear (*Ursus americanus*). *Acta Anat.* 135: 285-288.
- Ask-Upmark E (1935) The carotid sinus and the cerebral circulation. An anatomical, experimental and clinical investigation, including some observations on rete mirabile caroticum. *Acta Psychiatr. Neurol.* 6:1-374.
- Bagnoli P, Peruffo A, Costantino ML, Cozzi B (2011) The upper respiratory tract of dolphins. *Ital. J. Anat. Embryol.* 116: 159-164.
- Bairati A (1973) Trattato di anatomia umana, morfologia generale e sistematica dell'uomo. Vol. 6, Edizioni Minerva Medica.
- Baker MA, Chapman LW (1977) Rapid brain cooling in exercising dogs. *Science* 195: 781-3.
- Baldwin BA (1964) The anatomy of the arterial supply to the cranial regions of the sheep and ox. *Am. J. Anat.* 115: 101-118.
- Berta A, Ekdale EG, Cranford TW (2014) Review of the cetacean nose: form, function, and evolution. *Anat. Rec.* 297: 2205-2215.
- Breschet (1836) Histoire anatomique et physiologique d'un organe de nature vasculaire découvert dans les cétacés. Bechet Jeune, Paris, pp. 1-82.
- Bugge J (1978) The cephalic arterial system in carnivores, with special reference to the systematic classification. *Acta Anat.* 101: 45-61.
- Cole FJ (1949) A history of comparative anatomy. From Aristotele to the eighteenth century. Macmillan Press Ltd, London, pp 1-524.
- Costidis A, Rommel SA (2012) Vascularization of air sinuses and fat bodies in the head of the Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): morphological implications on physiology. *Front. Physiol.* 3: 243.
- Costidis AM, Rommel SA (2016a) The extracranial arterial system in the heads of beaked whales, with implications on diving physiology and pathogenesis. *J. Morphol.* 277: 5-33.
- Costidis AM, Rommel SA (2016b) The extracranial venous system in the heads of beaked whales, with implications on diving physiology and pathogenesis. *J. Morphol.* 277: 34-64.
- Cowan DF, Smith TL (1999) Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *J. Anat.* 194: 505-517.
- Cozzi B, Bagnoli P, Acocella F, Costantino ML (2005) Structure and biomechanical properties of the trachea of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba*: evidence for evolutionary adaptations to diving. *Anat. Rec. A* 284: 500-510.

- Cozzi B, Mazzariol S, Podestà M, Zotti A (2009) Diving adaptations of the cetacean skeleton. *Open Zool. J.* 2: 24-32.
- Cunningham JG (2006) *Manuale di fisiologia veterinaria*. III edizione, Antonio Delfino Editore, Roma.
- Cutnell JD, Johnson KW (1998) *Physics*. IV edizione, Wiley, pp 308.
- Diéguez G, Conde MV, Gómez B, Iglesias JR, Marín J, Lluch S (1983) Rete mirabile of goat: in vitro effects of adrenergic stimulation. *Brain Res.* 289: 281-284.
- Ekdale EG, Kienle SS (2015) Passive restriction of blood flow and counter-current heat exchange via lingual retia in the tongue of a neonatal gray whale *Eschrichtius robustus* (Cetacea, Mysticeti). *Anat. Rec.* 298: 675-679.
- Elsner R (1999) Living in water. Solutions to physiological problems. In Reynolds JE III and Rommel SA (Eds.) "Biology of marine mammals". Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 73-116.
- Elsner R, Kenney DW, Burges K (1966) Diving bradycardia in the trained dolphin. *Nature* 212: 407-408.
- Fahlman A, Loring SH, Levine G, Rocho-Levine J, Austin T, Brodsky M (2015) Lung mechanism and pulmonary function testing in cetaceans. *J. Exp. Biol.* 218: 2030-2038.
- Fahlman A, Olszowka A, Bostrom B, Jones DR (2006) Deep diving mammals: Dive behaviour and circulatory adjustments contribute to bends avoidance. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 153: 66-77.
- Fahlman A, Schagatay E (2014) Man's place among the diving mammals. *Hum. Evol.* 29: 47-66.
- Galliano RE, Morgane PJ, McFarland WL, Nagel EL, Catherman RL (1966) The anatomy of the cervicothoracic arterial system in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) with a surgical approach suitable for guided angiography. *Anat. Rec.* 155: 325-338.
- Ghoshal NG, Khamas WAH (1984) Gross and histomorphological study on the rostral epidural rete mirabile of the pig. *Indian J. Anim. Sci.* 55: 304-310.
- Gulland FM, Werner L, O'Neill SO, Lowenstine LJ, Trupkiewitz J, Smith D, Royal B, Strubel I (1996) Baseline coagulation assay values for northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*), and disseminated intravascular coagulation in this species. *J. Wildlife Dis.* 32: 536-540.
- Haines DM, Chelack BJ (1991) Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 101-112.
- Hall JE, (2010) *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. XII edizione, Saunders, U.S.A.
- Hedges NA, Gaskin DE, Smith GJD (1978) Renal morphology and renal vascular system of the harbour porpoise *Phocoena phocoena* (L.). *Can. J. Zool.* 57: 868-875.
- Houser DS, Moore PW, Johnson S, Lutmerding B, Branstetter B, Ridgway SH, Trickey J, Finneran JJ, Jensen E, Hoh C (2010) Relationship of blood flow and metabolism to acoustic processing centers of the dolphin brain. *J. Acoust. Soc. Am.* 128: 1460-1466.

- Irving L, Hart JS (1957) The metabolics and insulation of seals as bare-skinned mammals in cold water. *Can. J. Zool.* 35: 497-511.
- Jobsis PD, Ponganis PJ, Kooyman G L (2001) Effects of training on forced submersion responses in harbour seals. *J. Exp. Biol.* 204: 3877-3885.
- Kaplan HA (1956) Arteries of the brain. *Acta Radiol.* 46: 364-70.
- Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (2012) *Fisiologia*. III edizione, EdiSES-Napoli, Città di Castello.
- Kooyman GL (1973) Respiratory adaptations in marine mammals. *Am. Zool.* 13: 457-468.
- Lillie MA, Piscitelli MA, Vogl AW, Gosline JM, Shadwick RE (2013). Cardiovascular design in fin whales: high-stiffness arteries protect against adverse pressure gradients at depth. *J. Exp. Biol.* 216: 2548-2563.
- Lluch S, Diéguez G, Garcia AL, Gòmez B (1985) Rete mirabile of goat: its flow-damping effect on cerebral circulation. *Am J Physiol* 249: R482-R489.
- Macleod CD, Reidenberg JS, Weller M, Santos MB, Herman J, Goold J, Pierce GJ (2007) Breaking symmetry: the marine environment, prey size, and the evolution of asymmetry in cetacean skulls. *Anat. Rec.* 290: 539-45.
- Malvin RL, Rayner M (1968) Renal function and blood chemistry in Cetacea. *Am. J. Physiol.* 214: 187-191.
- McFarland WL, Jacobs MS, Morgane PJ (1979) Blood supply to the brain of the dolphin, *Tursiops truncatus*, with comparative observations on special aspects of the cerebrovascular supply of other vertebrates. *Neurosci. Biobehav. R.* 3: 1-82.
- Meagher EM, McLellan WA, Westgate AJ, Wells RS, Frierson D, Pabst Jr, Pabst DA (2002) The relationship between heat flow and vasculature in the dorsal fin of wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *J. Exp. Biol.* 205: 3475-3486.
- Miedler S, Fahlman A Valls Torres M, Álvarez TÁ, Garcia-Parraga D (2015) Evaluating cardiac physiology through echocardiography in bottlenose dolphins: using stroke volume and cardiac output to estimate systolic left ventricular function during rest and following exercise. *J. Exp. Biol.* 218: 3604-3610.
- Moore MJ, Hammar T, Arruda J, Cramer S, Dennison S, Montie E, Fahlman A (2011) Hyperbaric computed tomographic measurement of lung compression in seals and dolphins. *J. Exp. Biol.* 217: 1154-1166.
- Nagel E L, Morgane P J, McFarland W L, Galliano R E (1968) Rete mirabile of dolphin: its pressure-damping effect on cerebral circulation. *Science* 161: 898-900.
- Nakajima M (1961) In regard to the *rete mirabile* of the *Cetacea*: With emphasis especially on *Grampidelphis griseus* and *Tursiops truncatus*. *J. Med. Acad. Toho* 8:1-23.
- Ninomiya H, Yoshida E (2007) Functional anatomy of the ocular circulatory system: vascular corrosion casts of the cetacean eye. *Vet. Ophthalmol.* 10: 231-238.
- Noren SR, Cuccurullo V, Williams TM (2004) The development of diving bradycardia in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Comp. Physiol. B* 174: 139-147.

- Noren SR, Kendall T, Cuccurullo V, Williams TM (2012) The dive response redefined: underwater behaviour influences cardiac variability in freely diving dolphins. *J. Exp. Biol.* 215: 2735-2741.
- Noren SR, Williams TM (2000) Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 126: 181-191.
- Ortiz RM (2001) Osmoregulation in marine mammals. *J. Exp. Biol.* 204: 1831–1844.
- Pfeiffer CJ (1997) Renal cellular and tissue specializations in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Aquat. Mamm.* 23: 75-84.
- Pfeiffer CJ, Kinkead TP (1990) Microanatomy of retia mirabilia of bowhead whale foramen magnum and mandibular foramen. *Acta Anat.* 139:141-150.
- Piscitelli MA, Raverty SA, Lillie MA, Shadwick RE (2013) A review of cetacean lung morphology and mechanics. *J. Morphol.* 274: 1425-1440.
- Ponganis PJ (2015) Diving physiology of marine mammals and seabirds. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ponganis PJ, Kooyman GL, Ridgway SH (2003) Comparative diving physiology. In: Bennett and Elliott's Physiology and medicine of diving, Brubakk A, Neuman T S (Eds). Saunders Ltd., Edinburgh, pp. 211-226.
- Reidenberg JS (2007) Anatomical adaptations of aquatic mammals. *Anat. Rec.* 290: 507-513.
- Reynolds III JE, Rommel SA (1999) Biology of marine mammals. Smithsonian Institution Press. U.S.A..
- Ridgway S, Houser D, Finneran J, Carder D, Keogh M, Van Bonn W, Smith C, Scadeng M, Dubowitz D, Mattrey R, Hoh C (2006) Functional imaging of dolphin brain metabolism and blood flow. *J. Exp. Biol.* 209: 2902-2910.
- Ridgway SH (1972) Homeostasis in the aquatic environment. In: Ridgway SH (Ed) Mammals of the sea: biology and medicine. C. C. Thomas Co., Springfield, pp 662-665.
- Ridgway SH (1976) Diving Mammals and Biomedical Research. *Oceanus* 19: 49-55.
- Ridgway SH, Howard R (1979) Dolphin lung collapse and intramuscular circulation during free diving: evidence from nitrogen washout. *Science* 203: 1182-1183.
- Ridgway SH, Johnston DG (1966) Blood oxygen and ecology of porpoises of three genera. *Science* 151: 456-458.
- Ridgway SH, Scronce BL, Kanwisher J (1969) Respiration and deep diving in the bottlenose porpoise. *Science* 166: 1651-1654.
- Schmidt-Nielsen K (1997) Animal physiology: adaptation and environment. Cambridge University Press, Cambridge.
- Semba U, Shibuya Y, Okabe H, Yamamoto T (1998) Whale Hageman factor (factor XII): prevented production due to pseudogene conversion. *Thromb. Res.* 90: 31-37.
- Senger PL (2010) Pathways to pregnancy and parturition. II edizione, Current Conceptions Inc., Washington.



- Silva RG (2004) Assessment of body surface temperature in cetaceans: an iterative approach. *Braz. J. Biol.* 64: 719-724.
- Sjaastad ØV, Sand O, Hove K (2010) *Physiology of domestic animals*. II edizione, Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- Slijper EJ (1936) Die cetaceen vergleichend-anatomisch und systematisch. *Capita Zoologica* 7: 1-590.
- Slijper EJ (1979), *Whales*. II edizione, Hutchinson, London.
- Tibbs R, Elghetany MT, Tran L, Van Bonn W, Romano T, Cowan DF (2005) Characterization of the coagulation system in healthy dolphins: the coagulation factors, natural anticoagulants, and fibrinolytic products. *Comp. Clin. Path.* 14: 95-98.
- Tomilin AG (1967) *Mammals of the U.S.S.R. and adjacent countries*. Israel program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Vogl AW, Fisher HD (1982) Arterial retia related to supply of the central nervous system in two small toothed whales – narwhal (*Monodon monoceros*) and beluga (*Delphinapterus leucas*). *J. Morphol.* 174: 41-56.
- Vogl AW, Todd ME, Fischer HD (1981) An ultrastructural and fluorescence histochemical investigation of the innervation of retial arteries in *Monodon Monoceros*. *J. Morphol.* 168: 109-119.
- Whisnant JP, Millikan CH, Wakim KG, Sayre GP (1956) Collateral circulation to the brain of the dog following bilateral ligation of the carotid and vertebral arteries. *Am. J. Physiol.* 186: 275-277.
- Williams TM, Fuiman LA, Kendall T, Berry P, Richter B, Noren SR, Thometz N, Shattock MJ, Farrell E, Stamper AM, Davis RW (2014) Exercise at depth alters bradycardia and incidence of cardiac anomalies in deep-diving marine mammals. *Nat. Commun.* 6:6055.



## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio sentitamente il prof. Bruno Cozzi per avermi dato l'opportunità di svolgere la tesi in un ambito di ricerca per me affascinante, che mi ha dato grandi soddisfazioni nel corso di questi mesi, e ringrazio infinitamente il dottor Marco Bonato per aver saputo dirigere i miei sforzi verso un chiaro obiettivo.

Senza la pazienza dell'uno e l'incoraggiamento dell'altro, questa tesi sarebbe ben lungi dal potersi definire conclusa.

Un grazie va anche alla dott.ssa Maristella Giurisato, che mi ha aperto le porte del laboratorio, ed uno ancora più grande al dottor Mattia Panin, per essere stato una figura di riferimento nei primi mesi della fase sperimentale.

Sono inoltre grata al prof. Gianfranco Gabai, che ha cortesemente accettato di leggere e dare un'opinione sull'elaborato finale, fornendo utili consigli.

Ringrazio i miei genitori, che mi hanno permesso di compiere questo percorso e mi hanno sempre sostenuta, e ringrazio i miei nonni, tutti, per essere sempre fieri di me: a prescindere da dove essi siano e cosa io stia facendo, loro lo sono e lo saranno sempre.

Ovviamente un riconoscimento particolare va ai miei fratelli, Ludovico e Viviana, per essere la cornice quotidiana della mia vita e per sopportarmi sempre, anche quando non me lo merito.

Ringrazio tutti gli amici e compagni di corso, vicini e lontani, che ci sono stati sia per supportarmi con il lavoro sia per distrarmi da esso (forse cosa ancora più importante, conoscendomi), e in particolare Giulia, che ormai da una vita mi vede ripetermi sempre uguale.

Infine, ultimo ma non ultimo, il ringraziamento più grande che io possa dare va a Samuele, che è stato tenace come una roccia nel permettermi di aggrapparmi a lui nei momenti di difficoltà.

Tante altre sono le persone che dovrei includere in questa lista, e anche se per amor di sintesi non posso farlo, sappiate che la mia gratitudine tocca tutti voi.



*Vien dietro a me, e lascia dir le genti:  
sta come torre ferma, che non crolla  
già mai la cima per soffiar di venti;*

(Dante, Purgatorio, Canto V)