



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dip. di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

STUDIO MORFOLOGICO E FUNZIONALE  
DEL CLAUSTRO NEL TURSIOPE

Relatore: *Chiar.mo Prof. Bruno Cozzi*  
Correlatore: *Dott.ssa Maristella Giurisato*

Laureanda:  
*Giulia Roncon*  
Matricola n.  
562202

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013



*Ad Asia e Cica*

*Azzurri, come il cielo, come il mare, o monti! o fiumi!  
era miglior pensiero ristare, non guardare oltre, sognare;  
il sogno è l'infinita ombra del Vero.  
(G. Pascoli)*







# INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.01
1.1. Il claustrò	pag.03
1.1.1. Ontogenesi	pag.03
1.1.2. Neuroanatomia	pag.04
1.1.3. Funzionalità	pag.05
1.1.4. Il claustrò nei mammiferi	pag.06
1.1.5. Il claustrò nei cetacei	pag.08
1.2. Il <i>Tursiops truncatus</i>	pag.09
1.2.1. Il sistema nervoso e gli organi di senso	pag.10
2. OBIETTIVI	pag.15
3. MATERIALI e METODI	pag.19
3.1. Campionamento	pag.21

3.2. Trattamento dei tessuti	pag.21
3.3. Allestimento dei vetrini	pag.22
3.4. Indagini istologiche	pag.22
3.5. Indagini immunoistochimiche	pag.23
3.6. Osservazione dei preparati	pag.24
4. RISULTATI	pag.25
4.1. Osservazioni macroscopiche	pag.27
4.2. Osservazioni microscopiche	pag.29
4.2.1. Aspetto alla colorazione di Nissl	pag.29
4.2.2. Aspetto alla colorazione immunoistochimica	pag.30
4.2.2.1. Neuroni CR-immunoreattivi	pag.30
4.2.2.2. Neuroni CB-immunoreattivi	pag.32
4.2.2.3. Neuroni PV-immunoreattivi	pag.33
5. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	pag.35
6. BIBLIOGRAFIA	pag.43
7. APPENDICE	pag.51
7.1. Appendice A: I cetacei, evoluzione, classificazione, anatomia	pag.53
7.2. Appendice B: Protocolli colorazioni utilizzate	pag.58
8. RINGRAZIAMENTI	pag.64





## *INTRODUZIONE*



### 1.1. Il claustrum

Il claustrum è un nucleo subcorticale presente in tutti i mammiferi ad eccezione di alcuni monotremi (Edelstein e Denaro, 2004). E' localizzato nella neocorteccia, medialmente all'insula e lateralmente al putamen (Fig.1-2) ed è separato da questi per mezzo di una capsula esterna e di una capsula estrema.

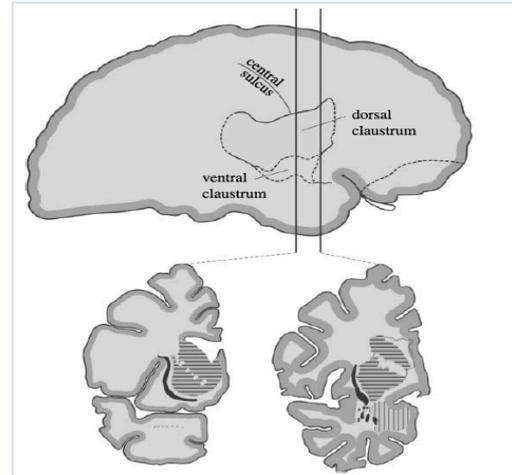


Fig. 1: Rappresentazione del claustrum e suo aspetto in sezione sagittale (sopra) e coronale (sotto). Ai lati raffigurato con strisce orizzontali il putamen. (Crick e Koch, 2005)

#### 1.1.1. Ontogenesi

Sulla sua ontogenesi esistono diverse teorie e gli studiosi che se ne occupano sono divisi in tre grandi gruppi. I “subpalleali” ritengono che il claustrum derivi dal putamen (Pu) e questo sarebbe confermato da alcune ricerche di Cajal (1928), il quale osservò in alcuni pazienti umani l'assenza dell'insula (Ins) in un emisfero e un claustrum invece completamente sviluppato e da alcuni lavori di Macchi (1981) in cui egli dimostrò come in feti umani il claustrum fosse già presente, mentre l'insula fosse ancora in formazione.

I “palleali” al contrario affermano che il claustrum (Cl) derivi dall'insula, data la sua vicinanza anatomica e la struttura simile e questa teoria sarebbe avvalorata dall'ultimo studio di Pirone et al. (2012) sempre basato su campioni umani, in cui grazie a marker specifici per questa zona (quali il Gng2-ir e Netrin-G2) è stato possibile vedere come il loro legame avvenga sia nel Cl che nell'insula ma non nel putamen.

L'ultimo gruppo, negando un'origine esclusivamente corticale o subcorticale del Cl, ne concepisce l'ontogenesi come l'unione delle due teorie precedenti e conferma così l'ipotesi di Filimonoff (1966), secondo cui i neuroblasti dell'insula vicino allo striato formerebbero una parte del Cl e il resto della sostanza grigia sarebbe fornito dal putamen.

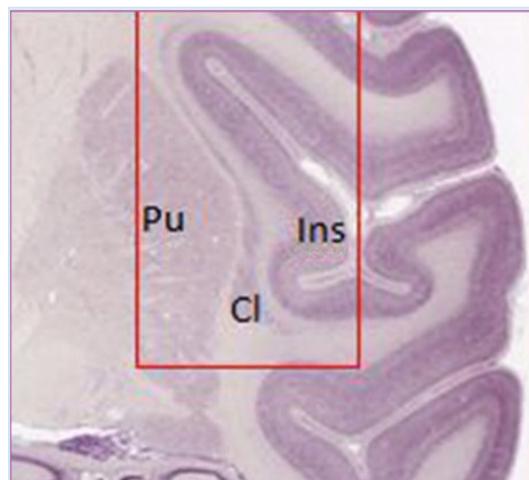


Fig. 2: Sezione istologica che mette in evidenza claustrum (Cl), putamen (Pu) e insula (Ins).

### 1.1.2. Neuroanatomia

Macroscopicamente parlando il CI ha una forma a virgola o vermiforme ed è per questo che in passato è anche stato definito “nucleo teniforme”. La sua conformazione sembrerebbe essere specie-specifica e sarebbe influenzata dalla distribuzione iniziale delle cellule del CI e dall’espansione volumetrica delle strutture a lui adiacenti, quali l’amigdala, lo striato e la sostanza bianca. Anche il suo spessore latero-mediale è molto variabile e può andare da una frazione di millimetro ad alcuni millimetri, trovandosi più o meno in profondità rispetto alla superficie della neorteccia (da qui il nome *claustrum* “nascosto”).

Osservata al microscopio, la citoarchitettura di questo nucleo è molto simile a quella delle strutture attigue con un numero elevato di neuroni semi-piramidali nella parte dorsale e ventrale e cellule fusiformi nella parte insulare.

I neuroni più comuni sono generalmente definiti di “tipo 1” e sono di taglia grande (< 25  $\mu\text{m}$ ) con corpo di forma triangolare o ovale, con dendriti corti o lunghi coperti da spine, osservati per la prima volta durante studi con la tecnica di Golgi nel gatto (LeVay e Sherk, 1981). Gli assoni di queste cellule abbandonano il CI sia lateralmente sia medialmente e costituiscono la principale via di ricezione e proiezione dalla corteccia; i dendriti invece non hanno un orientamento specifico.

Le cellule di “tipo 2” hanno un corpo fusiforme medio (15-25  $\mu\text{m}$ ), con dendriti bipolari senza spine; i loro assoni non abbandonano mai il CI e sono definiti per questo interneuroni.

Infine vi è il “tipo 3”, trovato nel ratto (Raisman, 1980), con soma ovale o rotondo, dimensioni ridotte rispetto ai precedenti (19-25  $\mu\text{m}$ ) e dendriti molto sottili.

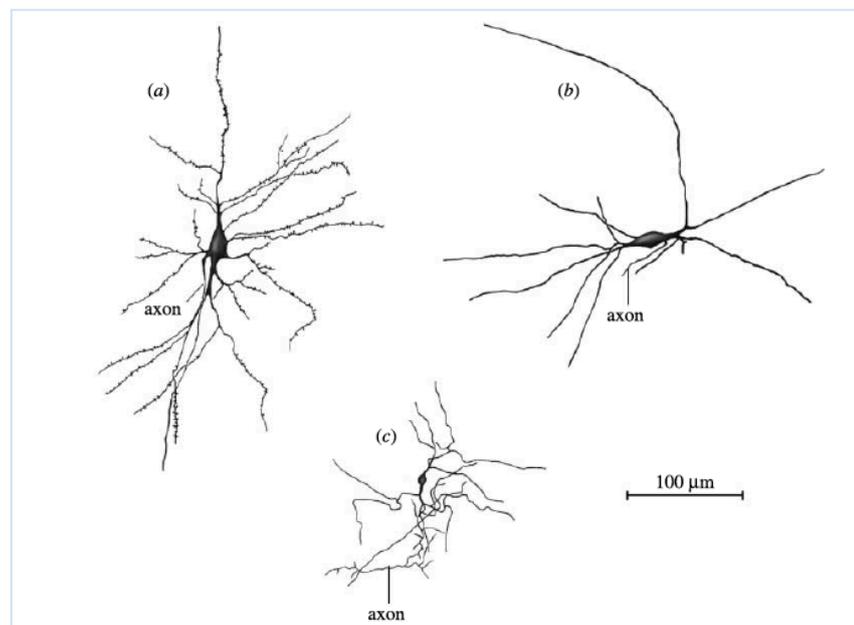


Fig. 3: Rappresentazione dei neuroni presenti nel CI: tipo 1 (a), tipo 2 (b), tipo 3 (c). Braak e Braak, 1982.

### 1.1.3. Funzionalità

Il claustrum risulta essere oggetto di numerosi studi legati alla sua morfologia, ma soprattutto alla sua funzionalità, dato che presenta connessioni con svariate aree dell'encefalo senza che sia stato evidenziato uno specifico ruolo nell'integrazione multisensoriale.

Come per altre strutture encefaliche di cui si è cercato di definire il ruolo fisiologico, anche per il Cl sono stati fatti esperimenti di elettrostimolazione su animali, nonché osservazioni cliniche e di *imaging* nell'uomo.

La maggior parte degli studi si sono svolti sul gatto (Fig.5), che possiede un Cl di dimensioni considerevoli a forma triangolare. Il suo danneggiamento o ablazione ha portato alla scomparsa della risposta condizionata allo stimolo, cambiamenti nell'udito, perdita di alcuni riflessi come la dilatazione pupillare, il leccamento, la deglutizione, l'orripilazione, e a tremori. A questi si sono aggiunti, in seguito a una lesione bilaterale della parte dorsale, anche uno stato di iperattività e polifagia (Ruiz, 1960).

Studiando il Cl del macaco si è notato anche come stimolandone la parte rostrale si possano ottenere effetti quali ipersalivazione, movimenti continui della lingua, abbassamento della mandibola, ammiccamento e quella che si è definita "hand-to-mouth activity" e dagli studi di Minciacchi (1991) come esista un'organizzazione somatosensoriale di questo nucleo legata ai segnali provenienti dai recettori facciali e dagli arti anteriori.

Per quanto riguarda gli aspetti patologici nell'uomo (Fig.4) i primi studi datati 1912-1913 hanno riportato come in pazienti con assenza di questo nucleo o sua

malformazione fosse presente epilessia, artrogrifosi e sintomi simili alla forma giovanile della malattia di Gaucher (malattia da accumulo lisosomiale).

Con l'avvento della diagnostica per immagini, utilizzata

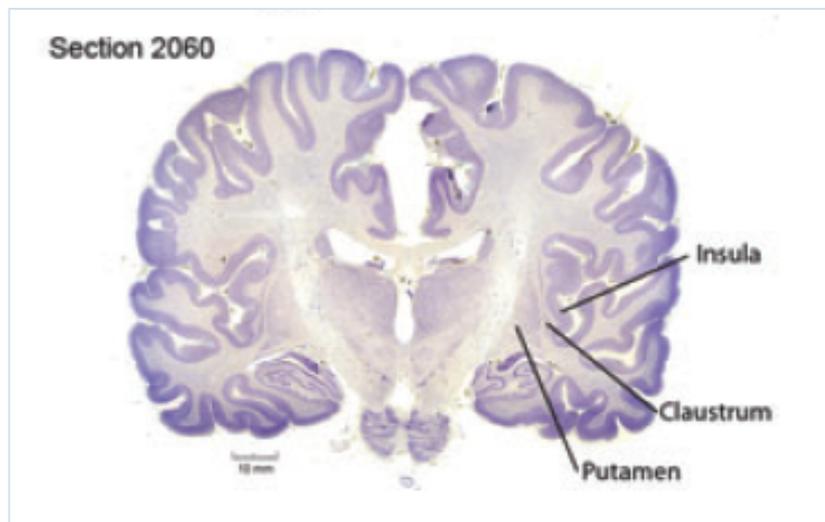


Fig. 4: Sezione istologica di encefalo umano. (*Homo sapiens*). Sono evidenziati claustrum, putamen e insula.

per chiarire l'angioarchitettura del CI, si è potuto vedere come in pazienti umani volontari sottoposti alla visione di materiale esplicitamente sessuale o durante l'eiaculazione, sia la PET (*Positron Emission Tomography*) che la risonanza magnetica, riportassero l'attivazione dell'insula e del CI (Redouté, 2000). Ciò suggeriva un coinvolgimento di quest'ultimo col sistema limbico, possibilità già dibattuta da Markowitsch (1984) studiando il cervello del gatto. Inoltre altri studi con la PET, che obbligavano il volontario all'elaborazione di segnali provenienti da più organi di senso (Hadjikhani & Roland, 1998), hanno dimostrato nuovamente il coinvolgimento del CI e l'insula nella valutazione di segnali soprattutto di tipo visivo/tattile e audio/visivo, e hanno portato alla conclusione che esso possa essere suddiviso in tre regioni (craniale, media, caudale) in base alla risposta ai vari stimoli.

Quest'idea era già stata formulata da LeVay (1981), il quale si era occupato in particolare della relazione tra la visione e il CI, dimostrando come la sua parte dorsocaudale integrasse informazioni visive derivanti sia dall'occhio ipsilaterale che da quello contro laterale e che una lesione della retina portasse di conseguenza a una degenerazione di una parte di questo nucleo.

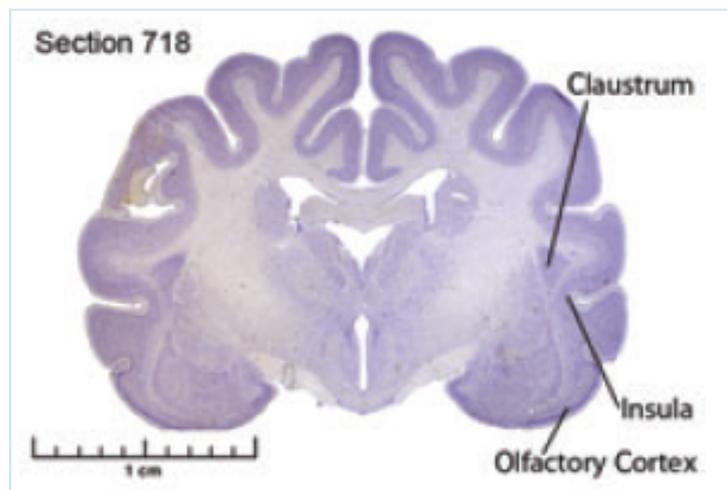


Fig. 5: Sezione istologica di encefalo di gatto (*Felis catus*). Sono evidenziati claustrum, insula e corteccia olfattoria.

#### 1.1.4. Il claustrum nei mammiferi

Il CI assume forme differenti a seconda dell'ordine di mammiferi esaminato, ma mostra anche alcuni trends comuni legati allo sviluppo dei nuclei confinanti che influenzano la sua distribuzione cellulare iniziale.

Esaminando gli studi di Buchanan e Johnson, che hanno suddiviso questa classe in base a ricerche filogenetiche sul DNA, si vede come i marsupiali posseggano un CI a forma circolare cranialmente e che si assottiglia diventando una lamina di cellule endopiriformi caudalmente dovuto allo schiacciamento tra lo striato e la corteccia.

Negli afroteriani, a cui appartengono i sirenidi e le procavie, i primi non presentano affatto questo nucleo o solamente in forma vestigiale; nei secondi al contrario, il CI ha una forma ben generalizzata a volte poco distinta dalla corteccia, prominente e simile a un boomerang che nella parte caudale va assottigliandosi e formando la così detta “radice del claustrum”, un piccolo ponte sottile di cellule endopiriformi.

Gli xenartri, mammiferi che vivono nel sud e centro america, hanno un nucleo simile a quello dei piccoli marsupiali con una forma ovoidale che poi si stringe a “radice” tra il putamen e la corteccia superficiale. Nei lagomorfi il CI ha una forma a clava (Fig.6); nei roditori è più simile a quello dei lamantini con capsula esterna ed estrema. Anche i primati fanno parte di questo ordine e mostrano un CI sottile e disposto verticalmente con un capsula esterna fine che appare opercolata nella parte craniale nelle specie con un cervello molto sviluppato e nell’uomo, mentre in quelle con encefalizzazione inferiore, la superficie non è isolata.

Infine i Laurasiatheria, un clade a cui appartengono sia i carnivori con un CI a

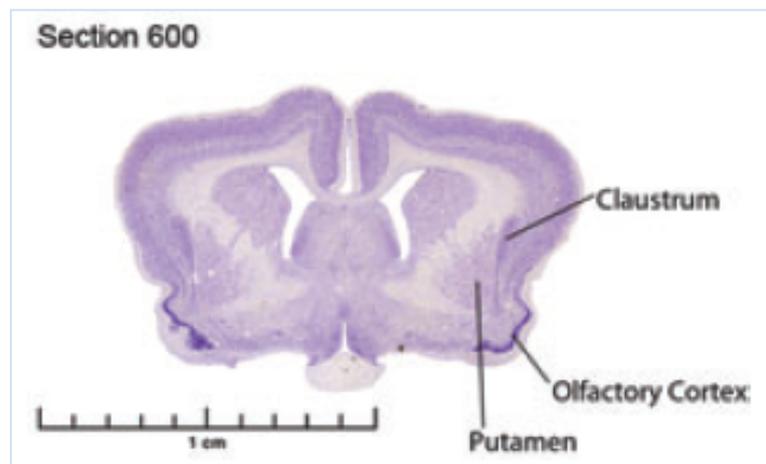


Fig. 6: Sezione istologica di encefalo di coniglio (*Oryctolagus cuniculus*). Sono evidenziati claustrum, putamen e corteccia olfattoria.

forma di uncino che si mantiene sempre affiancato all’insula tranne nei pinnipedi e assume un direzioni orizzontale nei felini; i perissodattili, come la zebra, con un nucleo molto spesso che caudalmente si espande formando una massa triangolare vicino al centro di girificazione; i cetoartiodattili in cui il maiale si è dimostrato l’animale più sorprendente vista la lunghezza del CI lungo la corteccia e la sua forma che da lineare si allarga a formare un corpo triangolare e poi prosegue in fasci che gli conferiscono un aspetto striato o lobulare.

### 1.1.5. Il claustrum nei cetacei

La prima pubblicazione che trattasse il Cl nei cetacei risale a Pilleri nel 1966, in cui preoccupandosi di descrivere l'encefalo di una megattera (*M.novaeangliae*) evidenziò il nucleo definendolo un complesso di materia grigia incluso tra il putamen e l'insula (Fig.7).

Purtroppo ad ora non molte ricerche sono state svolte su questo argomento e questo è di sicuro dovuto alla difficoltà di reperimento e conservazione del materiale. Tuttavia si sa che nei delfini il Cl ha una forma allungata, sottile e ondulata e che molto spesso si spezza in isole in prossimità della cortex. Come nel lama, le circonvoluzioni della sua corteccia diminuiscono spingendosi caudalmente e il nucleo rimane ben isolato dalla lamina esterna ed estrema in tutte le sue parti ad eccezione di una zona in corrispondenza dell'emergenza del nucleo dell'insula.

Non essendoci nei delfini adulti un bulbo olfattivo, è difficile riconoscere la parte endopiriforme del nucleo e perciò in questa specie non si evidenzia alcuna "radice del claustrum".

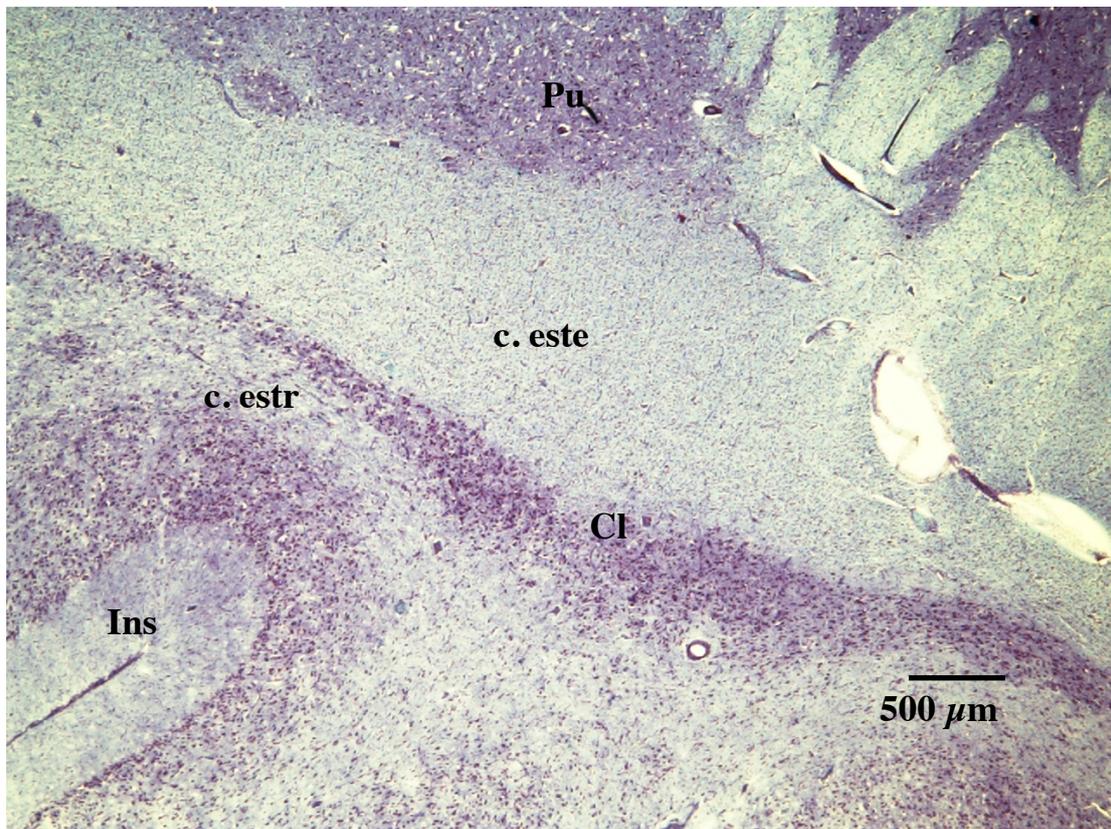


Fig. 7: Sezione istologica di encefalo di tursiope (*Tursiops truncatus*). Sono evidenziati claustrum (Cl), putamen (Pu), insula (Ins), capsula esterna (c. este) e capsula estrema (c. estr).

## 1.2. Il *Tursiops truncatus*

Il tursiope (Montagu, 1821) appartiene alla famiglia dei Delfinidi, che conta al suo interno una delle maggiori varietà di specie nell'ordine dei Cetartiodattili. Il genere *Tursiops* è suddiviso in tre specie: *T. truncatus*, *T. aduncus* (LeDuc, 1999) e raggruppa animali che vivono solitamente in aree marine con clima tropicale o temperato



Fig. 8: Trusiopi in cattività presso il Marine Mediterraneo Park di Malta.

dell'Atlantico e del Pacifico. La loro distribuzione è legata alla disponibilità di prede e al mondo si contano circa 600.000 esemplari.

La loro dieta è composta soprattutto da pesci e cefalopodi, e sembrano avere una predilezione per specie demersali e bentoniche come sgombri, mugilidi e scienidi ma anche per specie pelagiche come le sardine e possa quindi essere facilmente ecolocalizzato durante la caccia. I tursiopi in natura sono attivi sia durante il giorno che di notte e inframmezzano l'attività della pesca con il nuoto a lunga distanza, la socializzazione, l'ozio e il riposo.

Vivono in gruppi molto dinamici di 5 o 6 elementi e al loro interno è possibile trovare delfini di sesso, età e stato riproduttivo differente. L'unità sociale base chiamata "pod" include: femmine con piccoli, giovani di ambo i sessi, maschi adulti e individui affiliati (Wells et al., 1987).

Per quanto riguarda i tursiopi oggetto di questa tesi (*T. truncatus*), appartenenti al bacino del Mediterraneo, essi presentano un corpo fusiforme, simile a quello dei pesci, una colorazione grigiastra con varie sfumature sul dorso e ventre bianco. Sul capo è presente un melone pronunciato, e la mascella e la mandibola allungate formano un rostro esternamente corto e tozzo, lungo circa 8 cm. La pinna dorsale, di forma



Fig. 9: Disegno di tursiope (*Tursiops truncatus*) (a cura di M. Demma).

triangolare o falcata è alta circa 23 cm; le pinne pettorali sono lunghe circa 30–50 cm e la pinna caudale, suddivisa in due lobi, è generalmente larga circa 60 cm.

Il maschio misura circa 3-4 metri e raggiunge un peso tra i 150 e 650 kg, la femmina è leggermente più piccola (Rojas-Bracho, 2008).

### 1.2.1. Sistema nervoso e organi di senso

Sono animali perfettamente adattati alla vita marina e questo è un derivato della forte pressione evolutiva a cui sono stati sottoposti. Si pensi che il primo antenato dei Cetacei, il *Pakicetus*, fu un artiodattilo primitivo vissuto circa 35 milioni di anni fa. [si veda Appendice 1]

Fonte di curiosità e perciò di innumerevoli ricerche è sempre stato il loro sistema nervoso e in particolare l'evoluzione dei loro organi di senso.

Lo studio dell'encefalo ha sempre presentato diversi ostacoli alla sua comprensione: primo, abbiamo familiarità solo con alcune specie, tra cui il tursiopo è la più comune; secondo, anche se è possibile fare comparazioni con *trends* evolutivi simili (primati), la scarsità dei dati potrebbe causare una sovrastima di queste analogie.

In natura non esistono cervelli con superficie più circonvolta e di quelli dei cetacei e il loro indice di encefalizzazione è secondo solo all'uomo (Fig.10).

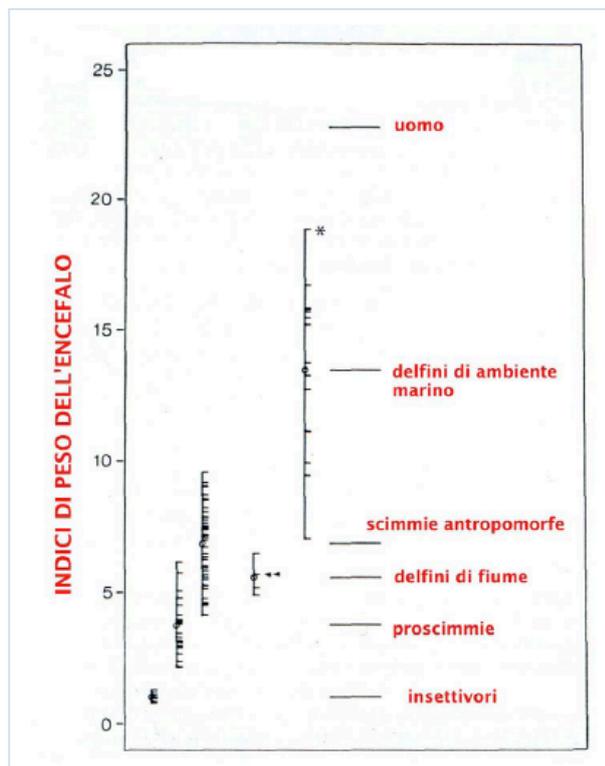


Fig. 10: Indici di encefalizzazione di alcuni mammiferi. Gli insettivori rappresentano la base di confronto.

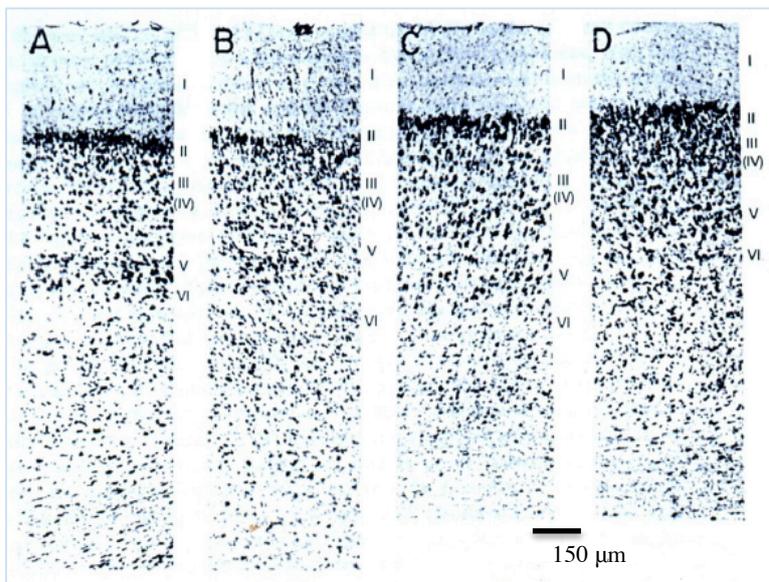
Le pontoporie (*Pontoporia blainvillei*) sono una specie molto primitiva e

presentano una massa cerebrale di 200g con una massa corporea di 35kg, e il loro indice di encefalizzazione (EI) è 3.7, pari a quello dei lemuri, un sottordine dei primati (Oelschläger e Oelschläger, 2002). Considerando che i delfini di mare invece possono raggiungere un EI di 13.5, è facile comprendere come la somiglianza all'uomo sia elevata nonostante alcune differenze quali: maggiori dimensioni assolute encefaliche e cerebellari, mancanza del bulbo olfattorio, riduzione della paleocorteccia, estensione

della neocorteccia, un notevole sviluppo dello striato che suggerisce una notevole capacità motoria, amigdala di dimensioni considerevoli (20-25mm), talamo eccezionalmente sviluppato.

Il mesencefalo è pure molto esteso e questo è dovuto al ragguardevole sviluppo del sistema acustico e in particolare ai nuclei del collicolo inferiore e del lemnisco laterale.

La corteccia è molto sottile (3mm nell'uomo, 1.6 mm nel delfino) e suddivisa, a differenza degli altri mammiferi in 5 strati (Fig.11) di cui il quarto spesso non riconoscibile (P.R. Hof, 2007). In generale, il primo stato occupa quasi un terzo della larghezza; il secondo è sottile ma ricco in cellule piramidali; il terzo è spesso con un'ampia varietà di cellule piramidali e piccoli neuroni stellati; il quarto è assente o



scarsamente differenziabile dagli strati contigui; il quinto presenta molte cellule stellate ma anche piramidali e il sesto è ben sviluppato e con cellule polimorfiche.

La densità di neuroni varia non solo di area in area, ma anche di strato

in strato ed è interessante vedere come nei cetacei, nonostante la bassa densità neurale

Fig. 11: Sezioni istologiche di diversi livelli corticali dell'encefalo di tursiopo (*Tursiops truncato*).

media (es. balenottera comune 6.800 cellule/mm<sup>3</sup>) rispetto

all'uomo (180.000 cellule/mm<sup>3</sup>), la densità di fibre per unità di volume sia molto più alta di tutti i mammiferi terrestri (Oelschläger e Oelschläger, 2002).

Per quanto riguarda i principali nervi cranici, l'ottico (II), l'oculomotore (III), il trocleare (IV) e l'abducente (VI) possono essere più o meno sviluppati a seconda della specie; il trigemino (V) è il nervo proporzionalmente più grande nei misticeti mentre negli odontoceti sembra essere il vestibolo-cocleare (VIII), con un numero di assoni pari a 82.000-15.6000 (nell'uomo 140.000); le dimensioni del nervo facciale (VII) sono collegate all'evoluzione e alla morfologia dell'animale e sono maggiori negli odontoceti dove contribuiscono al controllo fine del melone.

La lunghezza del midollo spinale dipende dalla taglia dell'animale, ma mantiene lo stesso rapporto di 4:1 fra la lunghezza totale del corpo e la propria che troviamo nell'uomo (Jansen et al., 1969). Il midollo è la principale via di connessione tra l'apparato locomotore e l'encefalo e nei delfini sono riconosciuti circa 44 paia di nervi spinali, di cui la suddivisione in segmenti (Fig.12), appare poco significativa a livello neurologico (N.J. Flanigan, 1966).

I cetacei hanno occhi posti lateralmente e questo consente loro una visione binoculare ridotta. Gli occhi hanno una forma appiattita e il cristallino è di forma sferica. La pupilla di questi animali permette loro di vedere sia sott'acqua sia in aria, nonostante la diversa densità esistente tra i due ambienti e dietro la retina è presente una zona altamente vascolarizzata, il *tapetum lucidum*, che grazie ad uno strato di cellule riflettenti svolge la funzione di aumentare la quantità di luce che raggiunge la retina stessa. Poiché quest'ultima possiede sia coni sia bastoncelli si pensa che i cetacei siano in grado di distinguere i colori.

Le fibre del nervo ottico subiscono una semicompleta decussazione e il numero di fibre dirette ai muscoli dell'occhio varia a seconda della specie, favorendo quelle che vivono in ambiente marino a scapito di quelle d'acqua dolce per cui l'occhio non è altro che un recettore per la luminosità.

La regione dedicata all'udito è invece molto estesa in quanto questo è il senso più sviluppato e riveste un ruolo importante nella comunicazione intraspecifica e nelle tecniche di caccia (ecolocalizzazione). Le vocalizzazioni sono prodotte per mezzo di particolari strutture associate ai passaggi nasali superiori ("labbra foniche"). Queste sono collocate a livello dello sfintere, sulla sommità di masse muscolari e lipidiche detti tappi nasali che otturano i passaggi nasali. I suoni sono prodotti facendo passare l'aria attraverso questo stretto passaggio e le membrane del labbro fonico vengono risucchiate assieme, provocando la vibrazione dei tessuti circostanti. Queste vibrazioni passano poi attraverso una massa adiposa sulla regione frontale della testa detta "melone", che

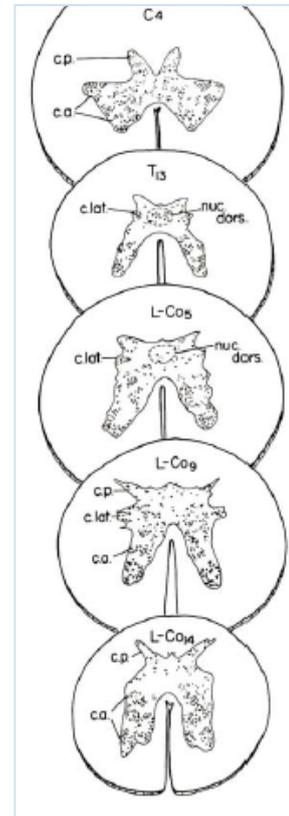


Fig. 12: Schema del midollo spinale di tursiopo, sezionato a vari livelli:  
C= craniale,  
T=toracico,  
L=lombare  
Ca=caudale

forma e dirige il suono in un raggio sonoro usato per l'ecolocalizzazione (Crawford et al., 1996).

Nella maggior parte dei casi le strutture del sistema uditivo dei misticeti sono ridotte rispetto a quello degli odontoceti, ma in generale, il diametro e il numero di assoni del nervo vestibolococleare sono molto maggiori rispetto agli altri mammiferi (6-7 volte il numero di fibre dell'uomo) (A. Kern, 2009).

Infine il senso dell'olfatto è assente mancando completamente il bulbo olfattivo. Tuttavia negli embrioni di odontoceti è stata ritrovata una struttura omologa al bulbo che regredisce poi nei primi stadi fetali (Oelschlaeger e Kemp, 1998).

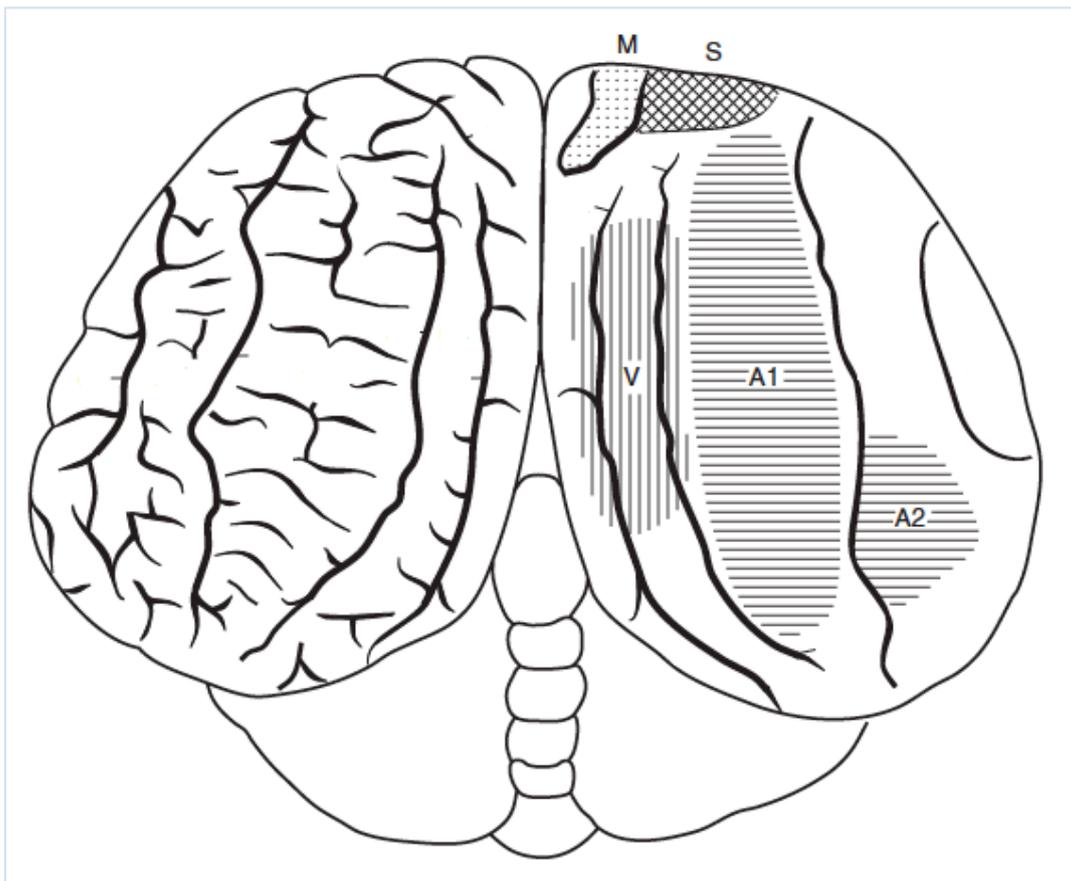


Fig. 13: Aree motorie e sensoriali della corteccia cerebrale di tursiopo. A1 corteccia uditiva primaria, A2 corteccia uditiva secondaria ; M area motoria; PL lobo paralimbico; S, corteccia somatosensitiva; V corteccia visiva. Morgane et al. (1986).



## *OBIETTIVI*



## 2. Obiettivi

Questa tesi, basata su uno studio morfologico e funzionale del nucleo subcorticale claustru nella specie *Tursiops truncatus*, un animale molto vicino all'uomo per indice di encefalizzazione, si pone lo scopo di investigarne con maggiore attenzione l'aspetto citologico e di fornire materiale per un confronto tra specie al fine di delinearne un possibile ruolo nei molteplici sistemi di integrazione e coordinamento cerebrali.

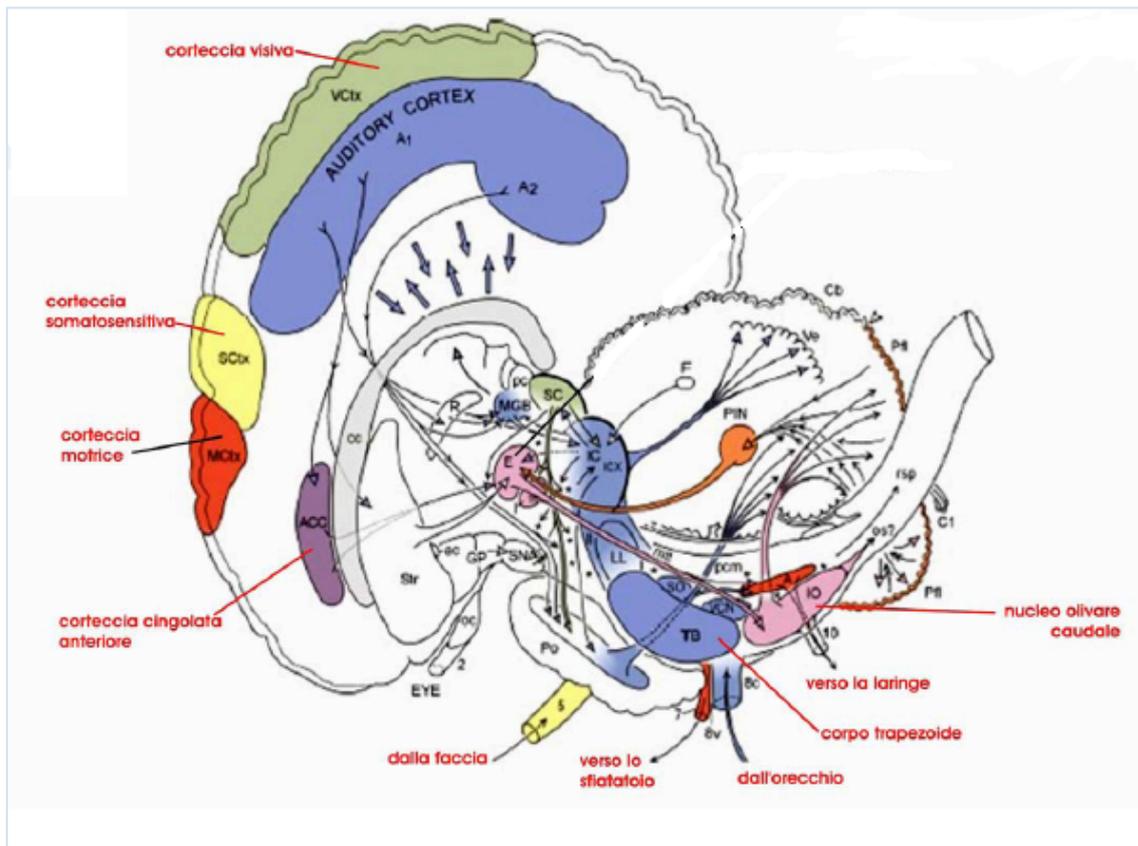


Fig. 14: Sezione sagittale di encefalo di delfino con evidenziate le strutture sensoriali e motorie. E nucleo ellittico; IO nucleo olivare caudale; Cb cervelletto; P nuclei pontini; A nucleo ambiguo; ACC corteccia cingolata anteriore; C1 primo nervo spinale cervicale; F nucleo fastigi; GP globo pallido; I nucleo interstiziale di Cajal; ICX corteccia estrema; MC corteccia motoria; R nucleo talamico; SN sostanza nera; SO nucleo olivare anteriore; SC corteccia somatosensitiva; Str striato; TB nucleo trapezoidale; VC corteccia visiva. Encyclopedia of Marine Mammals, 2008



## *MATERIALI e METODI*



I materiali utilizzati per lo studio della citoarchitettura del claustrò sono stati prelevati da encefali di *Tursiops truncatus* appartenenti alla Banca Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo, ente istituito nel 2002 per la raccolta di campioni organici appartenenti ad animali spiaggiati lungo le coste del mare Mediterraneo, nonché di altri animali deceduti in acquari e SeaLife.

### 3.1. Campionamento

I delfini selezionati per lo studio sono animali morti in cattività (Tab.1) il cui esame post-mortem si è svolto all'interno dell'aula necroscopie della Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova.

ID	SESSO	ETÀ (anni)	LUNGHEZZA
107	M	9	250 cm
114	M	pochi giorni	114 cm
133	F	~ 30	248 cm
139	M	30	268 cm
146	M	3 e mezzo	226 cm
159	M	40	328 cm

Tab.1: Caratteristiche degli animali campionati in questo studio appartenenti alla Banca Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo

### 3.2. Trattamento dei tessuti

Durante la necroscopia sono campionati tutti gli organi in mezzi differenti a seconda delle necessità di studio, esempio: campioni in formalina per studi istologici; in DMSO 20% per analisi genetiche; congelati in azoto liquido per indagini tossicologiche e parassitologiche.

Per quanto riguarda l'encefalo, una volta eseguito il suo prelievo scarnificando il cranio con bisturi e pinze e aprendo la scatola cranica con una sega circolare, esso è sezionato trasversalmente in fette dello spessore di un centimetro e il tutto è poi immerso nella formalina o formaldeide al 4% (CH<sub>2</sub>O).

Questa aldeide penetra rapidamente nei tessuti indurendo i gel proteici senza separare l'acqua dalle proteine permettendo così di non far precipitare il DNA del campione, di conservare la maggior parte dei lipidi e rendere i fosfolipidi insolubili ai solventi lipofili.

Per alcuni encefali tuttavia, dopo la fissazione in formaldeide, i campioni sono stati lavati in acqua corrente per 48 ore, al fine di eliminare l'eccesso di fissativo, lavati in acqua distillata e immersi in una soluzione crioprotettiva di saccarosio al 30% in PBS, per essere sottoposti a congelamento. Ogni campione è stato fissato su un piccolo supporto con resina OCT, secondo un orientamento idoneo al taglio e immerso in una soluzione di isopentano raffreddata in azoto liquido. L'utilizzo dell'isopentano ci permette di monitorare la temperatura tra  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-30^{\circ}\text{C}$  allo scopo di ridurre al minimo il danno tissutale causato da shock termico. I campioni così ottenuti sono conservati in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  in attesa di essere sezionati.

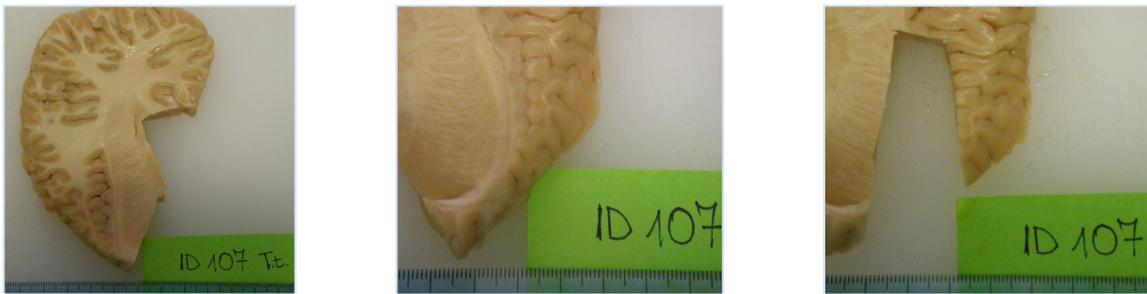


Fig. 15: Campionamento del claustrum dagli encefali di tursiope. Dopo aver individuato la regione del claustrum la sezione è stata tratta.

### 3.3. Allestimento vetrini

Poiché i tessuti disponibili per lo studio erano conservati in diversi mezzi, per quelli in formalina il passaggio successivo è stata l'inclusione del campione in un blocchetto di paraffina per permetterne il taglio al microtomo in sezioni di circa  $6-8\ \mu\text{m}$ ; mentre quelli congelati sono stati tagliati al criostato per ottenere delle sezioni di  $20\ \mu\text{m}$ . Prima dell'inclusione in paraffina il campione è stato sciacquato in acqua corrente per almeno 48 ore, al fine di eliminare l'eccesso di fissativo; poi trammato ed infine disidratato immergendolo in una scala di alcool e xiloli.

I vetrini utilizzati erano di tipo Vectaband per gli studi istologici e Superfrost per le ricerche immunohistochimiche.

### 3.4. Indagini istologiche

Lo studio istologico ci permette di capire da quali tipologie cellulari è costituito il tessuto analizzato e la sua organizzazione.

Per il tessuto nervoso è generalmente utilizzata la colorazione Nissl in quanto l'utilizzo di questo colorante basofilo permette di evidenziare i ribosomi (detti anche "sostanza di Nissl") che si trovano nel citoplasma e nei dendriti dei neuroni e in parte anche il nucleolo, e il nucleo delle cellule gliali. Tra i diversi coloranti utilizzabili, in questo studio si è scelto il colorante Tionina.

[Per il protocollo si veda Appendice II]

### **3.5. Indagini immunoistochimiche**

L'immunoistochimica è una tecnica che riveste un ruolo molto importante nella routine del laboratorio perché è in grado di individuare specifiche molecole e strutture del compartimento intra ed extra cellulare.

Questa tecnica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in addizione con sistemi di rivelazione (enzimatici, fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio.

L'efficienza dipende dalla qualità del preparato istologico allestito, dalla preservazione dell'antigenicità del tessuto e dal potere di amplificazione del segnale da parte dei sistemi utilizzati per evidenziare la reazione antigene-anticorpo.

Nei campioni conservati in formalina l'antigenicità del preparato è spesso compromessa dal meccanismo d'azione di quest'ultima, la quale pur preservando la componente morfologica, forma dei legami crociati con le proteine del tessuto e rende quindi meno accessibili i determinanti antigenici.

Nel corso di questa indagine è stata utilizzata una delle tecniche di recupero dell'antigenicità (antigen retrieval) che prevede il trattamento delle sezioni istologiche in microonde a temperatura superiore a 100 °C in tampone citrato a pH 6.0. Dal momento che i risultati ottenuti non hanno dimostrato alcun sensibile miglioramento rispetto alle sezioni non trattate e che tale procedura causava un deterioramento del tessuto, si è deciso di procedere all'indagine immunoistochimica senza ricorrere allo smascheramento dell'antigene.

Allo scopo di aumentare la specificità del segnale e di amplificarlo, è stato utilizzato un metodo immunoenzimatico indiretto. Tale metodo prevede l'uso di un anticorpo, definito secondario, coniugato a molecole di biotina o vitamina H, diretto contro l'anticorpo, definito primario, specifico per l'antigene ricercato. Per localizzare il complesso antigene - anticorpo primario - anticorpo secondario e allo stesso tempo

amplificare il segnale, abbiamo utilizzato il sistema Avidina-Biotina perossidasi basato sull'utilizzo dell'avidina (proteina estratta da albume d'uovo), della biotina e dell'enzima perossidasi. La molecola di biotina, coniugata alla perossidasi di rafano (horseradish peroxidase, HRP), viene legata all'avidina attraverso quattro siti di legame. Il complesso che ne deriva possiede tuttavia dei siti di avidina non coniugati che andranno a legarsi al complesso antigene-anticorpo grazie alla presenza dell'anticorpo secondario biotinilato.

La perossidasi, infine, è in grado di convertire un substrato solubile in ambiente acquoso, quale la diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB), in un precipitato insolubile, con sua conseguente precipitazione nella sede della reazione antigene-anticorpo. Il vantaggio di questo metodo è rappresentato dalla rapidità della reazione, essendo in grado l'enzima di convertire in pochi minuti una quantità enorme di substrato cromogeno che conferisce una colorazione marrone ai complessi fra antigene e anticorpo visibile al microscopio ottico.

In questo lavoro si è voluto analizzare l'espressione delle proteine leganti il calcio, parvalbumina, calbindina e calretinina, nei diversi tipi di neuroni utilizzando i rispettivi anticorpi primari:

- anti-parvalbumina (PV)
- anti-calbindina (CB)
- anti-calretinina (CR)

[Per il protocollo si veda Appendice II]

### ***3.6. Osservazione dei preparati***

I vetrini ottenuti tramite le due metodiche descritte sono stati esaminati al microscopio ottico Olympus BX51, dotato di telecamera Olympus DP71 gestita dal software Olympus CellB. Il tessuto è stato guardato e fotografato a partire da un ingrandimento 10x fino a 100x per valutare sia l'aspetto generale della sezione, sia la distribuzione e la morfologia neuronale.

## *RISULTATI*



#### 4.1. Osservazioni macroscopiche

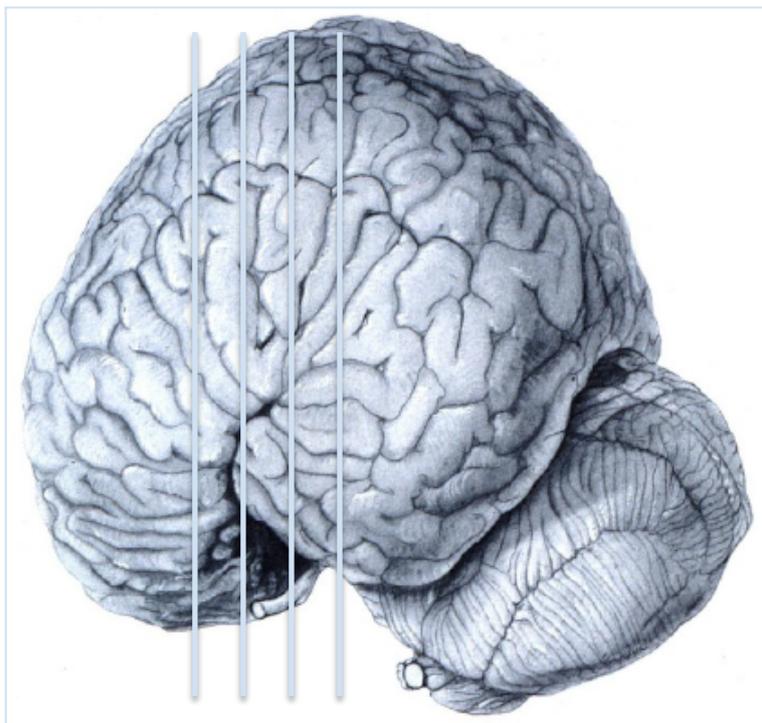


Fig. 16: Rappresentazione di encefalo di tursiopo in cui sono state evidenziate le sezioni in cui è presente il claustr.

Il riconoscimento del claustr è stato possibile in tutti i tursiopi presi in esame nonostante le differenze di taglia, sesso, età. Questo è avvenuto basandoci su atlanti di neuroanatomia e lavori precedentemente sviluppati da Morgane e Jacobs (1980) riguardo l'encefalo dei delfini. In particolare ci siamo concentrati sulle coordinate anatomiche di due aree che godono di

maggior notorietà quali il putamen e l'insula.

La scelta non è stata casuale poiché quest'ultime si trovano ai lati del nucleo di nostro interesse. L'insula è infatti collocata medialmente al CI ed è divisa da questo per mezzo della capsula esterna. Il putamen si trova invece lateralmente ed è separato dal CI grazie alla capsula estrema.

La formazione del CI era quindi evidente nel suo ruolo di "divisorio" e appariva come una zona di sostanza grigia vermiforme d'aspetto leggermente più chiaro e lucido rispetto agli altri due nuclei.

A seconda del livello della sezione cerebrale inoltre presentava uno sviluppo dorso-ventrale più o meno marcato, raggiungendo come massimo in lunghezza i 3.5 cm e in altezza i 2.5 cm. Per quanto riguarda lo spessore era di media attorno ai 1-2 mm.

Una volta individuato il claustr nei vari animali si è proceduto al prelievo.

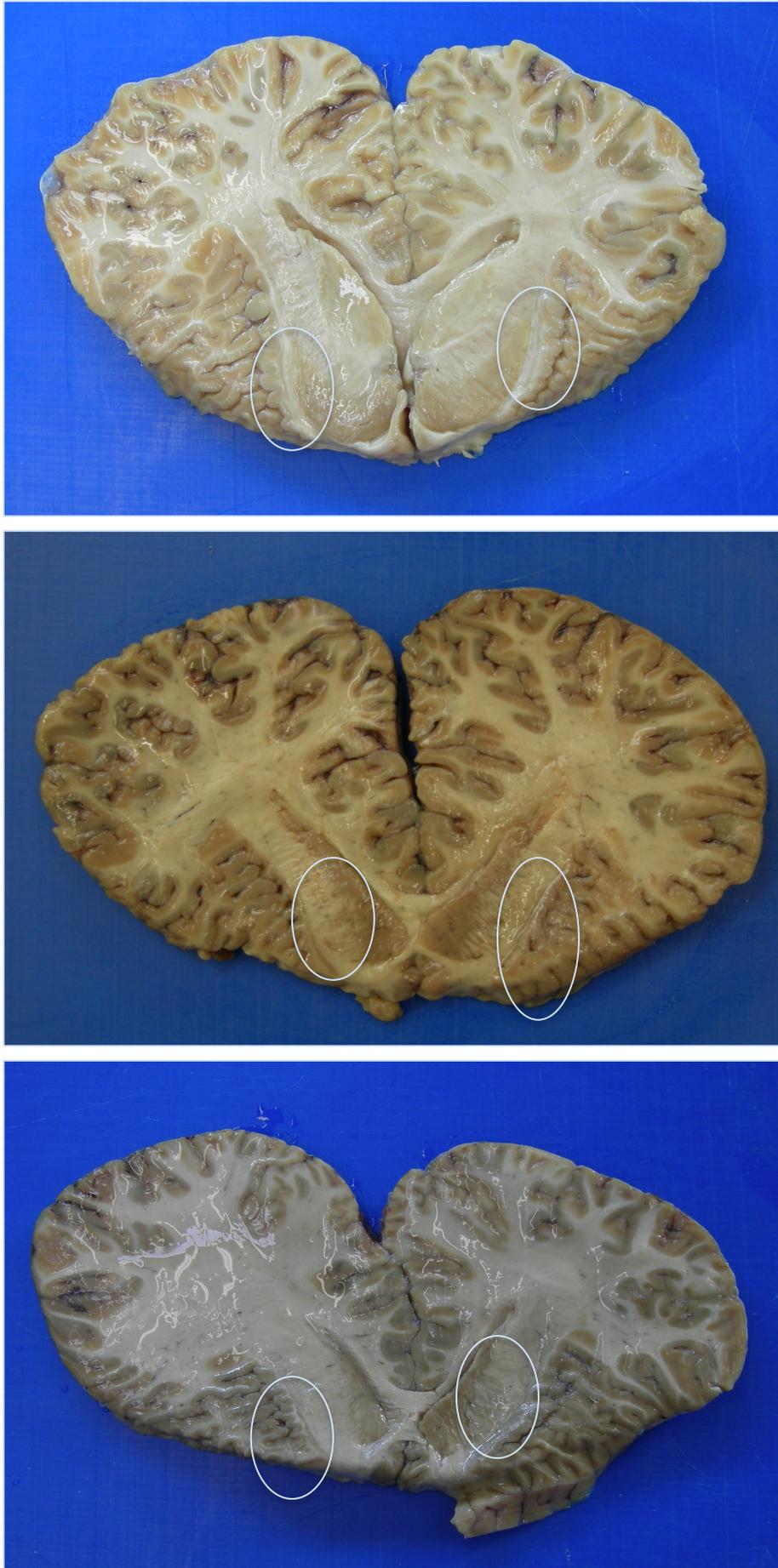


Fig. 17: Sezioni trasversali di encefalo di encefalo di tursiope (ID107, ID139, ID146) in cui è stata evidenziata la regione del claustr.

## 4.2. Osservazioni microscopiche

### 4.2.1. Aspetto alla colorazione di Nissl

La scelta della colorazione istologica di Nissl ha permesso di evidenziare le caratteristiche strutturali dei neuroni facenti parti del nucleo del Cl e delle strutture a esso confinanti.

A un primo ingrandimento col microscopio ottico (10x) si è visto come il Cl, partendo dal margine più dorsale, sia completamente separato dall'insula per mezzo della capsula, ma questa sembra venir meno o addirittura fondersi con la corteccia dell'insula passando più ventralmente.

Sempre a questo livello, in particolare, il Cl sembra frammentarsi in piccole isole di neuroni che si riorganizzano poi più ventralmente per riformare la capsula estrema.

Poiché i campioni meglio conservati erano quelli degli esemplari adulti, in cui il bulbo olfattorio regredisce, non è stato possibile riconoscere la corteccia olfattoria e la regione endopiriforme, di conseguenza non abbiamo osservato nessuna zona riconducibile alla “radice del claustrò” che risulta presente in alcuni mammiferi.

Passando a ingrandimenti maggiori

(20x, 40x) fino ad arrivare all'immersione in olio (100x) si sono osservate le varie

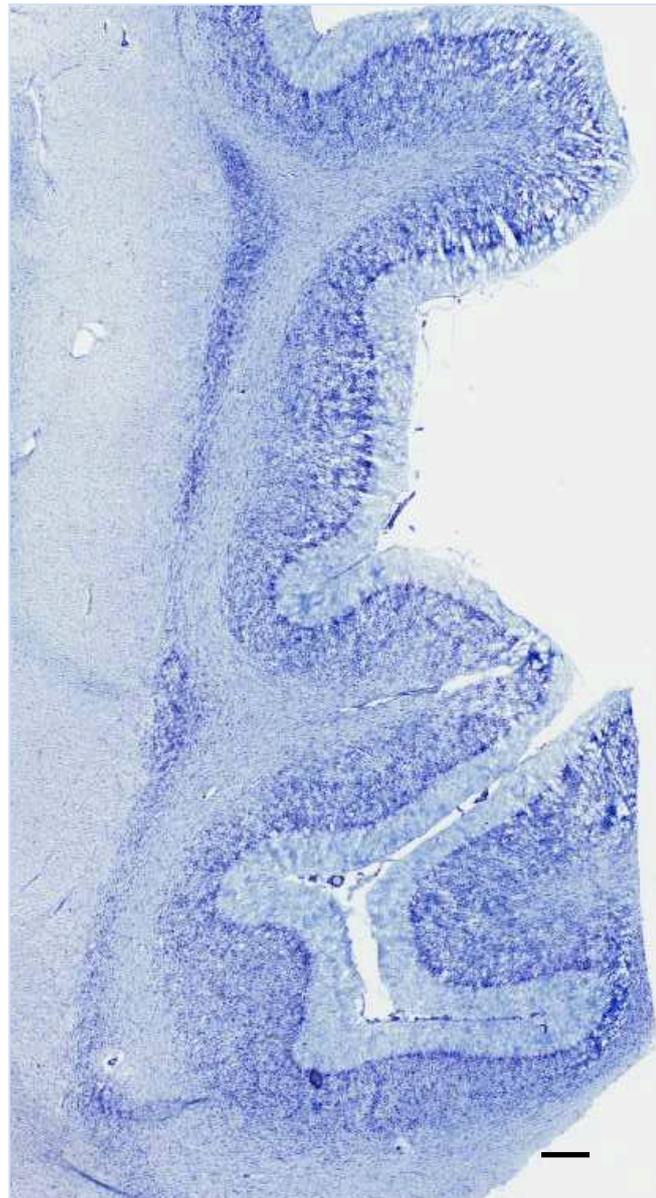


Fig. 18: Sezione istologica di claustrò di tursiope realizzata con la colorazione di Nissl. La barra corrisponde a 200  $\mu\text{m}$ .

tipologie cellulari delle regioni del CI confermando la presenza di neuroni di tipo 1, tipo 2 e tipo 3.

Nell'area dorsale c'erano soprattutto neuroni di forma rotonda o semipiramidale, di media grandezza e ciascuna cellula era contornata da ogni lato dall'ampia mielina della capsula.

Nell'area ventrale invece, i neuroni erano principalmente di forma piramidale, alcuni rotondi e ad eccezione dell'area insulare in cui i neuroni erano allungati e fusiformi, la capsula risultava ricca di mielina.

#### **4.2.2. Aspetto alla colorazione immunoistochimica**

La scelta dell'utilizzo nella tecnica dell'immunoistochimica di proteine leganti il calcio quali la parvalbumina (PV), la calbindina (CB) e la calretinina (CR), era dovuto al fatto che molti studi legati alla morfologia del sistema nervoso erano stati svolti marcando queste proteine (Andressen et al., 1993) che permettevano il riconoscimento delle diverse forme neurali.

##### **4.2.2.1. Neuroni CR-immunoreattivi**

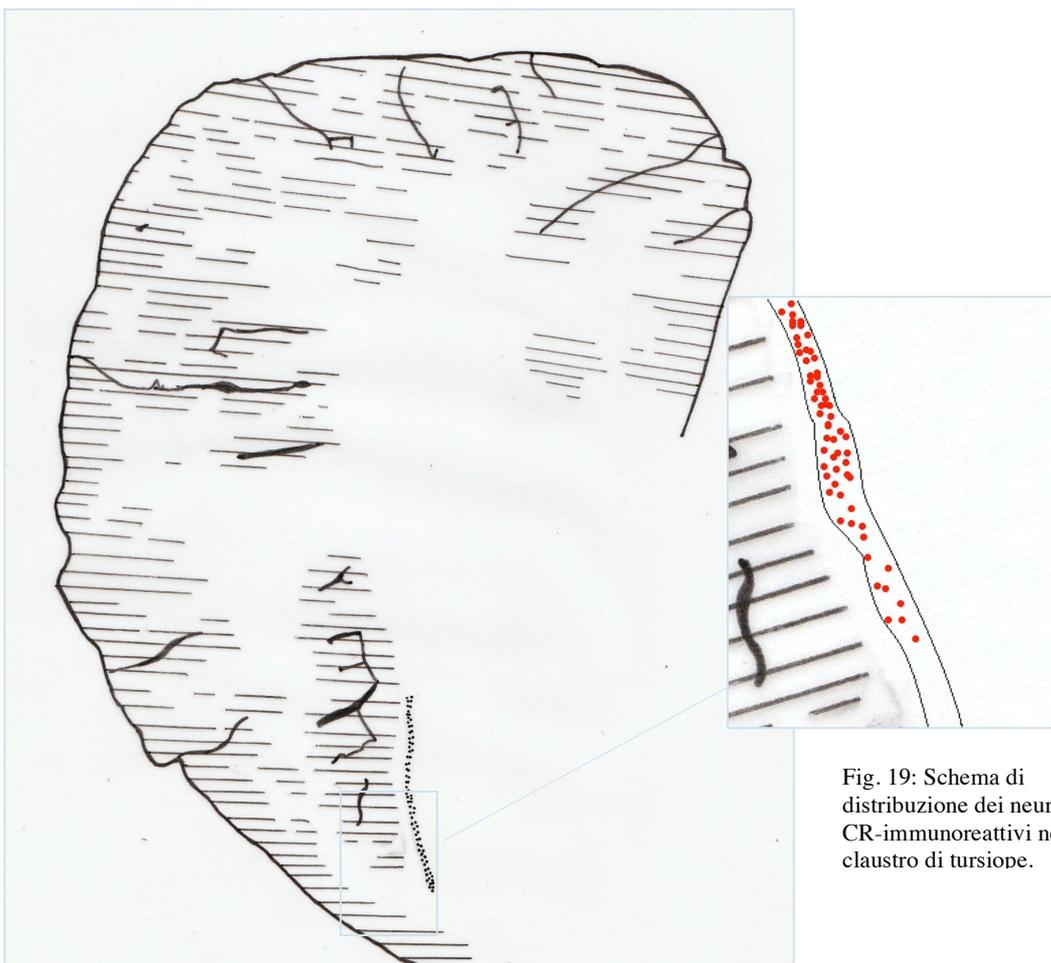
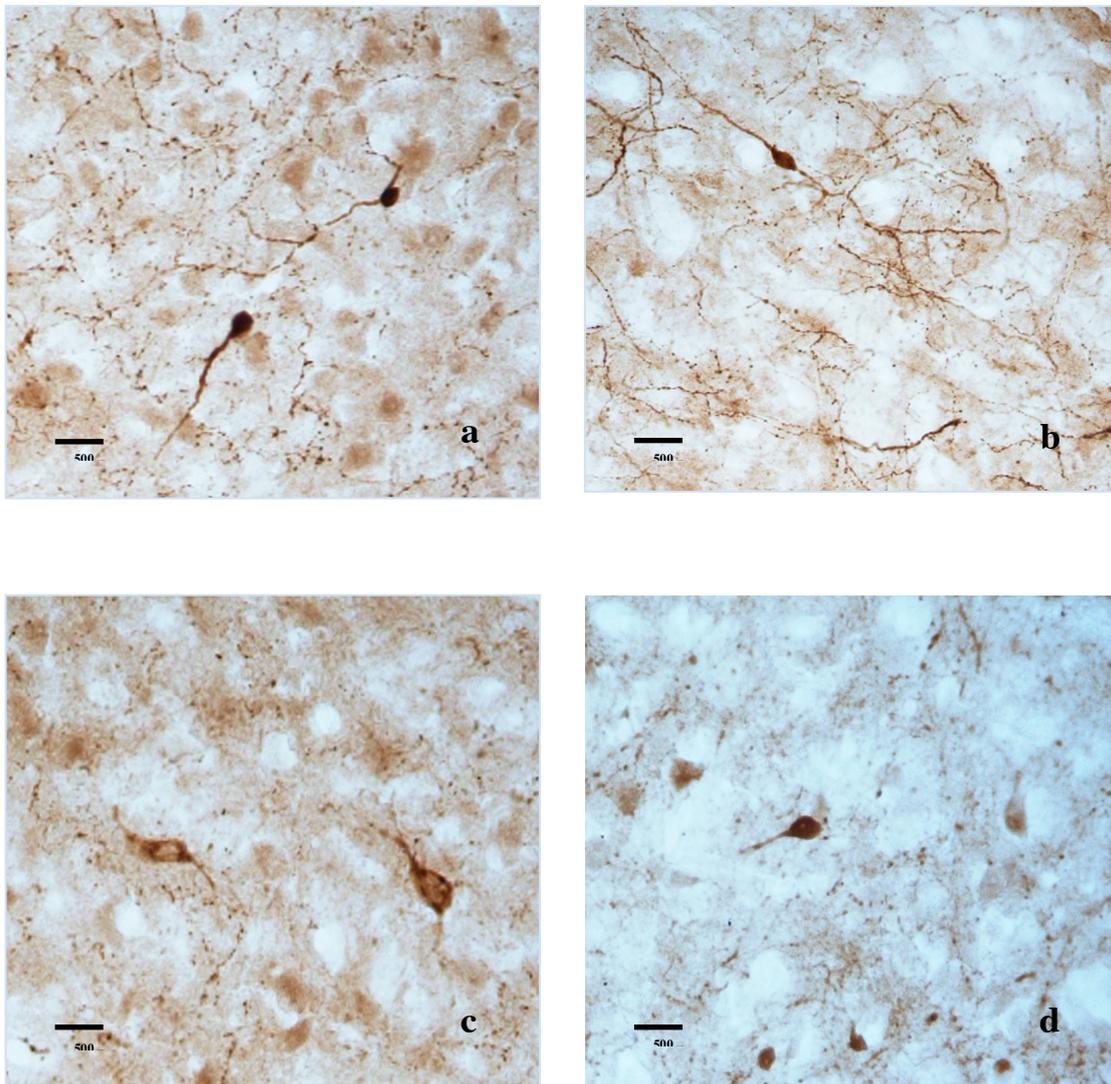


Fig. 19: Schema di distribuzione dei neuroni CR-immunoreattivi nel claustrato di tursiope.

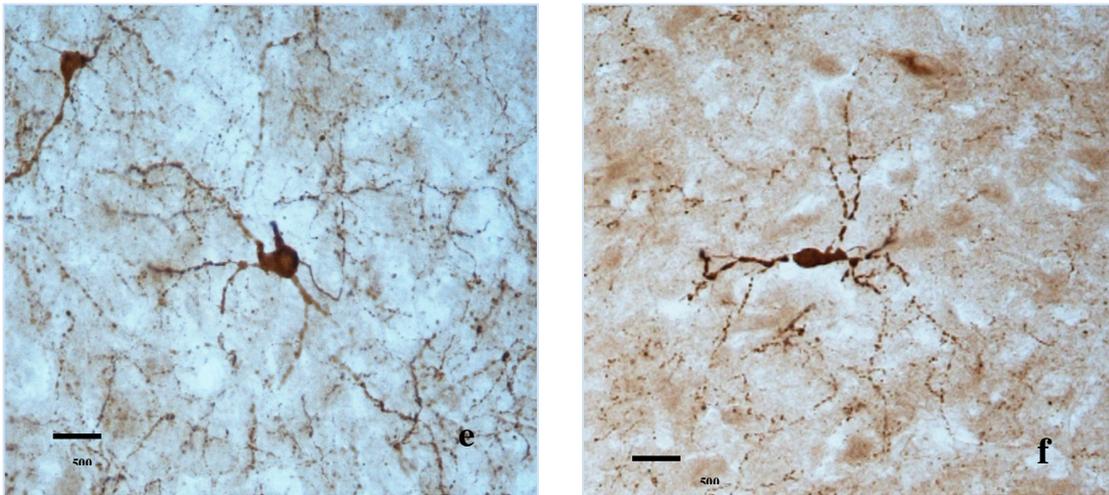
Il primo anticorpo testato sia su tessuto conservato in congelato che in formalina, è stato quello anti-CR che ha mostrato un marcaggio forte e diffuso nelle varie regioni del claustrato.

Le cellule immunoreattive a questa proteina erano soprattutto neuroni mono e bipolari (Fig. a-b).



Il loro soma aveva una forma fusata o triangolare (Fig. c) e il loro aspetto era stato reso più evidente dall'aggiunta di nickel alla metodica di sviluppo (Fig. d).

Questi neuroni erano abbondanti soprattutto nella regione ventrale del Cl, pochi invece in quella dorsale in cui tuttavia sono state trovate molte fibre reattive e alcuni neuroni multipolari (Fig. e-f).



Non si è realizzata alcuna sovrapposizione tra i neuroni marcati per la CR e quelli CB e PV immunoreattivi.

#### 4.2.2.2. *Neuroni CB-immunoreattivi*

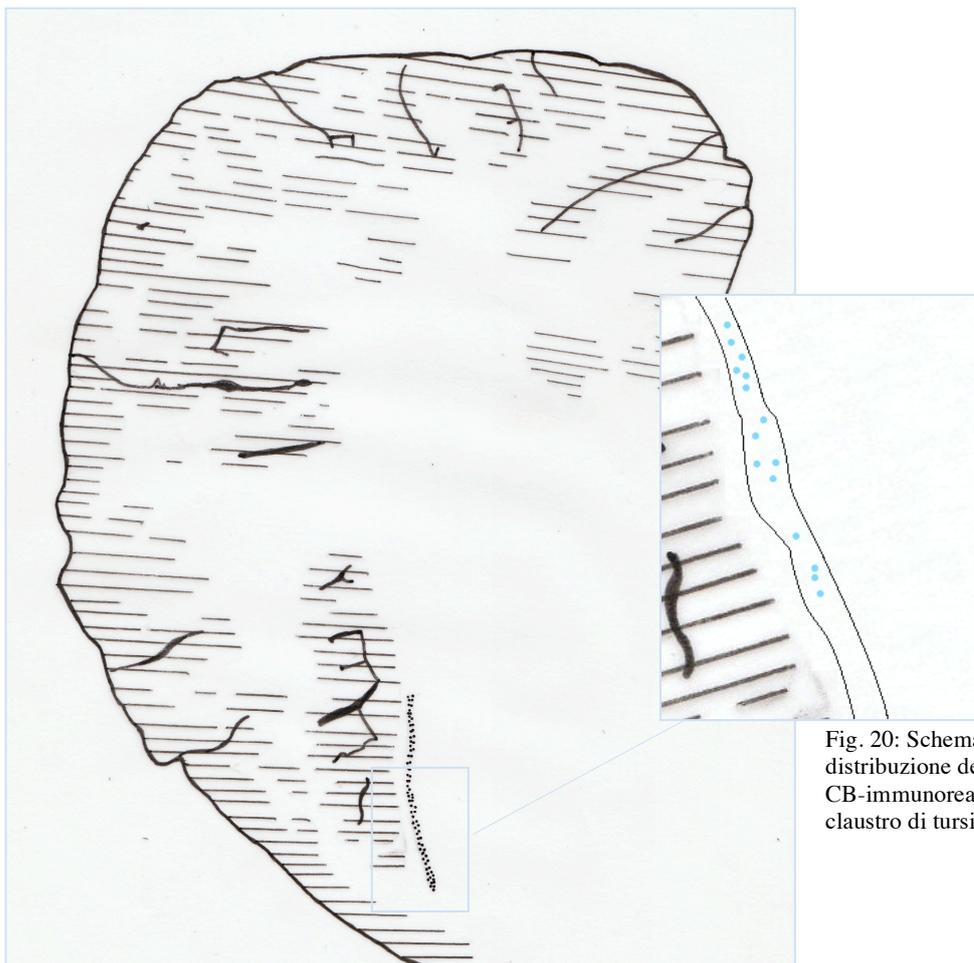
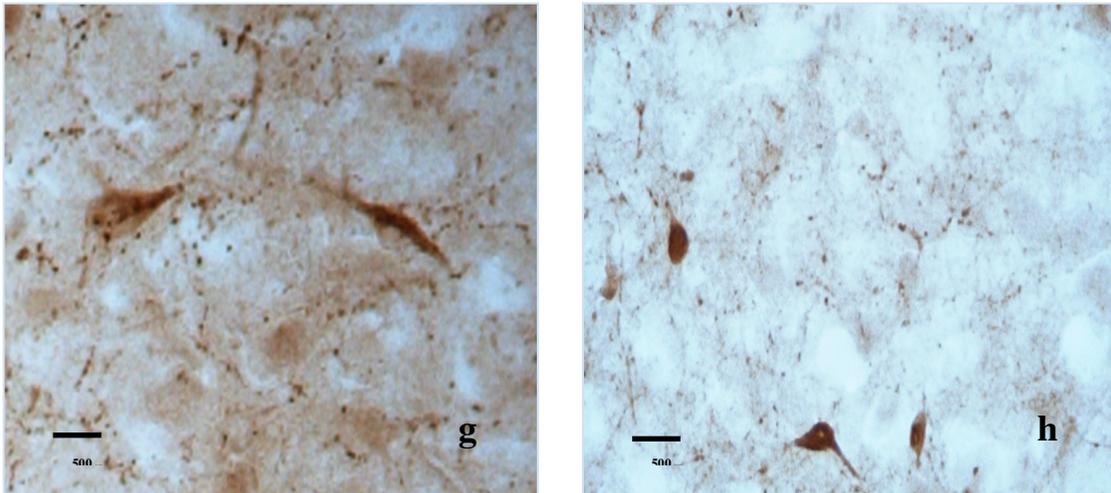


Fig. 20: Schema di distribuzione dei neuroni CB-immunoreattivi nel claustrò di tursiope

Le stesse sezioni sono state successivamente testate con l'anticorpo anti-CB, ma il legame tra l'antigene e anticorpo è stato scarso ed anche riducendo la diluizione da 1:2000 a 1:1000, poche cellule sono state marcate.

I neuroni CB-immunoreattivi erano localizzati in gran parte nella zona dorsale e il loro soma era generalmente fusiforme (Fig. g). La calbindina ci ha comunque permesso di individuare la presenza di alcuni interneuroni nelle vicinanze dei neuroni marcati con l'anticorpo anti-CR (Fig. h).



#### 4.2.2.3 Neuroni PV-immunoreattivi

La colorazione immunoistochimica realizzata con l'anticorpo anti-PV, non ha dato alcun marcaggio, al contrario di quanto ci si aspettava confrontandoci con gli stessi tipi di studio svolti in altre specie (Kowianski, 2009; Rahman, 2007; Real, 2003; Wojcik, 2004).



## *DISCUSSIONE e CONCLUSIONI*



Nello studio presentato in questa tesi mi sono occupata di descrivere la citoarchitettura e la neurochimica del claustrò di *Tursiops truncatus*.

Il claustrò è stato da sempre oggetto d'indagine sia riguardo alla sua struttura, sia riguardo alla sua funzione, dato il suo apparente coinvolgimento nella decodificazione di segnali sensoriali complessi, nell'integrazione dei circuiti motori secondari e persino nell'elaborazione delle cosiddette funzioni associative superiori (Crick e Koch, 2005).

Le nozioni attuali sulle connessioni e sul ruolo del claustrò derivano in gran parte da studi sperimentali condotti su roditori di laboratorio e sul gatto (per via del coinvolgimento con la corteccia visiva. LeVay e Sherk, 1981) e naturalmente sui primati. Studi comparativi in altre specie hanno consentito di aggiungere informazioni su posizione, forma e citoarchitettura, ma hanno naturalmente lasciato irrisolti quesiti sull'effettivo compito svolto dal claustrò in specie con differenti modalità visive e cortecce motorie a diversa laminazione.

Conseguentemente le nostre nozioni sul claustrò dei cetacei – e in particolare dei delfinidi – derivano da studi che avevano come scopo la descrizione del cervello di una determinata specie. Siccome come si è detto la funzione del claustrò rimane ancora in parte non chiarita, anche lo spazio dedicato a questa struttura in questi ultimi articoli è in genere limitato (si vedano ad esempio i lavori di Oelschläger et al. 2008; Hof et al., 2005; Ridway et al., 1990; Jacobs et al. 1984; Morgane et al., 1982).

Non potendo approfondire il lavoro sperimentalmente, mi sono basata sul principio di Crick e Koch per cui in biologia “se si vuole capire la funzione, conviene studiare la struttura”. In particolare mi sono chiesta se fosse possibile attraverso lo studio anatomico e neurochimico di questa struttura nei mammiferi marini formulare un'ipotesi plausibile circa la sua funzione, basandomi sulle differenze rispetto ai mammiferi terrestri.

Il primo passo della mia ricerca è stato quello di selezionare una serie di encefali di tursiope all'interno di quanti fossero disponibili nella Banca per i tessuti dei mammiferi marini del Mediterraneo presente presso il Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università di Padova. La mia scelta si è basata su criteri di integrità del materiale, qualità del tessuto e tempi/condizioni di conservazione. La maggior parte degli encefali scelti apparteneva a esemplari morti in cattività.

Come descritto nelle parti precedenti, attraverso l'uso di sezioni spesse (1 cm) seriali ho potuto riconoscere e isolare facilmente il nucleo, grazie al confronto con atlanti di neuroanatomia dell'uomo e studi condotti nel tursiope stesso. La posizione rispetto

all'insula e ai gangli della base è la stessa che negli altri mammiferi (Buchanan e Johnson, 2011).

Ho potuto constatare che la regione si presentava con andamento ondulato a forte sviluppo dorso-ventrale, con uno spessore medio di circa 1 mm. La particolarità del Cl del tursiope risiedeva però nel fatto che la capsula sembrava più schiacciata verso l'insula rispetto ad altre specie e di conseguenza vi era una riduzione della capsula estrema rispetto alla capsula esterna. Questo andrebbe a conferma della tesi dei palleali sull'ontogenesi del claustrum, i quali sostengono che questo nucleo derivi dall'insula piuttosto che dal putamen (Pirone et al. 2012).

Per lo studio microscopico sono state applicate alle diverse sezioni due tipi di colorazione: quella di Nissl, una metodica di ampio utilizzo quando si vuole studiare la forma e la distribuzione di cellule nervose, e la tecnica dell'immunoistochimica con marcaggio delle proteine leganti il calcio (Andressen et al., 1993).

I risultati ottenuti mi hanno permesso un confronto molto ampio con gli altri mammiferi oggetto di studio, incluso l'uomo. Sulla base di quanto ho potuto riscontrare, i tipi cellulari che ho osservato sono gli stessi già descritti in altre specie e sintetizzati in una riuscita e completa review riguardante il Cl (Edelstein e Denaro, 2004).

I neuroni presenti erano suddivisibili difatto in "tipo 1", "tipo 2", "tipo 3". I primi di taglia grande ( $< 25 \mu\text{m}$ ) con soma semipiramidale o ovale, osservati soprattutto nella parte dorsale; quelli di "tipo 2" con corpo fusiforme e dendriti brevi con la probabile funzione di interneuroni e quelli di terzo tipo con nucleo ovale o tondo.

Quello per cui il tursiope si è nuovamente distinto è stata la distribuzione di queste cellule che sembravano avere una maggiore densità nella parte dorsale rispetto alla ventrale ed alcune di esse appartenenti alla capsula estrema, davano l'impressione di continuarsi con l'insula.

Lo studio fatto sulle proteine leganti il calcio ci ha dato ulteriori differenze, secondo la letteratura dovevamo aspettarci un forte marcaggio con la PV e qualche neurofilamento evidenziabile con la CR (Kowianski, 2009; Rahman, 2007; Real, 2003; Wojcik, 2004), invece abbiamo ottenuto una ampia immunoreattività con la CR, qualche neurone marcato con la CB e nessuno con la PV.

Prendendo atto che questo nucleo nei tursiopi ha la stessa forma, le stesse proporzioni e gli stessi rapporti che si osservano negli altri animali e che i tipi di neuroni da noi riconosciuti sono gli stessi che si possono trovare in qualsiasi encefalo, non è difficile pensare che il piano organizzativo di questa struttura rimanga lo stesso

delle specie più studiate (Dinopoulos et al., 1992; Minciocchi et al., 1991; LeVay and Sherk, 1981; Bialowas e Chadzypanagiotis, 1972; Carman et al., 1964) rispecchiando il principio generale che la filogenesi tende a mantenere una radice comune nei diversi gruppi di mammiferi.

Non è possibile identificare col mio solo studio precise parti e funzionamenti differenti, tuttavia considerando quanto è noto sulle connessioni da e per la corteccia (Azzaroni e Rapisarda, 1966; Carey e Neal, 1985; Gabor, 1962) rimane complicato potere identificare un preciso ruolo del claustro all'interno dello sviluppo del programma di elaborazione delle immagini (Sherk e LeVay, 1981). E' inoltre difficile poter collegare soltanto con quello che ho riscontrato, il Cl a una funzione visiva in mammiferi che si muovono in un ambiente in cui queste informazioni sono necessariamente penalizzate dalla perdita di colori e di luci che si verifica con la profondità (Dawson, 1980).

Ben diverso è invece il concetto generale per il cui il Cl possa comunque interagire nell'elaborazione delle informazioni sensitive e con queste svolgere un compito importante nell'orientamento dell'animale in relazione alla risposta sensoriale (Hassmannova, 1977). E' difatti possibile che il Cl agisca non in risposta a stimolazioni visive come avviene principalmente nei mammiferi terrestri, ma in risposta a stimolazioni di tipo anche sonoro o comunque sensoriali tattili. Questa ipotesi non può naturalmente né essere supportata né smentita soltanto sulla base della mia evidenza sperimentale, pongo però a parziale sostegno teorico di quanto appena affermato la considerazione che le aree visive e motorie nei mammiferi marini sono sensibilmente spostate rispetto a quanto avviene nei mammiferi terrestri.

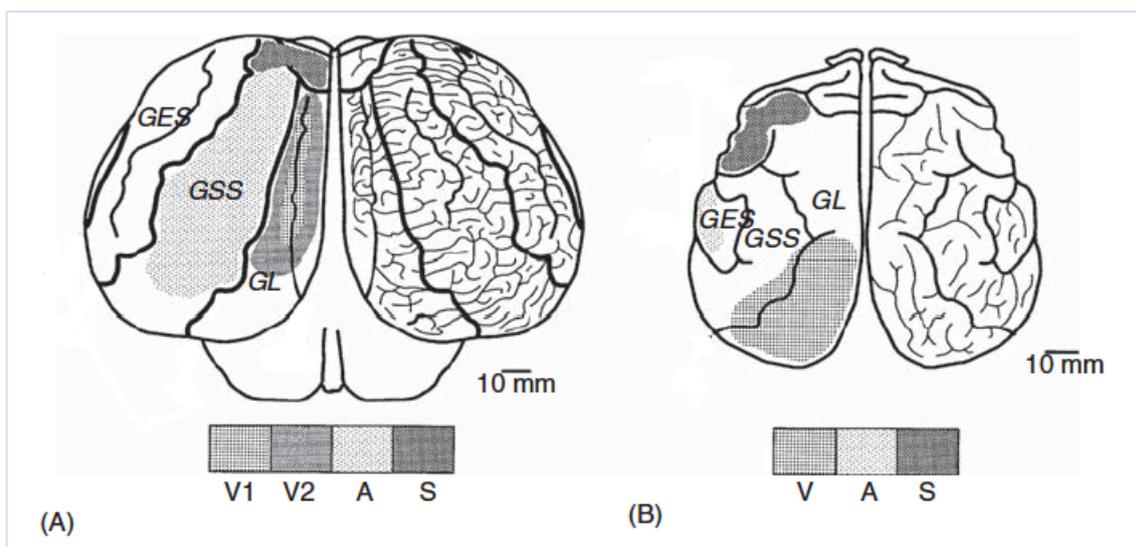


Fig. 21: Proiezioni delle aree sensitive di encefali di delfino (A) e foca (B). Sono colorate le aree corticali deputate alla visione (V, V1, V2), all'udito (A) e la corteccia somatosensitiva (S). Le altre abbreviazioni corrispondono al gyrus ectosylvius (GES), gyrus suprasylvius (GSS), gyrus lateralis (GL). Mass e Supin, *Encyclopedia of Marine Mammals* 2008

Risulterebbe quindi difficile pensare che una connessione con i lobi occipitali e le aree intorno alla 17 di Brodmann (corteccia visiva primaria - BA17 - Brodmann, 1909) nei mammiferi terrestri si mantengano in animali in cui la stessa area funzionale è totalmente spostata vicino al piano sagittale in corrispondenza di quello che si verifica nel lobo paralimbico (Morgane e Jacobs, 1972).

La composizione neurochimica diversa mi suggerisce in aggiunta che la citoarchitettura si orienta insieme alla neurochimica a fornire qualche struttura che abbia un diverso rapporto, magari potenzialmente legato ai circuiti inibitori che sono alla base di molte delle funzioni delle proteine leganti il calcio. Anche in questo caso non ho elementi che mi consentano di dire altro rispetto al possibile ruolo svolto dal nucleo di nostro interesse.

Dal punto di vista delle proiezioni da e per il Cl un altro punto di grande importanza che va ricordato è che le proiezioni specifiche si accompagnano nei mammiferi alla terminazione o alla provenienza da lamine corticali che hanno una diversa composizione colonnare. In queste ultime aree si riscontrano una serie di strati che hanno diverse proporzioni e circuiti integrati che variano da area a area (Nieuwenhuys et al., 1998). E' noto che nella corteccia dei cetacei questo non si verifica in quanto la laminazione si mantiene costante con un'intensa riduzione degli interneuroni del IV strato e della loro funzione (Morgane e Jacobs, 1972). Alla questione della difficile collocazione del Cl, dovuta alla mancanza di dati elettrofisiologici e di studi basati sulla visione, si aggiunge quindi il fatto che la struttura non abbia in realtà la possibilità di essere identificata in relazione a un bersaglio differente nella mappa corticale, rimanendo quest'ultima costante. Le localizzazioni funzionali della corteccia che ho ricordato prima per quanto riguarda la parte visiva sono basati su studi elettrofisiologici del passato e non possono essere oggi né ripercorsi, né modificati per gli ovvi motivi etici che tutti conosciamo e condividiamo.

In conclusione quindi posso affermare che il Cl è sorprendentemente, se posso dirlo, uguale nel tursiope rispetto a quanto si verifica nei mammiferi terrestri mostrando però qualche differenza nei rapporti soprattutto della parte ventrale, dovuta all'assenza del lobo piriforme. Rimane una composizione chimica dei suoi mediatori che fa pensare a una ricca interazione con le altre strutture e posso pensare che questa interazione sia legata al mondo sensoriale non avendo altri elementi per poter distinguere una diversa modalità anche sulla base della povertà dei dati corticali.

Da questo punto di vista il mio studio rappresenta comunque un passo avanti per gli studi che consentano di identificare, se non una mappa funzionale su base neurochimica, per lo meno una mappa organizzativa del piano generale dell'encefalo di queste specie e in questo senso rappresenta un contributo a una migliore conoscenza delle specie stesse.



## *BIBLIOGRAFIA*



Andersen DL, (1968) Some striatal connections to the claustrum. *Exp. Neurol.* 20: 261-267

Anraku S, Kunitake A, Imasato K, Inoue R e Maeda K(1973) An autopsy case of myoclonus epilepsy - Gaucher's disease. *J. Kurume Med.* 20: 235-239

Ariens-Kappers CV, Huber GC e Crosby EC (1936) The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates Including Man. *MacMillan* Vol. II

Azzaroni A, e Rapisarda C (1966) Analysis of projections of the claustrum on the cerebral cortex in the cat. *Arch. Sci. Biol.* 50: 148-166.

Azzaroni A, Infantellina F e Sanseverino ER (1968) Relations with the claustrum of the associative and anterior nuclei of the thalamus in unanesthetized cats. *Arch. Sci. Biol.* 52: 246-253

Bear MF e Carey RG (1979) Visual projections of the tree shrew claustrum: An anterograde and retrograde transport study. *Soc. Neurosci. Abstr.* 5: 777

Berke JJ (1958) An Experimental Study of the External Capsule, the Extreme Capsule and the Claustrum of the Macaque. *Ph.D. Dissertation, University of Michigan*

Bialowas J e Chadzypanagiotis D (1972) Structure of the claustrum in rabbits. *Folia Morphol.* 31: 73-81

Braak H e Braak E (1982) Neuronal types in the claustrum of man. *Anat. Embryol.* 163:447-460.

Brockhaus H (1940) Cytoarchitectural and myeloarchitectural study of claustral cortex and claustrum in man. *J. Psychol. Neurol.* 49:249-348

Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues.

Buchanan JK e Johnson IJ (2011) Diversity of spatial relationships of the claustrum and insula in branches of the mammalian radiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* Vol. 1225 pp. 30-63

Cajal S Ramon y (1928) Degeneration and Regeneration of the Nervous System, translated. *Oxford University Press.*

Carey RG e Neal TL (1985) The rat claustrum: Afferent and efferent connections with the visual cortex. *Brain Res.* 329: 185-193

- Carman JB, Cowan WM e Powell TPS (1964) The cortical projection upon the claustrum. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 27: 46-51
- Castellini M A e Somero GN (1981). Buffering Capacity of Vertebrate Muscle: Correlations with Potentials for Anaerobic Function. *J. Comp. Physiol.* 143: 191–198
- Chadzypanagiotis D e Narkiewicz O (1971) Connections of the visual cortex with claustrum. *Acta Neurobiol. Exp.* 31:291-311
- Crick FC e Koch K (2005) What is the function of claustrum? *Phil. Trans. R. Soc. B.* 1271–1279
- Dawson W ( 1980 ) The cetacean eye . *Cetacean Behavior: Mechanisms and Functions* pp. 53 -100
- DeVries E (1910) Bemerkungen zur Ontogenie und vergleichenden Anatomie des Claustrums. *Folia Neurobiol.* 4: 481-513
- Dinopoulos A, Papadopoulos GC, Michaloudi H, Parnavelas JG, Uylings HB et al. (1992) Claustrum in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) brain: cytoarchitecture and connections with cortical and subcortical structures. *J. Comp. Neurol.* 187–205
- Dodgson MCH (1955) A congenital malformation of insular cortex in man, involving the claustrum and certain subcortical centers. *J. Comp. Neurol.* 102: 341-364
- Druga R (1966) The claustrum of the cat (*Felis domestica*). *Folia morphol.* 14: 7-16
- Edelstein LR e Denaro FJ (2004) The claustrum: a historical review of its anatomy, physiology, cytochemistry and functional significance. *Cell Mol. Biol.* 50: 675–702
- Filimonoff IN (1966) The claustrum: Its origin and development. *J. Hirnforsch.* 8: 503-528
- Flanigan NJ (1966) The anatomy of the spinal cord of the Pacific striped dolphin, *Lagenorhynchus obliquidens*. *Whales, Dolphins and Porpoises* pp. 207–231
- Fujioka M (1980) Projection to the striatum and the claustrum from the somatic sensory cortex in monkey. *Brain and Nerve* 32: 269-279
- Gabor AJ (1962) Subcortical connections of the claustrum. *Anat. Rec.* 142: 233-234
- Geraci JR, St. Aubin DJ e Hicks JB (1986). The epidermis of odontocetes: A view from within. *Research on Dolphins* pp. 3–31

- Graybiel AM (1982) Correlative studies of histochemistry and fiber connections in the central nervous system. *Neurology and Neurobiology*, Vol. 1 pp. 45-67
- Hadjikhani N, Roland PE (1998) Cross-modal transfer of information between the tactile and the visual representations in the human brain: a positron emission tomographic study. *J. Neuroscience* 8(3): 1072-108
- Hassmannova J (1977) Role of the claustrum in sensory activation. *Physiol. Bohemoslov.* 26: 345-352
- Hof PR, Glezer II, Conde´ F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J. Chem. Neuroanat.* 16:77–116
- Hof PR, Chanis R, Marino L (2005) Cortical complexity in cetacean brains. *Anat. Rec.* Vol. 287
- Infantellina F, Rapisarda C e Urbano A (1967) Microphysiological study of the somatic afferents to the claustrum of the cat. *Riv. Neurol.* 37: 5
- Jacobs SM, Galaburda AM, McFarland LW, Morgane PJ (2004) The insular formations of the dolphin brain: Quantitative cytoarchitectonic studies of the insular component of the limbic lobe. *J. Comp. Neurol.* 225: 396-432
- Jansen J e Jansen JKS(1969). The nervous system of Cetacea. *The Biology of Marine Mammals* pp. 175–252.
- Kalashnikova NS (1972) The role of the claustrum in conditioned activity. *Zh. Vyssh. Nervn. Deyat.* 22: 76-81
- Kuhlenbeck H (1973) The central nervous system of vertebrates. *Morphologic Pattern of the Vertebrate Neuraxis* Vol 3 pp. 586-589.
- Kunzle H (1975) Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res.* 88: 195-209
- Landau E (1919) The comparative anatomy of the nucleus amygdalae, the claustrum and the insular cortex. *J. Anat.* 53: 351-360
- Landau E (1936) New studies on claustrum. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 23: 165-181
- Landau E (1939) Myeloarchitectonics of insula and claustrum. *Arch. Neurol. Psychiat.* 43: 287-294.

- LeVay S e Sherk H (1981) The visual claustrum of the cat. I. Structure and connections. *J. Neurosci.* 1: 956-980.
- LeVay S e Sherk H (1981) The visual claustrum of the cat. II. The visual field map. *J. Neurosci.* 1: 981-992
- Macchi G (1948) Morphology and structure of human claustrum. *Cervello* 24: 1-26
- Macchi G, Il problema del clastro umano dal punto di vista ontogenetico. *Pontiff Ace. Scient.* 11: 205-240
- Macchi G, Bentivoglio M, Minciocchi D e Molinari M (1981) Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing. *J. Comp. Neurol.* 215:121-134
- Mamos L (1984) Morphology of claustral neurons in the rat. *Folia Morphol.* 43: 73-78.
- Markowitsch HJ, Irle E, Bang-Olson R e Flindt-Egebak P (1984) Claustral efferents to the cat's limbic cortex studied with retrograde and anterograde tracing techniques. *Neuroscience* 12: 409-425
- Marino L (1998) A Comparison of Encephalization between Odontocete Cetaceans and Anthropoid Primates. *Brain Behav. Evol.* 51:230-238
- Mead JP (1975) Anatomy of the external nasal passages and facial complex in the Delphinidae (Mammalia: Cetacea). *Smithsonian Contributions to Zoology*
- Miller MW e Vogt BA (1984) Direct connections of rat visual cortex with sensory, motor and association cortices. *J. Comp. Neurol.* 226: 184-202
- Morgane PJ e Jacobs MS (1972) Comparative anatomy of the cetacean nervous system. *Functional Anatomy of Marine Mammals* pp.117-224
- Moon RE, Vann RD e Bennett PD (1995). The Physiology of Decompression Illness. *Sci. Am.* 273:70-77
- Narkiewicz O, (1964) Degenerations in the claustrum after regional neocortical ablations in the cat. *J. Comp. Neurol.* 123: 335-356
- Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C (1972) The Central Nervous System of Vertebrates. *Springer* vol. 3
- Norris KS (1964) Some problems of echolocation in cetaceans. *Marine bioacoustics*
- Olsen CR e Graybiel AM (1980) Sensory maps in the claustrum of the cat. *Nature* 288:

479-481

Oelschläger HHA, Haas-Rioth M, Fung C, Ridgway SH, Knauth M (2008) Morphology and Evolutionary Biology of the Dolphin (*Delphinus* sp.) Brain – MR Imaging and Conventional Histology. *Brain. Behav. Evol.* 71:68–86

Oelschläger HHA e Oelschläger JS (2002) Brain. *Marine Mammals Encyclopedia* pp.133-158

Pilleri G, Gihm (1970) The central nervous system of the mysticete and odontocete whales *Investigation of Cetacea*

Pirone A, Cozzi B, Edelstein L, Peruffo A, Lenzi C, Quilici F, Antonini R, Castagna M (2012) Topography of Gng2- and NetrinG2-Expression Suggests an Insular Origin of the Human Claustrum. *Plos One* 7 e44745

Ptito M, Lassonde MC e Guillemot JP (1980) Effects of claustral stimulation on visual cortex neurons of cats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* S2: 283

Rae ASL (1954) The connections of the claustrum. *Confin. Neurol.* 14: 211-219

Real MA, Davila JC, Guirado S (2003) Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum. *J. Chem. Neuroanat.* 151-60.

Redouté J, Stoléro S, Grégoire M, Costes N, Cinotti L, Lavenne F (2000) Brain processing of visual sexual stimuli in human males. *Human Brain Mapping* 11:162-177

Reynhout K e Baizer JS (1999) Immunoreactivity for calcium-binding proteins in the claustrum of the monkey. *Anat. Embryol.* 75-83

Rojas-Bracho L e Smith BD (2008) *Tursiops truncatus*. *Red List of Threatened Species*. Vers. 2012.2

Ruiz AO (1960) Vias de degeneracion a partir de estereotaxis del claustrum cerebral (análisis en el gato). *An. Anat.* 9: 283-307

Sanides D e Buchholtz (1979) Identification of the projection from the visual cortex to the claustrum by anterograde axonal transport in the cat. *Exp. Brain Res.* 34: 197-200

Sato Y (1960) Comparative anatomical study on the claustrum of primates. *Kobe J. Med. Sci.* 6: 13-14

Savenko LD (1972) Size and location of the claustrum of the cat brain. *Zh. Eksp. Klin. Med.* 12: 28-34

Sherk H e LeVay S (1981) The visual claustrum of the cat. III. Receptive field

properties. *J. Neurosci.* 1: 993-1002

Sherk H e LeVay S (1981) Visual claustrum: Topography and receptive field properties in the cat. *Science* 212: 87-89

Sherk H e LeVay S (1981) Contribution of the cortico-claustral loop to receptive field properties in area 17 of the cat. *J. Neurosci.* 3:2121-2127

Sloniewski P e Pilgrim C (1985) Connectivity of the claustrum. *Neurosci. Lett.* 22

Spector I (1969) Functional organization of the claustrum. *Anat. Rec.* 163: 269

Spector I, Hassmannova J e Albe-Fessard D (1975) Somatosensory properties of neurons in the cat's claustrum. *Publ. Sci. Group* pp. 135-144

Urbano A, Rapisarda C e Infantellina F (1966) Indagine elettrofisiologica sull'organizzazione funzionale dei neuroni del clastro sensibili alla stimolazione somatica. *Att. Anl. R.F.* 41:118

Wells R, Pryor K, Norris KS (1987) The role of long-term study in understanding the social structure of a bottlenose dolphin community. *Dolphin societies*

Zhgenti NA e Khanaeva ZS (1976) The organization of the claustrum somatosensory afferent input in cats. *Soobshch. Akad. Nauk Gruz.* 80: 165-168

Zhgenti NA e Timchenko AS (1973) Interaction of the responses of the claustrum evoked by various peripheral stimuli. *Soobsch. Akad. Nauk Gruz.* 72: 657-660

## *APPENDICE*



## 7.1 Appendice I

### *I Cetacei*

La maggior parte dei mammiferi marini appartiene all'ordine dei Cetacei (Brisson, 1792) che include al suo interno balene, delfini e focene. Il nome "Cetacea" deriva dal greco κῆτος (kētos), che significa balena o mostro marino e fu introdotto da Aristotele per designare animali acquatici dotati di respirazione polmonare.

### *Evoluzione*

La colonizzazione dell'ambiente acquatico da parte dei mammiferi marini risale a circa 54 milioni di anni fa durante il periodo dell'Eocene.

Il primo antenato dei Cetacei è ritenuto essere il *Pakicetus*, un artiodattilo primitivo vissuto circa 35 milioni di anni fa. Analisi molecolari svolte sui suoi resti di questo animale hanno dimostrato la vicinanza filogenetica con l'ordine degli Artiodattili odierno e in particolare con gli Hippopotamidae. Per questo è stato creato il clade Cetartiodactyla che racchiude al suo interno sia gli Artiodattili che i Cetacei, smentendo così la tesi secondo cui invece la loro origine fosse legata ai Mesonichidi, un gruppo di ungulati carnivori.

### *Classificazione*

Regno: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Mammalia

Sottoclasse: Theria

Infraclasse: Eutheria

Ordine: Cetacea

I Cetacei sono suddivisi in tre sottordini di cui solamente due ancora viventi:

- Mysticeti
- Odontoceti

- Achaeoceti (estinti)

I Mysticeti, cioè le balene dotate di fanoni sono suddivise a loro volta in molteplici famiglie di cui solamente quattro ancora viventi:

- Balaenidae
- Balaenopteridae
- Eschrichtiidae
- Neobalaenidae

Infine gli Odontoceti, balene coi denti, a cui appartengono circa 74 specie raggruppate in 6 famiglie:

- Delphinidae
- Monodontidae
- Phocoenidae
- Physeteridae
- Platanistidae
- Iniidae
- Ziphiidae

### *Anatomia e adattamento alla vita marina*

#### *Struttura anatomica esterna*

Il corpo risulta affusolato e allungato, atto a conferire una maggiore idrodinamicità. Il capo è legato al tronco senza una regione del collo morfologicamente individuabile e il muso culmina con un rostro evidente nella maggior parte delle specie mentre in altre è visibile solo a livello scheletrico e non esteriormente. Le cavità nasali comunicano con l'eterno attraverso lo sfiatatoio, posizionato in maniera periscopica sulla sommità del capo, in modo da consentire il contatto con l'aria alla minima emersione. Gli arti anteriori sono modificati in pinne di piccole dimensioni con funzione esclusivamente direzionale ("pinne pettorali"); gli arti posteriori sono invece assenti, ma

ne rimangono alcune ossa vestigiali (“residui pelvici”) nascoste all’interno della massa muscolare della pinna caudale.

L’epidermide è costituita da un epitelio pavimentoso pluristratificato ed è circa 10-20 volte più spessa di quella dei mammiferi terrestri, con uno strato più esterno che viene sostituito circa 12 volte al giorno (Geraci et al., 1986). La presenza di speciali creste cutanee evita la formazione di vortici e agevola lo scivolamento nel mezzo acquoso, consentendo a questi animali di raggiungere velocità di nuoto elevate. L’ipoderma è uno spesso strato di grasso (“blubber”) che evita la dispersione del calore e rappresenta un importante riserva generalmente mobilizzata durante la gestazione, l’allattamento o in condizioni di digiuno.

I peli sono assenti anche se in alcune specie durante i primi mesi di vita sono presenti delle vibrisse attorno alla rima buccale che vengono poi perse.

#### *Apparato scheletrico*

Lo scheletro dei cetacei è costituito da ossa di tipo spugnoso impregnate di grasso che favoriscono il galleggiamento. Il cranio è telescopico, con mascellari, premaxillari e vomere particolarmente allungati ed è caratterizzato da asimmetria probabilmente dovuta al fatto che la parte destra è deputata alla produzione dei suoni (Norris, 1964; Mead, 1975). La colonna vertebrale è caratterizzata da una regione cervicale con 7 vertebre spesso fuse tra loro a seconda dell’età dell’animale, assenza della regione sacrale e variabilità nel numero di vertebre della regione toracica, lombare e caudale che godono di estrema mobilità permettendo un ottimo movimento di propulsione durante nuoto. L’arto presenta omero, ulna e radio compressi dorso-ventralmente con quest’ultimi più lunghi rispetto al primo. Unico caso nei mammiferi, i cetacei mostrano una marcata iperfalangia, fenomeno riscontrato anche negli ittiosauri e nei mosasauri.

#### *Apparati respiratorio e circolatorio*

La capacità dei cetacei di raggiungere profondità rilevanti è frutto di una specializzazione degli apparati respiratorio e circolatorio. La via alimentare e quella respiratoria sono separate e lo sfiatatoio costituisce l’unica via di assunzione di ossigeno atmosferico. Inspirazione ed espirazione avvengono molto rapidamente nei brevi istanti di emersione in superficie cui si susseguono lunghe apnee. Durante le immersioni i polmoni sono sottoposti a elevate pressioni fin quasi a collassare, la riserva d’ossigeno è

quindi deputata al sangue che presenta un alto livello di emoglobina e maggiore affinità rispetto a quella dei mammiferi terrestri, basti pensare che un delfino fissa il 90% dell'ossigeno respirato e un uomo solo il 21% (Ridgway et al., 1969) e lo stesso dicasi per la mioglobina a livello muscolare. Questa loro capacità permette anche di minimizzare i rischi di malattie da decompressione o narcosi da azoto mediante la compartimentazione alveolare dell'aria compressa residua (Moon et al., 1995) e gli effetti derivanti dall'anidride carbonica e dall'acido lattico prodotti dal metabolismo anaerobio grazie a una maggiore capacità tamponante a livello muscolare (Castellini et al., 1981).

Nonostante si osservi l'instaurarsi di bradicardia durante l'immersione, la pressione sanguigna rimane relativamente costante grazie all'ischemia selettiva che si verifica a livello dei vasi periferici e degli organi viscerali, permettendo un continuo afflusso di sangue a cervello e cuore, che non potrebbero sopportarne la riduzione. Il quadro circolatorio è infine completato dalla presenza di una serie di reti mirabili costituite da una massa di arterie spiraliformi e contorte, contigue a vene dotate di una sottilissima parete per assicurare uno scambio termico tale da consentire il ritorno del sangue dalla periferia senza perdere eccessivamente calore.

#### *Apparato digerente*

I cetacei sono degli animali poligastrici. Lo stomaco si sviluppa in differenti concamerazioni ciascuna delle quali costituita da tre tonache. Nel *Tursiops truncatus* è possibile distinguere una prima camera o prestomaco aghiandolare, deputata alla riduzione del cibo giacché le prede sono ingerite intere; un secondo stomaco che produce i succhi gastrici e una terza camera corrispondente alla zona pilorica. L'intestino è molto sviluppato, probabilmente in modo da favorire il mantenimento del bilancio idrico, ma non si riscontrano particolari differenze nei diversi tratti poiché la dieta è composta per la maggior parte da proteine (Berta, 2006). In alcuni mysticeti sono tuttavia presenti dilatazioni atte alla fermentazione batterica. Il fegato è scarsamente lobulato, la cistifellea è assente e la bile viene costantemente riversata nel duodeno, visto che l'assunzione di cibo da parte di questi animali è costante.

#### *Apparato urinario*

I reni sono polilobati e costituiti da numerosi reniculi, unità funzionali che possiedono struttura e funzione di un rene ma dotate di ampie riserve di

glicogeno, necessarie a superare lo scarso apporto sanguigno durante le immersioni. L'urina è solo leggermente più concentrata dell'acqua marina per limitare la perdita di liquidi e tutto il fabbisogno di acqua è soddisfatto dalla dieta, anche se alcune specie sono state osservate bere in particolari condizioni.

#### *Apparato riproduttore*

La struttura anatomica dell'apparato riproduttore dei cetacei è in tutto simile a quello dei mammiferi terrestri. Salvo per alcune peculiarità come l'alloggiamento interno dei testicoli, i corpi albicans che rimangono visibili sulle ovaie permettendo così una datazione dell'animale e le ghiandole mammarie sulle nascoste all'interno di tasche ("fessure mammarie") poste ai lati della vagina.

## 7.2 Appendice II

### Colorazione di Nissl

1. Incubazione dei vetrini in una soluzione di cloroformio/etanolo (1:1)	90-120'
2. Reidratazione con alcoli:	
Alcool assoluto 100%	5'
Alcool assoluto 100%	5'
Alcool 95%	5'
Alcool 70%	5'
Alcool 50%	5'
3. Due lavaggi in acqua distillata	2'
4. Incubazione in tionina in stufa a 58°C	60'
5. Due lavaggi in acqua distillata	1'
6. Disidratazione con alcoli:	
Alcool 50%	3'
Alcool 70%	3'
Alcool 95%	3'
Alcool assoluto 100%	3'
Alcool assoluto 100%	3'
7. Tre passaggi in xilolo	5'
8. Montaggio vetrini con balsamo	

---

*Colorazione immunoistochimica*

## 1. Deparaffinazione:

Due passaggi in xilolo	5'
Alcool assoluto 100%	3'
Alcool assoluto 100%	3'
Alcool 95%	3'
Alcool 70%	3'
Alcool 50%	3'

## 2. Blocco delle perossidasi endogene:

Soluzione di PBS e 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10'
---	-----

## 3. Tre lavaggi in PBS (Phosphate buffered saline)

5'

## 4. Smascheramento antigene:

Tampone citrato pH 6 in autoclave a 120°	4'
--	----

## 5. Tre lavaggi in PBS

5'

## 6. Saturazione siti antigenici non specifici:

Soluzione di NGS 4% (normal goat serum) e BSA (bovine serum albumin) 5% PBS	20'
---	-----

## 7. Incubazione con anticorpo primario a 4°C:

- Anti-parvalbumina (PV), monoclonale, prodotto in topo (SIGMA) 1:1000
- Anti-calbindina-D28K (CB), monoclonale, prodotto in topo (SIGMA) 1:1000
- Anti-calretinina (CR), policlonale, prodotto in coniglio (SIGMA) 1:1000
- Anti-guanine nucleotide binding protein (GnG2), monoclonale, prodotto in mouse (SIGMA) 1:25

overnight

## 8. Tre lavaggi in PBS

5'

---

9. Incubazione con anticorpo secondario:	
• Biotinylated anti-mouse IgG, prodotto in capra (Vector) diretto contro l'anticorpo primario anti-PV, anti-CB, anti-GnG2	
• Biotinylated anti-rabbit IgG, prodotto in capra (Vector) diretto contro l'anticorpo primario anti-CR	
	30'
10. Tre lavaggi in PBS	5'
11. Incubazione con il sistema avidina-biotina-perossidasi (Vectastain ABC kit)	30'
12. Tre lavaggi in PBS	3'
13. Sviluppo reazione:	
DAB o DAB-Nickel (Vector)	3' - 4'
14. Blocco reazione:	
Acqua di fonte	1'
15. Lavaggio in acqua distillata	1'
16. Disidratazione con alcoli:	
Alcool 50%	3'
Alcool 70%	3'
Alcool 95%	3'
Alcool assoluto 100%	3'
Alcool assoluto 100%	3'
7. Tre passaggi in xilolo	5'
8. Montaggio vetrini con balsamo	



## *RINGRAZIAMENTI*



Al Professor Bruno Cozzi, ch'è stato mio Maestro nel senso più autentico del termine e “vedendo il cielo si benigno ha dato all'Opera conforto”.

Al mio laboratorio, seconda unica grande famiglia: Giovanni, Tommaso, Elena, Laura, Roberta, Carlo, Antonella, Stefano, le super colleghe Maristella e Tiziana, i professori del BCA e tutti i dottorandi.

A Mattia, che ha sopportato la mia curiosità e ha condiviso con me le sue scoperte sul mondo marino e animale.

A Giulio, con cui la vita è diventata l'avventura che ho sempre desiderato.

A Erica, Ottavia, Valerio, Martina: la mia vera famiglia; ai miei genitori, nonni, zii, parenti vari.

À mes amis, my friends, meinen Freunden, mes amigos, ħbieb tiegħi, arkadaşlarım, mijn vrienden, φίλη μου, ai miei amici...

Con infinita riconoscenza e profondo affetto,

Giulia





