

*A mio nonno Stefano,
genio e cantastorie*

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE E DELLA VITA



Tesi di Laurea Magistrale in Biologia e Ecologia Marina

Analisi del bulbo olfattivo di due specie di Galeomorphii mediante la tecnica di frammentazione isotropica

Relatore: Dott.ssa Sara Ferrando

Correlatore: Dott.ssa Marzia Bo

Candidato: Stefano Aicardi

a.a. 2018/2019

| | |
|---|-----------|
| ABSTRACT | 4 |
| INTRODUZIONE..... | 5 |
| I PESCI CARTILAGINEI..... | 5 |
| GLI SCYLIORHINIDÆ..... | 6 |
| LE SPECIE DELLO STUDIO..... | 8 |
| I SENSI..... | 9 |
| L'OLFATTO..... | 11 |
| <i>Epitelio Olfattivo</i> | 11 |
| <i>Lamina propria</i> | 13 |
| <i>Bulbo Olfattivo</i> | 13 |
| <i>Recettori olfattivi e trasduzione del segnale</i> | 14 |
| SCOPO DEL LAVORO..... | 15 |
| MATERIALI & METODI..... | 17 |
| CAMPIONAMENTO E FISSAZIONE..... | 17 |
| PRELIEVO DEI CAMPIONI ANATOMICI..... | 17 |
| ANALISI DELLE ROSETTE OLFATTIVE..... | 17 |
| <i>Anatomia macroscopica</i> | 17 |
| <i>Anatomia microscopica</i> | 18 |
| ANALISI DEI BULBI OLFATTIVI..... | 20 |
| <i>Pesata OB</i> | 20 |
| <i>Conta cellule</i> | 20 |
| <i>Percentuale dei neuroni</i> | 21 |
| ANALISI D'IMMAGINE DELLE ROSETTE OLFATTIVE..... | 22 |
| ANALISI D'IMMAGINE DEI BULBI OLFATTIVI..... | 22 |
| ANALISI STATISTICHE..... | 22 |
| <i>Correlazioni fra variabili</i> | 22 |
| <i>Test non parametrico di Mann-Whitney</i> | 22 |
| <i>Tabelle riassuntive</i> | 23 |
| RISULTATI..... | 24 |
| CALCOLO DEL NUMERO TOTALE DI CELLULE, DI NEURONI E DI CELLULE NON NEURONALI NEL BULBO OLFATTIVO..... | 24 |
| CALCOLO DELLA SUPERFICIE DELLE ROSETTE OLFATTIVE CON IL METODO DI INTERPOLAZIONE..... | 25 |
| CALCOLO DEL RAPPORTO FRA NUMERO TOTALE NEURONI NEL BULBO OLFATTIVO E PESO DEL BULBO OLFATTIVO, FRA CELLULE NON NEURONALI E NEURONI E FRA NUMERO TOTALE DI NEURONI E SUPERFICIE CALCOLATA DELL'EPITELIO OLFATTIVO..... | 26 |
| DISCUSSIONI & CONCLUSIONI..... | 27 |
| BIBLIOGRAFIA | 32 |

Abstract

Negli elasmobranchi, così come in tutti i vertebrati, la regione cerebrale deputata alla ricezione degli stimoli provenienti dall'organo olfattivo, prende il nome di bulbo. Negli squali, il bulbo olfattivo si trova in prossimità della rosetta olfattiva ed è collegato al telencefalo mediante il peduncolo olfattivo. Gli odoranti, vengono captati dai neuroni dell'epitelio sensoriale, e, grazie alla generazione di potenziali di azione, lo stimolo viene trasmesso lungo gli assoni direttamente alle cellule neuronali del bulbo. Per parecchio tempo la dimensione del bulbo olfattivo è stata messa in relazione con il resto della massa cerebrale, e si è correlata positivamente la grandezza di tale rapporto con una buona capacità olfattiva. Recentemente questa considerazione è stata messa in discussione e si è dato il via a nuovi tipi di indagini morfologiche e fisiologiche. Una di queste considera il numero totale di neuroni presente nel bulbo. Questo descrittore si avvale di una relativamente nuova metodica: la frammentazione isotropica. Il bulbo, struttura organizzata a corteccia, dove sono presenti almeno tre tipi neuronali (le cellule mitrali, le cellule glomerulari e le cellule granulari), viene trasformato in una soluzione omogenea e tamponata con i nuclei in sospensione. Mediante prima una colorazione nucleare aspecifica e poi un trattamento immunocitochimico si determinano il numero totale di cellule, la percentuale di neuroni e il loro numero totale. Grazie ad un'analisi parallela effettuata sulle rosette olfattive si sono correlati questi due organi ottenendo una stima di densità neuronale su superficie di epitelio olfattivo. Questa tecnica è stata testata su due specie di Galeomorphii, *Galeus melastomus* e *Scyliorhinus canicula*. Oltre a saggiare la bontà e l'efficacia della metodica si è anche indagato sul perché delle differenze osservate nelle due specie prese in esame. Grazie all'utilizzo dell'analisi delle componenti principali (PCA), e dopo aver discusso i dati in una visione ontogenetica e ecologica, si è evinto che le differenze osservate sia a livello intraspecifico che interspecifico, potrebbero essere collegate a variazioni legate all'età degli animali e dalle diverse strategie alimentari messe in atto dalle stesse.

Introduzione

I pesci cartilaginei

I *Chondrichthyes*, Condroitti o Condritti, [dal greco condros- (cartilagine) -ichthys (pesce)] sono una classe di pesci del phylum dei Chordata. Comprende due sottoclassi viventi: gli Olocefali (chimere) e gli Elasmobranchi (squali e razze). Il numero totale di specie è ancora oggetto di discussione, ma le ultime stime lo attestano a circa 1200 (Nelson et al., 2016) così suddivise: 16 ordini, 61 famiglie e 199 generi (Weigmann, 2016).

I primi fossili di cui si ha la quasi totale certezza appartengano ad un primo antenato dei Condroitti risalgono a circa 415-409 m.a.f., durante il Devoniano (Ebert et al., 2013; Nelson et al., 2016). Controversi, invece, sono i ritrovamenti di fossili analoghi, ma ben più antichi, risalenti al Siluriano e all'Ordoviciano, probabilmente appartenuti ad uno stem-group dei pesci cartilaginei. Durante il Carbonifero e il Permiano i pesci cartilaginei ebbero una vera e propria radiazione adattativa che, oltre ad aumentare il numero in specie e la loro distribuzione a livello mondiale, diede anche origine alle due sottoclassi tutt'ora esistenti:

- Holocephali;
- Elasmobranchii;

Le due classi sono considerate monofiletiche. A loro volta gli Elasmobranchii si suddividono in due, Selachii (squali) e Batomorphi (razze e mante) (Fig.1.1).

Le sinapomorfie che contraddistinguono in maniera univoca questa classe sono due: la calcificazione endoscheletrica prismatica e i clasper pelvici (o pterigopodi) (Grogan and Lund, 2004).

La prima chiave si riferisce ad uno dei tre meccanismi di calcificazione dello scheletro nei Condroitti: areolare, globulare e, appunto, prismatica. Nello specifico, la calcificazione prismatica, contribuisce insieme al meccanismo di calcificazione globulare, alla costruzione di quasi tutte le strutture dello scheletro ad eccezione delle vertebre (calcificazione areolare). È sempre associata al pericondrio, che riveste totalmente di tessere irrobustite da granuli di idrossiapatite, utili alla formazione di condroblasti,

condrociti e altre cellule con funzione trofica dando origine alla cosiddetta “tessellated cartilage” (Dean e Summer, 2006). Sono comunque presenti strutture scheletriche ossee vere e proprie rappresentate dalle scaglie placoidi (o scheletro dermico), che ricoprono l'intera superficie corporea, e dai denti, non fissati alle mascelle e in continuo ricambio (Nelson et al., 2016).

I clasper pelvici sono strutture presenti nei Condroitti di genere maschile. Si originano a seguito della calcificazione dell'asse delle pinne pelviche (sono organi pari) durante la maturità e sono utilizzati come mezzo per attuare la fecondazione interna (presente in tutti i taxa estinti e viventi), inserendosi all'interno della cloaca e all'ovidutto della femmina (Nelson et al., 2016; Ebert et al., 2013).

Altre caratteristiche che aiutano all'identificazione dei rappresentanti di questa classe sono le seguenti di cui molte sono peculiarità scheletriche. Nelle specie viventi il cranio manca di suture (tipiche ad esempio dei mammiferi); la mascella superiore è formata dal palatoquadrato e quella inferiore dalla cartilagine di Meckel. La concentrazione plasmatica di urea e di ossido di trimetilammina (TMAO) è molto alta nei rappresentanti viventi di questa classe. A differenza dei pesci ossei non possiedono vescica natatoria il galleggiamento è deputato al fegato, diviso in due lobi, particolarmente ricco di squalene (un triterpene meno denso dell'acqua). Lo sviluppo dell'embrione può avvenire all'interno di teche ovariche (oviparità) o direttamente nel grembo materno (viviparità). Le modalità di nutrimento degli embrioni sono varie e prevedono: nutrimento da sacco vitellino, nutrimento da parte di uova non fecondate o da placenta. (Nelson et al., 2016).

Gli Scyliorhinidæ

Entrambe le specie utilizzate per questo studio appartengono alla medesima famiglia. Gli Scyliorhinidiæ hanno la peculiarità di essere la famiglia di squali più numerosa al mondo con 17 generi e circa 150 specie (Nelson et al., 2016), ma nuovi rappresentanti del taxon, soprattutto di abitudini meso e batipelagiche vengono descritti in maniera piuttosto frequente (Ebert et al., 2013).

Gli Scyliorhinidiæ fanno parte dell'ordine dei Carcharhiniformes che deriva dal supergruppo dei Galeomorphii. I fossili più antichi mai ritrovati risalgono al Giurassico

Medio (ca 160-175 m.a.f.) (Capetta, 2012). Le analisi genetiche, condotte da Human et al. (2006) e Naylor et al. (2012) sul mtDNA, hanno evidenziato una relazione parafiletica e non monofiletica con le altre famiglie appartenenti all'ordine. Compagno (1988) ha persino suggerito una separazione netta all'interno della famiglia, appoggiandone la creazione di una ulteriore, i Pentachidæ (fra cui sarebbe figurato anche il genere *Galeus*), ma ad oggi questa revisione risulta ancora oggetto di discussione (Iglesias et al, 2005).

Condividono alcune caratteristiche morfologiche peculiari dell'ordine di appartenenza. Possiedono due piccole pinne dorsali senza spine (ad eccezione di *Pentachus profundicolus* (Smith e Radcliffe, 1912), unico squalo a cinque fessure branchiali con una sola pinna dorsale (Ebert et al., 2013)) e la pinna anale. La famiglia si contraddistingue per aver la prima dorsale più arretrata rispetto all'attaccatura della pinna pelvica. Tutti possiedono cinque aperture branchiali di cui, in un ordine da una a tre, si trovano in posizione più arretrata rispetto alla radice della pinna pettorale; non possiedono branchiospine. L'apertura orale si estende oltre gli occhi che possiedono una pupilla tipicamente somigliante a quella dei gatti. A differenza degli altri Carcharhiniformes possiedono uno spiracolo e una rudimentale membrana nittitante. La loro valvola intestinale è di tipo a spirale. In generale gli Scyliorhinidiæ condividono una silhouette allungata e snella, e dimensioni che non superano 1.6 m TL (in *Scyliorhinus stellaris* (Linnæus, 1758)) (Compagno, 1988; Nelson et al., 2016; Ebert et al., 2013) (Fig.1.2).

Se non con poche eccezioni la loro biologia non è molto conosciuta (soprattutto per quanto riguarda le specie profonde). La maggior parte è ovipara con due distinte modalità di ovodeposizione:

- le specie più basali depongono varie paia di grandi uova (una per ovidutto) protette da una robusta struttura cornea che si schiudono una volta all'anno;
- le specie più derivate invece trattengono le uova fino a che il piccolo squalo non si è quasi del tutto sviluppato e ne depongono un gran numero a circa un mese dalla schiusa.

Poche specie invece sono vivipare e generano piccoli vivi (Ebert et al., 2013).

Famiglia tipicamente cosmopolita ed esclusivamente marina, se ne ritrovano rappresentanti in tutti gli oceani del mondo dalle fasce temperate a quelle tropicali.

Vivono sia sulla scarpata che sulla piattaforma di continenti e isole, ma non compiono grandi migrazioni, in quanto non sono dei buoni nuotatori. Di abitudini più tipicamente notturne si nutrono di piccoli pesci ed invertebrati come crostacei e molluschi (Nelson et al., 2016; Ebert et al., 2013).

Non sono squali pericolosi per l'uomo e alcune specie hanno bassa importanza nell'industria della pesca; come per le specie trattate in questo studio è frequente la loro presenza nei bycatch dello strascico. Per le loro ridotte dimensioni sono particolarmente apprezzati dagli acquariofili.

Le specie dello studio

Scyliorhinus canicula (Linnæus, 1758) (Fig.1.3) è uno squalo appartenente alla famiglia degli Scyliorhinidæ. Conosciuto con i nomi comuni di small-spotted catshark o lesser-spotted dogfish a causa della sua tipica mazzatura dorsale; in Italia è noto come gattuccio.

Morfologicamente si distingue nell'aver un corpo serpentiforme appiattito dorso-ventralmente e portante una colorazione chiara. È ricoperto di piccole macchie per la maggior parte di colore bruno (alcune possono essere bianche); sono presenti inoltre da sette a nove selle leggermente più scure. Possiede ampi flap nasali che in questa specie (a differenza dei congeneri) raggiungono la bocca. La seconda dorsale è molto più piccola della prima, caratteristica tipica della famiglia (Ebert et al., 2013).

È distribuito in tutto il Mar Mediterraneo, sulle coste atlantiche dell'Africa Nord-occidentale e nelle isole britanniche fino alle pendici meridionali della penisola scandinava. I giovanili stazionano più profondi degli adulti (fino a 400 m), che si trovano sulla piattaforma continentale fino in acque poco profonde. Squalo tipicamente demersale, si nutre di piccoli invertebrati bentonici e pesci.

Può raggiungere una taglia massima di 60 cm TL in Mediterraneo mentre raggiunge una taglia maggiore, fino a un metro, in Atlantico e nei Mare del Nord. La maturità viene raggiunta per taglie minori per i maschi (39 cm TL) e leggermente maggiori per le femmine (44 cm TL); i neonati hanno una taglia di circa una decina di centimetri.

Oviparo: la riproduzione avviene in primavera-estate e le teche ovariche, da 5 a 11 per covata, sono deposte su alghe coralline, briozoi e gorgonie, intorno a novembre. Differenze fra le popolazioni Atlantiche e Mediterranee sono tutt'ora materia di studio. (Ellis e Shackley, 1997; Ivory et al., 2005; Ebert et al., 2013)

Secondo alcuni studi è lo Scyliorhinidae più abbondante in Mediterraneo, ma questo primato è conteso con la specie successiva. (Sánchez et al., 2002; Costa et al. 2005)

Galeus melastomus (Rafinesque, 1810) (Fig.1.4) è uno squalo appartenente alla famiglia degli Scyliorhinidae. Conosciuto col nome comune di black-mouth catshark a causa della tipica colorazione nerastra del peritoneo; in Italia è noto come gattuccio boccanera.

Morfologicamente si distingue nell'aver un corpo serpentiforme appiattito dorso-ventralmente e portante una colorazione a pois scuri di varie misure dalla punta del muso alla punta della coda; le pinne pettorali, anali e pelviche hanno una bordatura bianca. Il lobo superiore della coda possiede dentelli dermici più sviluppati degli altri (Ebert et al., 2013).

È distribuito in tutto il Mar Mediterraneo, sulle coste atlantiche dell'Africa Nord-occidentale e nelle isole britanniche fino alle pendici meridionali della penisola scandinava. Di abitudini più profonde rispetto alla specie precedente, raggiunge anche i 1000 metri. La sua dieta è composta da cefalopodi, crostacei e pesci.

Entrambi i sessi raggiungono la maturità intorno ai 40 cm TL, ma vari studi dibattono ancora oggi sulle taglie esatte di maturità, anche in relazione alla possibile esistenza di più popolazioni. Oviparo: depone durante l'estate più di 13 uova per esemplare. (Rey et al., 2005; Costa et al., 2005; Ebert et al., 2013).

Entrambe le specie di questo studio sono state scelte anche per due fattori rilevanti: la IUCN Red List li classifica come "Least Concern"; sono, inoltre, spesso facenti parti del bycatch della pesca professionale, e quindi particolarmente più disponibili rispetto ad altre specie.

I sensi

I sensi associati alla vita di un animale sono il sistema con cui un individuo si interfaccia con l'ambiente. Questa comunicazione avviene mediante strutture particolari: i

recettori sensoriali. Questi ultimi possono essere terminazioni nervose libere (come nel caso dei termocettori), neuroni iperspecializzati (come i fotorecettori), o altri tipi cellulari specializzati (molti meccanorecettori). La loro funzione principale è recepire stimoli di varia natura e portare il segnale da questi generato al SNC dove si origina una risposta da parte dell'individuo. Una classificazione suddivide i recettori in esteroceettori, propriocettori e enteroceettori, a seconda che lo stimolo recepito riguardi l'ambiente, parti somatiche, o parti viscerali dell'individuo. I recettori vengono anche suddivisi a seconda della natura dello stimolo con cui vengono eccitati. Ad oggi si conoscono:

- Meccanocettori (stimoli di natura meccanica; pressione, udito, equilibrio, ...);
- Termocettori (stimoli di natura termica);
- Fotorecettori (stimoli di natura luminosa; visione di colori, luce polarizzata, radiazioni UV, variazione dell'intensità della luce, ...);
- Chemiocettori (stimoli di natura chimica; percezione di odoranti e discriminazione, contenuto energetico di alimenti, glomi, ...);
- Nocicettori (stimoli di natura dolorosa);
- Magnetocettori (stimoli di natura magnetica);
- Elettrocettori (stimoli di natura elettrica; variazione e captazione di campi elettrici, generazione di campi elettrici).

Qualsiasi natura abbia lo stimolo recepito, il meccanismo con cui l'informazione viene inviata ai centri di elaborazione maggiori (SNC o gangli) è molto simile fra i vari sensi. Il segnale causa l'apertura di determinati canali ionici che, variando la polarità della membrana plasmatica, o generano direttamente un potenziale elettrico (detto potenziale di recettore) o favoriscono l'esocitosi di determinati neurotrasmettitori. Se la cellula sensoriale è un neurone, può essere definita cellula sensoriale di primo tipo, se lo stimolo supera una determinata soglia, può dare direttamente origine ad un potenziale d'azione lungo l'assone e arrivare in tal modo al SNC. Invece una cellula sensoriale non neuronale, viene detta di secondo tipo, e non ha un proprio assone; la ricezione dello stimolo determina il rilascio di neurotrasmettitori da parte della cellula sensoriale. Sarà il legame di questi con i rispettivi recettori sulle fibre nervose afferenti a determinare il pda lungo gli assoni di cellule (o neuroni) pseudo unipolari gangliari. Il segnale elettrico generato viaggia secondo il seguente schema detto via afferente:

1. Cellula sensoriale specializzata (se presente) (SNP);
2. Neurone di primo ordine (che può essere a monte del recettore o essere esso stesso il recettore) (SNP);
3. Neurone di secondo ordine (in genere si trova nel midollo spinale o in una porzione dell'encefalo) (SNC);
4. Neurone di terzo ordine (in genere si trova nel talamo e sinapta direttamente con la corteccia telencefalica dove viene generata la risposta) (SNC).

Alle vie afferenti spesso corrispondono vie nervose efferenti atte a comunicare la risposta al SNP e ai sistemi dedicati. Certi stimoli, soprattutto di natura dolorosa, hanno una via di risposta particolare detta arco riflesso. Parte dell'informazione viene elaborata direttamente a livello dei gangli spinali, generando una risposta muscolare più rapida (Poli et al., 2018).

L'olfatto

Il senso dell'olfatto è uno dei sensi deputati alla chemorecezione in quanto è in grado di riconoscere, discriminare e determinare le abbondanze di molecole chimiche definite odoranti. Filogeneticamente antico, risalente persino alla chemiotassi batterica, è conservato in tutte le classi dei vertebrati (Manzini e Korsching, 2011). Anatomicamente, il percorso olfattivo periferico conta di tre macro-zone; l'epitelio olfattivo (OE), il nervo olfattivo (ON), il bulbo olfattivo (OB) e il tratto olfattivo (OT) Nei pesci cartilaginei questo senso è associato alla ricerca del cibo, alle migrazioni e alla riproduzione (Fig.1.5).

Epitelio Olfattivo

L'epitelio olfattivo, che si trova allocato nella cavità nasale, ha una struttura istologica conservata nei vertebrati si tratta di un epitelio pluristratificato in cui si possono riconoscere tre zone. Uno strato apicale dove ritroviamo i nuclei delle cellule di sostegno e le terminazioni dendritiche dei neuroni olfattivi (ONS), uno strato intermedio in cui ritroviamo i corpi cellulari degli ONS e, infine, uno strato basale dove ritroviamo le cellule basali, le quali proliferando e sono precursori degli ONS e degli altri tipi cellulari. Gli ONS, neuroni bipolari del primo ordine, possono presentare, come specializzazione dendritica atta a recepire gli stimoli chimici, ciglia oppure microvilli (Elsaesser e Paysan, 2007;

Schwob et al., 2017). Nei mammiferi sono presenti sia ONS ciliati che con microvilli, mentre nei condritti solamente ONS con microvilli (Theisen et al., 1986; Takami et al., 1994). È stata inoltre scoperta una terza categoria di ONS presente solo negli ittiopsidi: le cellule cripta, che presentano sia ciglia che microvilli (Hansen e Finger, 2000; Ferrando et al., 2006a). Le terminazioni sensoriali si trovano immerse in uno strato di muco che, oltre a facilitare l'interazione degli odoranti con i recettori, ha anche funzione protettiva e antibatterica; prodotto da ghiandole mucose, che possono pluricellulari (es ghiandole di Bowman) o singole cellule mucipare, sparse nell'epitelio. Nei pesci cartilaginei troviamo cellule particolari dette ionociti, che sembrano regolare la composizione ionica del muco (Ferrando et al., 2006b; Ferrando, 2008). Inoltre, gli ONS, a contatto diretto con l'ambiente esterno, sono sottoposti ad un tasso di turnover molto elevato rispetto ad altre cellule neuronali; nel topo si è osservato un ricambio che va dalle quattro settimane ai dodici mesi (Graziadei e Graziadei, 1979; Mackay-Sim e Kittel, 1991; Zielinski e Hara, 2007; Ferrando et al., 2010)(Fig. 1.6).

Nei Chondrichthyes l'organo olfattivo periferico è un organo pari detto rosetta olfattiva (OR) situato nella cavità nasale e separato dal resto del cranio da una porzione di cartilagine detta capsula olfattiva; è collegata all'esterno mediante una narice a singola apertura, divisa parzialmente da un flap. In alcune specie la narice è collegata direttamente all'apertura orale per favorire la circolazione dell'acqua all'interno della cavità nasale (Theisen et al., 1986; Schluessel et al., 2008; Abel et al., 2010; Timm e Fish, 2012). L'epitelio olfattivo si trova su una serie di lamelle primarie, il cui numero varia da specie a specie. Le lamelle, dotate di setti di tessuto connettivo (lamina propria), sono collegate ad un sostegno centrale chiamato rafe. La forma di quest'ultimo, che può essere circolare o allungata (come nel caso di *S. canicula* e *G. melastomus*) conferisce una forma definita all'intero organo (Theisen et al., 1986; Schluessel et al., 2008; Ferrando et al., 2016; Ferrando et al., 2017). La superficie totale dell'OE è incrementata, come accade per i turbinati nei mammiferi, da una serie di lamelle secondarie che si diramano da quelle primarie. Anche il numero e l'estensione delle lamelle secondarie, così come l'area della superficie epiteliale, varia notevolmente da specie a specie. Nei pesci cartilaginei le differenze nella forma della rosetta e la superficie dell'OE sono state correlate alle abitudini e all'habitat delle specie. (Theiss et al., 2009; Meredith e Kajiura, 2010; Meredith et al., 2012; Ferrando et al., 2019a).

Lamina propria

Alla base dell'OE ritroviamo la lamina propria (LP) dove si raccordano gli assoni degli ONS i quali formano il nervo olfattivo o il nervo cranico. E vanno a sinaptare direttamente con interneuroni nei glomeruli dell'OB. Inoltre, in questa zona ritroviamo i vasi sanguigni e, quando presenti, le ghiandole di Bowman, che producono il muco in cui sono immerse le terminazioni sensoriali degli ONS. Nei pesci ossei e cartilaginei è il sostegno delle lamelle primarie e secondarie.

Bulbo Olfattivo

L'OB è la zona encefalica dove lo stimolo olfattivo viene elaborato e inviato ai centri nervosi superiori situati nel talamo. Facente parte del telencefalo, in certi gruppi di vertebrati, come i selaci, è un organo particolarmente sviluppato. L'OB è suddiviso in quattro strati principali:

- Strato nervoso;
- Strato glomerulare;
- Strato delle cellule mitrali;
- Strato granulare.

Lo strato nervoso è formato dalle fibre nervose degli assoni degli ONS che al limite dell'OB decussano per raggiungere i corrispondenti glomeruli. Lo strato glomerulare contiene strutture globulari (Glom) delimitate da tipi cellulari chiamate cellule periglomerulari (PC) e altre cellule. Sono formate dalle terminazioni assoniche degli ONS e le terminazioni dendritiche delle cellule mitrali (MC). Nei mammiferi i dendriti di una singola cellula mitrale raggiungono un singolo glomerulo, mentre nei pesci anche più di uno. Ogni glomerulo è raggiunto solamente da quelle terminazioni nervose appartenenti ad un solo tipo di ONS (per recettore olfattivo espresso). Questa divisione funzionale genera quindi una suddivisione in zone chiamata mappa olfattiva. Lo strato delle cellule mitrali è composto da pochi grandi interneuroni che con le loro terminazioni assoniche, proiettate verso l'interno del telencefalo, formano il tratto olfattivo. Infine, ritroviamo lo strato delle cellule granulari (GC), cellule neuronali che creano connessioni fra le fibre delle cellule mitrali, con la probabile funzione di regolarne la funzione. Oltre a questi tipi cellulari principali, ritroviamo anche altri tipi di cellule: altri neuroni e cellule della glia, come gli astrociti (Fig.1.7).

In alcuni mammiferi e nei rettili ritroviamo un organo chiamato organo vomeronasale o organo di Jacobson. Tale organo ha la funzione di recepire informazioni legate alla comunicazione intraspecifica mediante feromoni. Gli ONS di quest'organo sinaptano ai glomeruli di una porzione dell'OB chiamata bulbo olfattivo accessorio. Nei pesci sia cartilaginei che ossei la sua presenza è ancora oggetto di discussione (Sterzi, 1909; Dryer e Graziadei, 1993; Zielinski e Hara, 2007; Ferrando e Gallus, 2013).

Recettori olfattivi e trasduzione del segnale

Gli ONS esprimono, in ragione di un solo tipo di recettore per ogni neurone, quattro principali famiglie di recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche (GPCR): OR, TAAR, V1R e V2R. Mentre le prime due vengono generalmente espresse nell'epitelio olfattivo principale le altre due famiglie vengono espresse di solito nell'organo vomeronasale. La numerosità delle quattro famiglie citate varia da specie a specie: nell'uomo, gli OR sono circa 300, nel topo superano il migliaio (Monbaerts, 2004). Anche nei pesci ossei il numero è spesso di varie decine o più spesso, centinaia (Niimura, 2009). Curiosamente negli squali, sono presenti in numero molto ridotto (Sharma et al., 2019), ad esempio in *Charcharodon charcharias* (Linnæus, 1758) sono solamente tre (Marra et al., 2019). Al contrario negli elasmobranchi sono presenti numerosi geni dei recettori V2R (Sharma et al., 2019; Marra et al., 2019) così come negli Olocefali (Venkatesh et al., 2017). Ciò ha portato a credere che l'evoluzione, per ragioni ancora sconosciute, abbia portato i pesci cartilaginei a sviluppare un organo olfattivo molto più simile, per composizione in ONS, all'organo vomeronasale dei vertebrati superiori. Tuttora ciò è ancora oggetto di discussioni. (Ferrando e Gallus, 2013; Marra et al., 2019).

Scopo del lavoro

Scopo di questo lavoro è analizzare il bulbo olfattivo di due diverse specie di Galeomorphii, *S. canicula* e *G. melastomus*, al fine di rilevare similitudini e differenze fra i due animali.

Il presente studio prende le sue radici nelle considerazioni di McGann (2017), dove l'autore mette in discussione le dimensioni del bulbo olfattivo, sia relative che assolute, come indicatore di una buona capacità olfattiva. Le sue conclusioni trovano sostegno nel fatto che, vertebrati considerati microsmatici, come i primati, non mostrino differenze significative nel numero di neuroni dell'OB rispetto a altri mammiferi che si ritiene abbiano un olfatto ben sviluppato. Di contro queste considerazioni non sono mai state applicate su nessun rappresentante dei pesci cartilaginei, dove, ipotesi sulle loro capacità olfattive si sono, ad oggi basate solamente sulle dimensioni del bulbo (Yopak et al., 2015).

Per fare ciò sarà utilizzata una tecnica relativamente recente: il frazionamento isotropico (Herculano-Houzel & Lent, 2005). Tale tecnica permette di valutare direttamente sia il numero di cellule totali dell'organo preso in considerazione sia la percentuale di neuroni associata, grazie all'utilizzo di un anticorpo specifico. Le cellule mitrali sono gli unici neuroni che non vengono marcati dalla tecnica, ma, visto la loro bassa numerosità, non abbassano in maniera significativa la percentuale neuronale. In letteratura il frazionamento isotropico è già stato utilizzato con successo per varie regioni encefaliche in diverse specie di mammiferi, uccelli e su una specie di coccodrillo (Fu et al., 2013; Seelke et al., 2013; Seelke et al., 2014; Ribeiro et al., 2014; Herculano-Houzel et al., 2014a; Herculano-Houzel et al., 2014b; Herculano-Houzel, 2014c; Olkowicz et al., 2015; Negwenya et al., 2016). La tecnica risente di alcuni bias metodologici legati ad alcune variabili: la difficoltà di prelevare in maniera esatta alcune regioni encefaliche (fra cui figura anche il bulbo olfattivo) soprattutto in esemplari di taglia ridotta e le differenze di valutazione durante la conta delle cellule e della percentuale di neuroni fra diversi lettori (Ribeiro et al., 2014; Neves et al., 2019). Queste problematiche non inficiano in maniera significativa la tecnica che resta estremamente efficace in questo tipo di studi. L'innovazione data dal presente studio è l'applicazione del frazionamento isotropico a

bulbi olfattivi appartenenti a pesci cartilaginei. I risultati saranno organizzati nell'ordine di quelle variabili confrontabili con quelle già presenti in letteratura. Sarà inoltre introdotto un descrittore totalmente nuovo: la densità di neuroni di OB su unità di superficie di OE (N/mm^2). La scelta di questa variabile si basa sul fatto che un sistema sensoriale, in particolare il sistema olfattivo (che, come visto in precedenza, conta di rosetta olfattiva e bulbo), non debba essere considerato solo nelle sue parti, ma anche nella sua interezza. In questo modo, si potrà anche valorizzare la variabile relativa all'epitelio olfattivo, la cui superficie risulta essere molto variabile fra specie (Ferrando et al., 2019a). I risultati saranno confrontati fra loro e con i dati relativi ad altri animali già presenti in letteratura. In conclusione, le differenze, se presenti, saranno considerate sia dal punto di vista filogenetico sia da quello ecologico.

Grazie al presente lavoro ci proponiamo quindi di valutare quali siano i descrittori inerenti al bulbo più indicativi di una buona capacità olfattiva nelle nostre specie e di ipotizzare a quali cause siano più o meno rilevanti nelle differenze osservate.

Materiali & Metodi

Campionamento e fissazione

La totalità dei campioni proviene dal by-catch delle attività di pesca della regione Liguria. Nel particolare gli squali sono stati prelevati da due pescate singole nel Golfo di Savona e nel Golfo del Tigullio rispettivamente nei mesi di febbraio e maggio del 2018. Premurandosi della maggior freschezza possibile dei pesci, si è proceduto allo stoccaggio e alla fissazione secondo il seguente protocollo:

1. Raccolta dei dati morfologici relativi all'animale (vedi Tab. 2.1 e 2.2);
2. Prelievo dell'animale nella sua interezza o della testa (Fig. 2.1) a seconda delle sue dimensioni;
3. Fissazione overnight in PAF 4% (paraformaldeide + tampone fosfato [PBS]);
4. Due/tre lavaggi in PBS per sei ore;
5. Stoccaggio in etanolo 70% a temperatura ambiente.

Prelievo dei campioni anatomici

Una volta completato il processo di fissazione sono stati prelevati da ogni singolo campione una OR e un OB. Lo schema di dissezione risulta comune ad entrambe le specie (Fig. 2.2). I campioni così ottenuti, nell'impossibilità di essere lavorati sul momento, sono stati reimmessi in alcool 70% e conservati sempre a temperatura ambiente.

Analisi delle rosette olfattive

Da alcuni campioni di OR sono stati ricavati i dati relativi all'estensione dell'OE secondo i seguenti protocolli.

Anatomia macroscopica

1. Contare, mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio (Leica MS 5), il numero totale delle lamelle primarie;
2. Prendere la misura del rafe centrale, della lunghezza e della larghezza dell'OR.

3. Tagliare l'OR al centro nel senso della larghezza al fine di determinare l'area delle lamelle primarie;
4. Eseguire lo stesso procedimento alla periferia dell'OR per le lamelle più piccole, acquisire fotografie in entrambi i casi (Fig. 2.3).

Anatomia microscopica

1. Includere in paraffina le OR utilizzate sopra secondo il seguente protocollo:
 - 2h etanolo 80%;
 - 2h etanolo 90%;
 - 8h etanolo 95%;
 - 1h etanolo 100% (I);
 - 1h etanolo 100% (II);
 - 1h etanolo 100% (III);
 - 15 min etanolo/Bioclear (50:50);
 - 2 min Bioclear (I);
 - 2 min Bioclear (II);
 - 2 min Bioclear (III);
 - 15 min Bioclear/paraffina (50:50; in stufa);
 - 1h paraffina (I);
 - 1h paraffina (II);
 - 1h paraffina (III);
2. Inserire il campione così trattato in vaschette di acciaio, tenute in un bagnetto ad acqua riscaldato a 60°C, posizzarli nella maniera desiderata e ricoprire di paraffina liquida;
3. Lasciar impregnare ed asciugare il campione almeno per 24h a T_{amb};
4. Posizionare su un blocchetto di legno e montare su microtomo (Reichert-Jung 2065 Supercut);
5. Preparare vetrini ogni 100 µm di tessuto contenenti ognuno all'incirca 5-6 sezioni;
6. Numerare i vetrini e lasciar asciugare per almeno 24h;
7. Colorare le sezioni con Ematossilina-Eosina secondo il seguente protocollo:

- Sparaffinatura:
 - 1) 15 min Bioclear (I);
 - 2) 15 min Bioclear (II);
- Reidratazione (o discesa alcolica):
 - 1) 1 min etanolo 100% (I);
 - 2) 1 min etanolo 100% (II);
 - 3) 1 min etanolo 95%;
 - 4) 1 min etanolo 90%;
 - 5) 1 min etanolo 80%;
 - 6) H₂O_{dist.}
- Colorazione:
 - 1) Ricoprire completamente le sezioni per 2 min con Ematossilina;
 - 2) Sciacquare per 10 min con H₂O del rubinetto;
 - 3) Lavare per 5 min con H₂O_{dist.};
 - 4) Aggiungere una goccia di HCl per 1 min;
 - 5) Ricoprire completamente le sezioni per 2 min con Eosina;
 - 6) Eseguire 2-3 lavaggi con H₂O_{dist.} per 5 min;
- Disidratazione (o salita alcolica):
 - 1) 30 s etanolo 80%;
 - 2) 30 s etanolo 90%;
 - 3) 30 s etanolo 95%;
 - 4) 30 s etanolo 100% (I);
 - 5) 30 s etanolo 100% (II).
- Chiusura vetrini:
 - 1) 1 min Bioclear (I);
 - 2) 1 min Bioclear (II);
 - 3) Posizionare una goccia di Eukitt sul vetrino e adagiare, in maniera da non creare bolle, un coprioggetto;
 - 4) Lasciar asciugare in stufa almeno 24h.

8. Osservare le sezioni al microscopio Leica DMRB e acquisire fotografie di lamelle primarie dove, indicativamente, il piano di taglio sia per lo più centrale.

Analisi dei bulbi olfattivi

Da ogni OB per esemplare sono stati ricavati sia il peso, il numero totale di cellule e la percentuale di neuroni secondo il protocollo di frammentazione isotropica tratto da Herculano-Heuzel e Lent (2005):

Pesata OB

1. Scolare l'OB mediante una schiumarolina in acciaio INOX per 20 s (al fine di eliminare passivamente una minima quantità di alcool che su quantità di tessuto così esigue potrebbe influire sulla pesata);
2. Pesare l'OB su bilancia METTLER PM 100 e ricavarne il peso in milligrammi.

Conta cellule

1. Trasferire l'OB in una provetta di vetro abbinata ad un potter in acciaio;
2. Unire una soluzione di sodio citrato e Triton (10 mL H₂O_{dist} + 103 mg NaCit + 100µL Triton) in proporzione <<1000 mL di soluzione: 100 mg di tessuto>>;
3. Potterizzare l'OB per 15 minuti al fine di lisare le membrane cellulari.
4. Trasferire la soluzione risultante in un criotubo da 4.5 mL sciacquando il potter con aliquote della soluzione di NaCit e Triton;
5. Centrifugare per 45 minuti a 6000 U/min in centrifuga Ittich Universal;
6. Prelevare un'aliquota di sopranatante e porre su un vetrino con una goccia di DAPI, colorante nucleare (diluizione 1:10000) e osservare al microscopio Leica DMRB ad epifluorescenza;

- a. Se, osservando più campi a 40X, abbiamo almeno un nucleo per campo, ricentrifugare per altri 15 minuti e ripetere il procedimento al punto 6;
 - b. Se per campo i nuclei sono <1 procedere col punto 7.
7. Prelevare tutto il sopranatante e risospendere il pellet in 500 μ L (o multipli a seconda della quantità di pellet presente) di PBS;
 8. Aggiungere alla soluzione una quantità di DAPI in proporzione << 1:100>>;
 9. Prelevare un'aliquota della soluzione e inserire in camera di Burker (BRAND, 0,100 mm);
 10. Porre la camera al microscopio LEICA DMRB e, mediante fotocamera Leica CCD DFC420C, settando una via di mezzo fra luce trasmessa e fluorescenza, acquisire le fotografie per la conta nucleare (Fig.2.5) acquisire tre repliche per campione.*i*

Percentuale dei neuroni

1. Prelevare 50 μ L della soluzione iniziale e diluire con altri 50 μ L di PBS all'interno di una eppendorf da 1 mL;
2. Unire 1 μ L di anticorpo primario NeuN (Ms X Neuronal Nuclei, MAB377, lotto 2919676, 1mg/mL) overnight;
3. Centrifugare (mediante centrifuga Biofuge pico Heraeus), prelevare il sopranatante e risospendere in 100 μ L di PBS (fare attenzione poiché la quantità di pellet può essere molto esigua);
4. Aggiungere l'anticorpo secondario goat anti-mouse IgG (Immunoreagents, Inc, 488 coniugato, GtxMu-003-D488NHSX, lotto 61-69-031618) e lasciar agire per 90 min;
5. Centrifugare, prelevare il sopranatante e risospendere in 100 μ L di PBS;
6. Prelevare un'aliquota (ca 30 μ L), porre su un vetrino e spandere bene grazie ad un coprioggetto;
7. Osservare al microscopio Leica DMRB ad epifluorescenza a 40X;

8. Prelevare fotografie doppie di campi casuali, una con luce UV (per il DAPI) e una a luce blu (per il NeuN); fare almeno 60 foto (30 campi), se necessario prelevare altre aliquote di soluzione.

Analisi d'immagine delle rosette olfattive

Al fine di acquisire i dati quantitativi relativi alla superficie totale data dalle lamelle primarie e all'incremento dato dalle lamelle secondarie, anche in questo caso, si è utilizzato il software ImageJ (Fig. 2.3 e 2.4)

Analisi d'immagine dei bulbi olfattivi

Al fine di acquisire i dati quantitativi relativi sia al numero di cellule totali presenti nel bulbo olfattivo che alla percentuale di neuroni si è utilizzato il software ImageJ. (Fig. 2.5 e 2.6)

Analisi statistiche

Tutte le analisi di carattere statistico, il coefficiente di correlazione di Spearman, il test U di Mann-Whitney, l'analisi delle componenti principali (PCA), le tabelle e i grafici del presente lavoro sono stati elaborati mediante i software Microsoft Excel e R.

Correlazioni fra variabili

Per entrambe le specie si è voluto osservare le correlazioni fra alcune variabili. Per verificarne la significatività si è accoppiato al grafico il **coefficiente di correlazione di Spearman (r_s)**.

Test non parametrico di Mann-Whitney

Per confrontare le due specie fra di loro al fine di verificare se le differenze riscontrate non siano dovute al caso si è utilizzato il **test U di Mann-Whitney**. Preferibile in questo caso al t-test in quanto i dati non hanno una definita distribuzione normale. Sono stati accoppiati a questa analisi anche i relativi box-plot.

Tabelle riassuntive

Per confrontare in maniera più efficace e rapida le due specie fra loro e con dati già presenti in letteratura, è stata generata una tabella contenente le medie, i massimi e i minimi, e l'incremento totale (calcolato nel range dei nostri campioni) relativi a tutte le nove variabili prese in esame (Tab. 3.5 e 3.6).

Risultati

I campioni sono stati prelevati e catalogati. La determinazione della specie è avvenuta mediante l'utilizzo delle chiavi dicotomiche e degli schemi del *Shark of the world* di Ebert et al. (2013). Per ogni esemplare sono state misurate e/o calcolate le seguenti nove variabili (Tab. 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4).

- Lunghezza totale: TL;
- Peso dell'OB: OBW;
- Numero totale di cellule nell'OB: CTot;
- Percentuale di neuroni nell'OB: Nperc;
- Numero totale di neuroni nell'OB: NTot;
- Numero totale di cellule non neuronali nell'OB: Ocells;
- Rapporto fra Ntot e OBW: N/mg;
- Rapporto fra Ocells e Ntot: O/N;
- Rapporto fra Ntot e superficie calcolata dell'epitelio olfattivo (OES): N/mm^2 .

Le TL raccolte indicano che, per entrambe le specie, i nostri campioni vanno da giovanili a adolescenti, circa tra 1 e 5 anni di età; nel presente studio non è stata presa in considerazione la variabile genere per non avere un numero troppo basso di osservazioni. L'OBW è fortemente correlato alla TL dell'animale e si evincono differenze tra le due specie dovute al diverso tasso di crescita corporea (Ivory et al., 2005; Baptista et al., 2010) e al diverso tasso di crescita del peso del bulbo (Tab 3.5 e 3.6, Graph. 3.1 e 3.10).

Calcolo del numero totale di cellule, di neuroni e di cellule non neuronali nel bulbo olfattivo

Per ottenere il numero totale di cellule presenti nel bulbo olfattivo si ricorre alla seguente formula (Herculano-Houzel e Lent, 2005): $AVGcells * 10000 * OBdilution$ (Tab.3.1 e 3.2). Dove ritroviamo in ordine: il numero di cellule medie calcolato grazie alla camera di Burker (Fig. 2.5); il fattore associato alla quantità di soluzione presente fra

uno dei quadrati della camera e il coprioggetto; la diluizione applicata al bulbo potterizzato e centrifugato (vedere M&M).

Il numero totale di cellule è fortemente correlato in entrambe le specie con l'OBW (Graf 3.2 e 3.11) e non risultano differenze significative, se non nell'incremento nel range di taglia considerato, come già evidenziato per l'OBW (Tab. 3.5 e 3.6).

Per ottenere il numero totale di cellule neuronali nel bulbo olfattivo si ricorre alla seguente formula (Herculano-Houzel e Lent, 2005): $CTot * Nperc$ (Tab.3.1 e 3.2). La percentuale di neuroni si ricava grazie alla tecnica di immunohistochimica vista nei M&M (Fig. 2.6).

Il totale delle cellule non neuronali si ottiene come risultato della differenza fra il numero di cellule totali e i neuroni totali: $Ctot - NTot = Ocells$ (Tab.3.1 e 3.2).

La percentuale di neuroni è costante durante la crescita del bulbo olfattivo per entrambe le specie ed è la stessa per entrambe. Infatti, la crescita del numero di CTot, Ntot e di Ocell è fortemente correlata con OBW e non ci sono differenze tra le specie se non, come visto nelle variabili precedenti, nell'incremento nel range di taglia (Tab 3.5 e 3.6).

Calcolo della superficie delle rosette olfattive con il metodo di interpolazione

Non avendo la disponibilità di tutte le rosette olfattive di ogni campione e per standardizzare la superficie totale dell'epitelio olfattivo si è ottenuto questo dato per interpolazione. Dopo aver ottenuto la superficie di un numero adeguato di campioni (Fig.2.3 e 2.4), correlata con la lunghezza degli animali si è calcolato la superficie (OES) grazie all'equazione della retta di regressione relativa (Graf. 3.8 e Tab. 3.3 e 3.4).

Calcolo del rapporto fra numero totale neuroni nel bulbo olfattivo e peso del bulbo olfattivo, fra cellule non neuronali e neuroni e fra numero totale di neuroni e superficie calcolata dell'epitelio olfattivo.

Per ottenere il rapporto fra neuroni e peso dell'OB si ricorre alla seguente formula:

$$\frac{NTot}{OBW} = N/mg \text{ (Tab. 3.1 e 3.2).}$$

Tale rapporto non varia al variare della taglia per nessuna delle due specie, né si riscontrano differenze significative tra le due (Graph. 3.6 e 3.15).

Per ottenere il rapporto fra non neuroni e neuroni nell'OB si ricorre alla seguente

formula: $\frac{Ocells}{NTot} = O/N$ (Tab. 3.1 e 3.2). Tale rapporto rimane costante (come già detto

per la percentuale di neuroni osservata) (Graph. 3.7 e 3.16).

Per ottenere il rapporto fra neuroni nell'OB e superficie calcolata dell'OE si ricorre alla

seguente formula $\frac{NTot}{OES} = N/mm^2$ (Tab. 3.1 e 3.2). Tale rapporto varia al variare della

taglia dell'animale. Nei giovanili *S. canicula* ha valori più alti rispetto a *G. melastomus*.

Invece si osserva l'opposto superati i 30 cm TL pur tenendo conto del basso numero di osservazioni oltre questa misura (Graph. 3.9). Infatti, la media di N/mm^2 di epitelio sensoriale è maggiore in *S. canicula* che in *G. melastomus* (Tab. 3.5 e 3.6).

Discussioni & Conclusioni

Come si evince dai dati raccolti la tecnica del frazionamento isotropico risulta applicata con successo ad entrambe le specie prese in esame. Come rilevato da Neves et al. (2019) non manca di un certo bias metodologico che si riflette su valori di errore standard (SE) anche abbastanza rilevanti, dovuti soprattutto al fatto che, ad esempio *G. melastomus*, contasse esemplari con un bulbo olfattivo molto piccolo. La tecnica rimane comunque estremamente efficace e relativamente rapida, e potrebbe essere utilizzata in futuro anche su diverse parti dell'encefalo di altri pesci cartilaginei. Ad oggi il presente studio risulta non solo essere il primo ad aver utilizzato il frazionamento isotropico con successo sui pesci cartilaginei, ma sugli anamni tutti. Un tentativo precedente è stato effettuato sul Nototheniidæ *Dissostichus mawsoni* (Norman, 1937), dove tuttavia si è valutato solo il numero totale di cellule e non la percentuale neuronale (Ferrando et al., 2019b).

La TL degli animali rivela che l'età delle due specie è per entrambi compresa fra il primo e il quinto anno di età. Inoltre, è evidente che *G. melastomus*, a parità di età ha una taglia minore rispetto a *S. canicula*, il quale, nel range da noi campionato, è prossimo alla maturità. Di contro *G. melastomus* non è ancora a plateau (anche se non si osserva in letteratura un rallentamento netto del tasso di crescita a maturità raggiunta) (Ellis et al., 1997; Ivory et al., 2005; Costa et al., 2005; Baptista et al., 2010; Ebert et al., 2013). Le differenze osservate nell'OBW, che correla positivamente in maniera netta con la TL per entrambi, sono spiegate da un parallelo aumento del numero totale di cellule al suo interno (Graph. 3.1 e 3.2). Questo porta a concludere che per entrambi l'aumento dell'OBW avvenga per iperplasia piuttosto che per ipertrofia cellulare perlomeno fino al raggiungimento della maturità per cui non abbiamo dati. Come osservato da Ngwenya et al. (2016) questo processo di citogenesi accoppiato ad un incremento della massa della struttura presa in esame avviene, oltre che in altre strutture encefaliche, anche nell'OB del *Crocodylus niloticus* (Laurenti, 1768) e in quello di svariati cladi di mammiferi (Herculano-Houzel et al., 2014c).

È evidente, sia nel presente lavoro, che negli studi precedentemente citati, come la massa del bulbo olfattivo risenta intraspecificamente di un fattore ontogenetico

significativo. Si osserva difatti che in *G. melastomus* l'aumento dell'OBW nei primi 5 anni di vita è di circa 24 volte (da 3 a 70 mg), di contro in *S. canicula* il tasso di crescita è di circa un quarto (da 20 a 99 mg); ciò può spiegare le differenze fra specie osservate. In animali come i pesci cartilaginei e i loricati che hanno un tasso di crescita che non si arresta con il raggiungimento della maturità, è plausibile pensare che anche l'OBW continui ad aumentare (anche se magari in maniera più lenta). Ciò può rendere difficoltoso trovare un valore medio significativo per la specie presa in esame a meno di non aver a disposizione un numero di campioni tale da coprire tutta la curva di crescita. Lo stesso discorso vale per i mammiferi durante lo sviluppo. E ancora, è una variabile che da sola, risente interspecificamente anche della taglia di specie molto diverse fra loro. In Herculano-Houzel et al. (2014b) e Ribeiro et al. (2014) *Loxodonta africana* (Blumenbach, 1797) e *Elephantulus myurus* (Thomas e Schwann, 1906) hanno valori di OBW estremamente differenti (41000 mg contro 50 mg rispettivamente). Per ovviare a queste problematiche si potrebbe ricorrere alle dimensioni relative come fatto da Yopak et al. (2015) per i pesci cartilaginei; tale descrittore però è stato messo in discussione da McGann (2017), seppur per i mammiferi, a causa dei diversi tassi di crescita del resto dell'encefalo in specie diverse.

Come osservato da McGann (2017) nei mammiferi, il numero assoluto di neuroni, fra le nostre specie non mostra una differenza significativa, rimanendo nell'ordine di 10^5 neuroni (probabilmente, visto i massimi (Tab. 3.5 e 3.6), si assesterebbe su l'ordine dei milioni negli esemplari adulti). Non notiamo sostanziali differenze neppure con animali appartenenti a taxa diversi (Tab. 4.1): la variazione osservata fra gruppi non è realmente in grado di spiegare le differenze comportamentali legate all'olfatto. Più indicativo può essere il rapporto N/mg, seppur risentendo della variabile OBW (in *L. africana*) o della percentuale di cellule gliali (sempre in *L. africana* che in *C. niloticus*). Sulle differenze di questo parametro si possono fare alcune ipotesi. Nelle nostre specie osserviamo un aumento di neuroni costante e una stabilità del rapporto N/mg. Ciò può portare a pensare che, nel range di età considerato, non vi sia un aumento di connessioni cellulari fra neuroni a discapito della neurogenesi. Un'ipotesi in accordo con Herculano-Houzel (2014a). Vi è anche un'ulteriore considerazione di carattere evolutivo da fare: un rapporto N/mg basso sembra appartenere a quelle specie più antiche dal punto di vista filogenetico in accoppiata con masse corporee molto maggiori rispetto alla massa del

bulbo olfattivo (difatti questo discorso vale per le nostre specie, *C. niloticus* e *L. Africana* e *Hydrochoerus hydrochaeri* (Linnæus, 1766) (Graph. 4.1).

Come detto precedentemente vi è una correlazione fra numero totale di cellule e OBW che, nelle specie prese in esame, decorre in maniera simile. Ciò accade in maniera pressoché identica per il numero assoluto di neuroni e per le cellule non neuronali. Ciò è evidenziato dal fatto che sia la percentuale di neuroni sia il rapporto O/N rimane pressoché stabile nei due animali senza risentire della variabile ontogenetica, come si evince in letteratura. Ciò può portare a svariate considerazioni. Il rapporto O/N (chiamato glia/neurons ratio da Herculano-Houzel (2014a)), non correlando con le dimensioni dell'OB potrebbe essere un descrittore applicabile a taxa di maggior respiro rispetto alla specie. Difatti, fra i mammiferi troviamo differenze a livello di ordine (ad esclusione di *L. africana* negli Afrotheria). Un dato che salta subito agli occhi è che fra le specie osservate le nostre risultano quelle con la percentuale di neuroni più alta (e in parallelo un contenuto di cellule gliali più basso). Fra i mammiferi il gruppo più affine per queste variabili risultano gli Eulipotyphla, caratterizzati da un olfatto molto sviluppato (Ribeiro et al., 2014). Ciò potrebbe essere un dato a favore di un olfatto sviluppato anche nella classe dei pesci cartilaginei. Ma ulteriori studi che spazino su specie differenti risultano necessari. Sempre secondo tale studio in ordini con O/N più alto l'olfatto è meno importante a livello comportamentale rispetto agli altri sensi. Ciò non toglie che un O/N alto infici una buona capacità olfattiva. I Primati sono in grado di distinguere fino a nove enantiomeri differenti della stessa molecola pur avendo un O/N grande il doppio degli Eulipotyphla (Laska et al., 2005).

Oltre a queste variabili il presente studio si propone di introdurre un nuovo descrittore, mai trattato in letteratura. La densità di neuroni nell'OB su superficie di epitelio olfattivo, N/mm^2 , si propone di analizzare sinergicamente i due comparti principali del sistema olfattivo. Ciò che osserviamo nelle specie prese in esame è un andamento particolare. Pur correlando in maniera positiva con la taglia dell'animale sembrerebbe che il rapporto cresca più velocemente in *G. melastomus* piuttosto che in *S. canicula*; seppur questo abbia valori più alti nelle taglie minori. Il cambio di tendenza avviene all'incirca intorno ai 30 cm TL (Graph.3.9). I dati presenti in letteratura suggeriscono che le due specie nei primi anni di vita abbiano range batimetrici comparabili e diete simili,

basate soprattutto sulla predazione di crostacei. Durante lo sviluppo *G. melastomus* si inabissa verso zone più profonde, dove la densità di prede diminuisce, al contrario *S. canicula* si porta sulla piattaforma continentale. Superati i 30 cm TL entrambe le specie hanno un leggero cambio nel regime alimentare in favore di prede più grandi come pesci (Olaso et al., 2005). Come osservato anche da Bozzanao et al. (2001), in un'analisi sui fotorecettori, *G. melastomus*, procedendo verso l'età adulta vira verso una dieta più specifica di *S. canicula* il quale risulta più opportunisto. Ciò potrebbe avere un impatto decisivo anche sullo sviluppo di tutto il sistema olfattivo e del parametro proposto. Inoltre, bisogna considerare che l'habitat di *G. melastomus*, come osservato prima, conta di una densità minore di prede, dove la detezione degli stimoli olfattivi deve essere più puntuale sulla lunga distanza, anche in relazione allo sviluppo della linea laterale (Gardiner e Atema, 2014). Di contro *S. canicula*, frequentando un habitat a più stretto contatto con il benthos, accoppiato ad una densità di prede maggiore, potrebbe essere meno dipendente dal senso dell'olfatto e più da quello della vista (Olaso et al., 2005; Bozzanao et al., 2001). Ulteriori analisi saranno necessarie per stabilire la reale utilità di questo parametro, anche in altri rappresentanti dei vertebrati.

Per ottenere una parziale conferma di questa ipotesi si è ricorso all'utilizzo della PCA utilizzando quei descrittori che variano con l'ontogenesi degli animali: il numero totale delle cellule, neuronali e non, e il rapporto N/mm^2 . L'OBW è stato scartato in quanto troppo indicativo della taglia degli animali e per le problematiche prima osservate. Il risultato (Graph.4.3 e 4.4) vede grossomodo una clusterizzazione degli esemplari più piccoli di 30 cm TL per entrambe le specie e una per quelli di taglia maggiore. La zona di overlap è composta da quegli esemplari che sia avvicinano molto ai 30 cm. Grazie a questa ulteriore analisi si può spiegare abbastanza con chiarezza non solo l'importanza del parametro da noi proposto, ma anche dell'importanza della dieta nello sviluppo del sistema olfattivo.

Di contro parecchie domande restano insolte e molte criticità andranno affrontate. In primis applicare queste analisi, continuativamente sulla classe presa in considerazione, al fine di determinare se le conclusioni tratte da Yopak et al. (2015) siano confermate o meno da questi nuovi dati. Investigare, avvalendosi della letteratura, della variabile legata ai geni dei recettori sensoriali; nei pesci cartilaginei la situazione è totalmente

diversa rispetto ai vertebrati superiori (Marra et al., 2019). Come possa influire ciò sulla composizione cellulare dell'apparato olfattivo di specie diverse è ancora materia di discussione e potrebbe essere la chiave per determinare la reale definizione di "buona capacità olfattiva". Cioè se questa sia legata ad una bassa soglia di detezione di un odorante o alla discriminazione di un numero ampio degli stessi. Indagare in maniera approfondita, prendendo in considerazione più specie, da quale fattore siano imputabili le differenze osservate: se alla filogenesi o all'ecologia. E a che livello tassonomico una pesi più dell'altra. Inoltre, approfondire se la variabile riproduzione sia più o meno rilevante nello sviluppo del sistema olfattivo durante l'età adulta dei pesci cartilaginei (anche in ragione dell'alto numero di geni V2R presenti nei recettori olfattivi). Analizzare, inoltre, anche il tratto olfattivo, che varia morfologicamente da specie a specie, al fine di valutare il numero delle cellule mitrali, non rilevabili dalla tecnica del frazionamento isotropico.

L'importanza di questo tipo di studio si basa sul fatto che l'olfatto sia un sistema sensoriale presente in tutti i vertebrati, con implicazioni comportamentali molto importanti. Quindi gli studi condotti sui pesci cartilaginei, oltre a dare informazioni su un taxon evolutivamente particolare e rilevante, potrebbero essere l'anticamera di un'analisi comparativa, morfofunzionale, con implicazioni di carattere ecologico e conservazionistico, ad ampio respiro, dai ciclostomi all'*Homo sapiens* (Linnæus, 1758).

Bibliografia

1. Abel R.L., Maclaine J.S., Cotton R., Xuan V.B., Nickels T.B., Clark T.H., Wang Z. and Cox J.P., 2010. Functional morphology of the nasal region of a hammerhead shark. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155(4), pp.464-475.
2. Baptista M., Coelho R., Figueiredo I., Erzinic K., 2010. Determining of age and growth of *Galeus melastomus* (Rafinesque, 1810) , a deepwater shark, using a modification to the cobalt nitrate technique.
3. Bozzanao A., Murgia R., Vallerga S., Hirano J.,Archer S., 2001. The photoreceptor system in the retinae of two dogfishes, *Scyliorhinus canicula* and *Galeus melastomus*: possible relationship with depth distribution and predatory lifestyle. *Journal of Fish Biology*, 59(5), 1258-1278.
4. Capetta, H., 2012. Chondrichthyes: Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii: Teeth. *Handbook of Paleoichthyology*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
5. Compagno L.J.V., 1988. *Sharks of the Order Carcharhiniformes*. Princeton University Press, Princeton, NJ. 486 pp.
6. Costa M.E., Erzini K., Borges T.C., 2005. Reproductive biology of the blackmouth catshark, *Galeus melastomus* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) off the south coast of Portugal. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 85, 1173-1183.
7. Dean M.N., Summers A.P., 2006. Mineralized Cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. *Zoology* 109 164–168.
8. Dryer L., Graziadei P.P.C., 1993. A pilot study on morphological compartmentalization and heterogeneity in the elasmobranch olfactory bulb. *Anatomy and Embryology* 188: 41-51.
9. Ebert D.A., Fowler S., Compagno L., 2013. *Sharks of the world. A Fully Illustrated Guide*. Wild Nature Press.
10. Ellis J.R., Shackley S.E., 1997. The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, U.K. *Journal of Fish Biology* (1997) 51, 361–372.
11. Elsaesser R., Paysan J., 2007. The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC neuroscience*, 8(3), p.S1.

12. Ferrando S., Bottaro M., Gallus L., Girosi L., Vacchi M., Tagliafierro, G., 2006a. Observations of crypt neuron-like cells in the olfactory epithelium of a cartilaginous fish. *Neuroscience letters*, 403(3), pp.280-282.
13. Ferrando S., Bottaro M., Gallus L., Girosi L., Vacchi M., Tagliafierro, G., 2006b. Na⁺/K⁺ ATPase immunoreactivity in olfactory epithelium of small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* (L.): possible presence of ion exchanging cells?. *Journal of fish biology*, 69, pp.278-282.
14. Ferrando S., 2008. Ionocytes in the olfactory epithelium of developing *Raja clavata*. *Italian Journal of Zoology* 75, no. 3: 233-236.
15. Ferrando S., Gallus L., Gambardella C., Ghigliotti L., Ravera S., Vallarino M., Vacchi M., Tagliafierro, G., 2010. Cell proliferation and apoptosis in the olfactory epithelium of the shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of chemical neuroanatomy*, 40(4), pp.293-300.
16. Ferrando S., Gallus L., 2013. Is the olfactory system of cartilaginous fishes a vomeronasal system?. *Frontiers in neuroanatomy*, 7, 37.
17. Ferrando S., Gallus L., Ghigliotti L., Vacchi M., Nielsen J., Christiansen J.S., Pisano E., 2016. Gross morphology and histology of the olfactory organ of the Greenland shark *Somniosus microcephalus*. *Polar Biology*, 39(8), pp.1399-1409.
18. Ferrando S., Gallus L., Amaroli A., Gambardella C., Waryani B., Di Blasi D., Vacchi M., 2017. Gross anatomy and histology of the olfactory rosette of the shark *Heptranchias perlo*. *Zoology*, 122, pp.27-37.
19. Ferrando S, A.maroli A., Gallus L., Aicardi S., Di Blasi D., Christiansen J.S., Vacchi M., Ghigliotti L., 2019a. Secondary folds contribute significantly to the total surface area in the olfactory organ of Chondrichthyes. *Frontiers in Physiology* 10: 245.
20. Ferrando S., Amaroli A., Gallus L., Di Blasi D., Carlig E., Rottigni M., Vacchi M., Parker S.J., Ghigliotti, L., 2019b. Olfaction in the Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni*: clues from the morphology and histology of the olfactory rosette and bulb. *Polar Biology*, 42(6), 1081-1091.
21. Fu Y., Rusznák Z., Herculano-Houzel S., Watson C., Paxinos, G., 2013. Cellular composition characterizing postnatal development and maturation of the mouse brain and spinal cord. *Brain Structure and Function*, 218(5), 1337-1354.

22. Gardiner J.M., Atema J., 2014. Flow sensing in sharks: lateral line contributions to navigation and prey capture. In *Flow sensing in air and water* (pp. 127-146). Springer, Berlin, Heidelberg.
23. Graziadei G.M., Graziadei P.P.C., 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of neurocytology*, 8(2), 197-213.
24. Grogan E.D., Lund R., 2004. The origin and relationships of early Chondrichthyes. *Biology of Sharks and Their Relatives*, pp. 3–31. CRC Press, Boca Raton, FL.
25. Hansen A., Finger, T.E., 2000. Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes. *Brain, behavior and evolution*, 55(2), pp.100-110.
26. Herculano-Houzel S., Lent R., 2005. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *The Journal of Neuroscience* 25(10): 2518-2521.
27. Herculano-Houzel S. 2014a. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377-1391.
28. Herculano-Houzel S., Avelino-de-Souza K., Neves K., Porfírio J., Messeder D., Mattos Feijó L., Maldonado J., Manger, P. R., 2014b. The elephant brain in numbers. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 46.
29. Herculano-Houzel S., Manger P.R., Kaas J.H., 2014c. Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 77.
30. Human B.A., Owen E.P., Compagno L.J.V., Harley E.H. 2006. Testing morphologically based phylogenetic theories within the cartilaginous fishes with molecular data, with special reference to the catshark family (Chondrichthyes; Scyliorhinidae) and the interrelationships within them. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39(2):384–391.
31. Iglesias S.P., Lecointre G., D.Y. Sello D.Y., 2005. Extensive paraphylies within sharks of the order Carcharhiniformes inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34(3): 569–583.

32. Ivory P., Jeal F., Nolan C.P., 2005. Age Determination, Growth and Reproduction in the Lesser-spotted Dogfish, *Scyliorhinus canicula* (L.). *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, Vol. 35: 89–106.
33. Laska M., Genzel D., Wieser A., 2005. The number of functional olfactory receptor genes and the relative size of olfactory brain structures are poor predictors of olfactory discrimination performance with enantiomers. *Chemical senses*, 30(2), 171-175.
34. Mackay-Sim A., Kittel P.W., 1991. On the life span of olfactory receptor neurons. *European Journal of Neuroscience* 3.3 (1991): 209-215.
35. Manzini I., Korsching S., 2011. The peripheral olfactory system of vertebrates: molecular, structural and functional basics of the sense of smell. *e-Neuroforum*. Sep 1;17(3):68-77.
36. Marra N.J., Stanhope M.J., Jue N.K., Wang M., Sun Q., Bitar P.P., Richards V.P., Komissarov A., Rayko M., Kliver S., Stanhope B.J., 2019. White shark genome reveals ancient elasmobranch adaptations associated with wound healing and the maintenance of genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), pp.4446-4455.
37. McGann J.P., 2017. Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science* 356: eaam7263.
38. Meredith T.L., Kajiura S.M., 2010. Olfactory morphology and physiology of elasmobranchs. *Journal of Experimental Biology*, 213(20), pp.3449-3456.
39. Meredith T.L., Caprio J., Kajiura S.M., 2012. Sensitivity and specificity of the olfactory epithelia of two elasmobranch species to bile salts. *The Journal of Experimental Biology* 215: 2660-2661.
40. Mombaerts P., 2004. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4), p.263.
41. Naylor G.J.P., Caira J.N., Jensen K., Rosana K.A.M., Straube N., Lakner C., 2012. Elasmobranch phylogeny: A mitochondrial estimate based on 595 species. *Biology of Sharks and Their Relatives* (2nd ed.), pp. 31–56. CRC Press, Boca Raton, FL.
42. Nelson J.S., Grande T.G., Wilson M.V.H., 2016. *Fishes of the World*. Wiley.

43. Neves K., Menezes D., Rayee D., Valério-Gomes B., Lack P.M., Lent R., Mota B., 2019. The reliability of the isotropic fractionator method for counting total cells and neurons. *bioRxiv* 627869.
44. Ngwenya A., Patzke N., Manger P.R., Herculano-Houzel, S., 2016. Continued growth of the central nervous system without mandatory addition of neurons in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Brain, behavior and evolution*, 87(1), 19-38.
45. Niimura Y., 2009. On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: comparative genome analysis among 23 chordate species. *Genome Biology and Evolution*, 1, pp.34-44.
46. Olaso I., Velasco F., Sánchez F., Serrano A., Rodríguez-Cabello C., Cendrero O., 2005. Trophic relations of lesser-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) and blackmouth catshark (*Galeus melastomus*) in the Cantabrian Sea. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35, 481-494.
47. Olkowicz S., Kocourek M., Lučan R.K., Porteš M., Fitch W.T., Herculano-Houzel S., Němec P. 2016. Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26), 7255-7260.
48. Poli A., Fabbri E., Agnisola C., Calamita G., Santovito G., Verri T., 2018. *Fisiologia animale*. Edises.
49. Rey J., Gil de Sola L., Massuti E., 2005. Distribution and Biology of the Blackmouth Catshark *Galeus melastomus* in the Alboran Sea (Southwestern Mediterranean). *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, Vol. 35: 215–223.
50. Ribeiro P.F., Manger P.R., Catania K.C., Kaas J.H., Herculano-Houzel S., 2014. Greater addition of neurons to the olfactory bulb than to the cerebral cortex of eulipotyphlans but not rodents, afrotherians or primates. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 23.
51. Sanchez F., Blanco M., Gancedo R., 2002. Atlas de los peces demersales y de los invertebrados de interés comercial de Galicia y el Cantábrico. Otoño 1997–1999. CYAN, Proyectos y Producciones Editoriales (Edit.), 158 p., Madrid.
52. Schluessel V., Bennett M.B., Bleckmann H., Blomberg S., Collin S.P., 2008. Morphometric and ultrastructural comparison of the olfactory system in

- elasmobranchs: the significance of structure–function relationships based on phylogeny and ecology. *Journal of Morphology*, 269(11), pp.1365-1386.
53. Schwob J. E., Jang W., Holbrook E.H., Lin B., Herrick D.B., Peterson J.N., Coleman J.H., 2017. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *Journal of Comparative Neurology* 525, no. 4: 1034-1054.
 54. Seelke A.M., Dooley J.C., Krubitzer L.A., 2013. Differential changes in the cellular composition of the developing marsupial brain. *Journal of Comparative Neurology*, 521(11), 2602-2620.
 55. Seelke A.M., Dooley J.C., Krubitzer L.A., 2014. The cellular composition of the marsupial neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, 522(10), 2286-2298.
 56. Sharma K., Syed A.S., Ferrando S., Mazan S., Korsching S.I., 2019. The chemosensory receptor repertoire of a true shark is dominated by a single olfactory receptor family. *Genome biology and evolution*, 11(2), pp.398-405.
 57. Sterzi G., 1909. Il sistema nervoso centrale dei vertebrati, vol 2, Pesci I. Selaci. Draghi, Padova.
 58. Takami S., Luer C.A., Graziadei P.P., 1994. Microscopic structure of the olfactory organ of the clearnose skate, *Raja eglanteria*. *Anatomy and embryology*, 190(3), pp.211-230.
 59. Theisen B., Zeiske E., Breucker, H., 1986. Functional morphology of the olfactory organs in the spiny dogfish (*Squalus acanthias* L.) and the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* (L.)). *Acta Zoologica*, 67(2), pp.73-86.
 60. Theiss S.M., Hart N.S., Collin S.P., 2009. Morphological indicators of olfactory capability in wobbegong sharks (Orectolobidae, Elasmobranchii). *Brain, behavior and evolution*, 73(2), p.91.
 61. Timm L.L., Fish F.E., 2012. A comparative morphological study of head shape and olfactory cavities of sharks inhabiting benthic and coastal/pelagic environments. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 414, pp.75-84.
 62. Venkatesh B., Kirkness E.F., Loh Y.H., Halpern A.L., Lee A.P., Johnson J., Dandona, N., Viswanathan L.D., Tay A., Venter J.C., Strausberg, R.L., 2007. Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (*Callorhynchus milii*) genome. *PLoS biology*, 5(4), p.e101.

63. Weigamnn S., 2016. Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *Journal of Fish Biology* 88, 837–1037.
64. Yopak K.E., Lisney T.J., Collin S.P., 2015. Not all sharks are “swimming noses”: variation in olfactory bulb size in cartilaginous fishes. *Brain Structure and Function* 220.2:1127-1143.
65. Zielinsky B.S., Hara T.J., 2007. Olfaction. *Sensory System Neuroscience*. Vol.25, 1-43, *Fish physiology*. Elsevier Inc.

“Andò all’università per capire il mare [...]

divenne un biologo marino [...].

Col passar del tempo, diventò un esperto [...], ma dentro di sé si sentiva ancora come un ragazzo con la maschera e il boccaglio che osservava lo strano mondo sottomarino e desiderava capire come funzionava.”

Tim Winton, *Blueback*

Correva l’anno 1998 quando lessi *Blueback* e decisi di voler fare il biologo marino. Ai tempi era solo il sogno di un bambino, niente di più e niente di meno di dire “da grande voglio fare l’astronauta”. Si sa, fra il dire e il fare c’è di mezzo il mare; eppure in questa occasione c’era veramente il mare. Ed eccoci qua oggi, anche se il mare. Piuttosto che in mezzo è qui davanti a me: il viaggio inizia oggi. E in un viaggio sono tante le persone che incontri e con cui condividi, tutta o in parte, la strada.

Come le due persone che, oltre ad avermi messo al mondo, mi hanno permesso di arrivare fino a qua: mio papà e mia mamma. Grazie papà, e non solo perché mi mantieni (cosa che non manchi mai di ricordarmi), ma soprattutto perché se alle volte qualcuno mi dice che sono una persona buona, quello l’ho imparato da te. Anche se non te lo dico spesso ti voglio bene e apprezzo tantissimo il modo alle volte goffo con cui anche tu me lo dimostri. E grazie mamma, perché se c’è qualcuno che mi ha sempre spinto a leggere, a interessarmi alla Scienza e che mi ha sempre voluto un bene dell’anima quella persona sei tu. Siete due genitori rompiballe, con un figlio rompiballe (la genetica non mente mai), che però vi vuole tanto tanto bene. Sì Martina voglio tanto bene anche a te, che come dice sempre la genitrice sei stata la mia salvezza, e forse ha anche ragione. In fondo tu forse non lo sai, ma, quando non ci sei, parlo un sacco bene di te; quando non ci sei (perché diciamocelo, nella nostra famiglia di rompiballe tu detieni la palma d’oro, ma non saresti tu dopotutto).

Un grazie grande come la Luna va alla persona che, di fatto, ha reso tutto questo possibile, e che mi ha insegnato tantissimo: Sara. Sei una delle persone più geniali scientificamente parlando e più umane che ci siano (aperitivi teutonici a parte). Non solo mi hai insegnato tantissime cose, ma mi hai fatto anche capire quanto in realtà ci sia

ancora da imparare di giorno in giorno. Dopo aver fatto la tesi con te non cambierei il lab 3 per nulla al mondo. Grazie. Grazie. Grazie. Ti voglio bene!

Poi un grazie, anzi tre, vanno alle tre colonne portanti della mia vita (vi cito in ordine alfabetico così tanto per non offendere nessuno): Bonsy, Boss e Grace. Ragazzi siete ciò che di più bello la Vita potesse darmi. A voi tre posso promettere con certezza, che non importa dove andrò, ma resterete sempre i miei migliori amici. Bonsy, le stronzate che facciamo (e soprattutto abbiamo fatto) insieme nessuno mai. Perché solo tu potevi essere il compagno di merende (kebab di solito) con cui macinare chilometri e chilometri parlando di tutto e di più. E sei una delle poche ragioni per cui torno ad Imperia. Boss, compagno di mille avventure, che sarebbero stati questi cinque/sei anni di DISTAV senza di te? Chi esce di casa la sera per soccorrere l'amico in lacrime? Chi lava (per due ore) un sacco di cozze? Chi va a dare un esame mezzo brillo perché la sera prima vuole festeggiare l'amico? Tu, e sempre tu. Grace tu sei la persona che più mi capisce a questo mondo e che mi è stata vicina in ogni occasione. Ci vediamo poco è vero, ma farei miliardi di chilometri anche solo per vederti cinque minuti, perché ne varrebbe assolutamente la pena. Grazie per tutto il sostegno che mi dai e per tutte le volte che credi in me (e mi appoggi anche quando sai che sto per fare una belinata di dimensioni enormi).

Giggi. Caro Giggi. Sei il miglior coinquilino che potessi desiderare. E non parlo degli aperitivi, le cenette "gourmet", delle discussioni di politica (ti ricordo che fino a settembre voti PD), ecc, ecc. Parlo del fatto che tu, in questi due anni, sei diventato un grande amico e sei stato il mio confidente (a tuo rischio e pericolo) su tutto quello che è passato in questo periodo. Grazie per tutte le volte che hai ascoltato i deliri di questo pazzo, che però ti vuole un gran bene. Grazie e ad un altro grande anno!

E ora tocca a tutta la combriccola di disperati di cui faccio parte anche io. Elenina, la mamma di tutti; Giulia, che ci serve un vocabolario per capirla, ma fa lo spritz migliore del mondo (non ti offendere è una battuta <<lo picchia>>); Ada, che ogni volta che ti fai abbracciare son fiero di te; Marcolino, il nostro calabrese preferito; Lollo, che se c'è te ne accorgi perché lo senti; Nico, l'uomo dei gamberi; Ale 1, se non ci fossi te, avremmo solo un paio di foto di noi; Ale 2, l'unica normale, un po' ti ho sempre compatita a stare in questa nostra amorevole gabbia di matti, Fefè, che non ha mai una sigaretta, ma

preferisco un pacco di tabacco vuoto, piuttosto che non averti come compare. E ancora, i tre piccoli, una delle migliori scoperte dell'ultimo anno: Silvia, la donna "biancazzurra"; Carolina, che non fa sedere i vecchietti sul bus, Marco I., l'uomo che fa le battute più belle che io conosca. E poi gli abiotici: il silenzioso ma letale Matteo e la nostra super sportiva Cristina. E i due "acquisti": l'amato Daniele, che è amato e amatissimo, null'altro da aggiungere. E Nicholas Francesco D'Alberti Capo Noli, detto Niccöla, per gli amici Nick, a cui, anche se di tanto in tanto gli tirerei qualcosa in testa (con violenza), voglio un bene enorme.

Un grazie per tutti i messaggi notturni e per tutta la carica che mi dai va anche a te Irene, che sei il mio pezzo di cuore in giro per il Mondo e non vedo l'ora di rivederti.

E poi a Gallus, che mi ha dato una mano tantissime volte in lab tirandomi fuori da tante situazioni spinose. Anche a te va un grazie grande grande e un grande ti voglio bene!

E poi alle mie due altre famiglie preferite. Nico e Santina e tutta la Family Coppola, perché quando sono da voi mi sento sempre a casa. Infine, a tutto un insieme di persone che mi hanno sempre voluto bene o che hanno condiviso un tratto del viaggio con me: Ilaria e zia Stefania, Don Paolo, Martina, Pitti, Holly, Juan, Keta, i ragazzi della pallamano, Monica, Andrea, Camilla, Laura, Elisa, Piera, Alessia, Andrea e Beatrice. E anche a te, a cui avevo promesso queste righe, e che mi hai insegnato che ho molta più forza di quella che potessi immaginare. Grazie a tutti voi e anche a coloro che mi son dimenticato di citare.

A tutti voi, che mi sopportate, che mi volete bene per quel che sono, vi chiedo scusa per tutte le volte che i miei difetti hanno il sopravvento su quei pochi pregi che posso avere. E vi ringrazio per tutto ciò che mi avete dato e che mi date ogni giorno. Oggi incomincia un nuovo viaggio e se volete accompagnarmi per un pezzo ci sono ancora tanti posti liberi. Grazie di esserci, se la mia Vita speciale è soprattutto grazie a voi, e ora capisco che cosa voleva dire il filosofo e matematico Leibniz quando diceva che il nostro è "il migliore dei mondi possibili". Sì, ora so che cosa voleva dire. Perché senza di voi non sarei nulla.

GRAZIE

Stefano Donca

Fig.1.1: albero filogenetico della classe dei *Chondrichthyes*; tratto da Nelson et al. (2016), i taxa estinti sono stati rimossi.

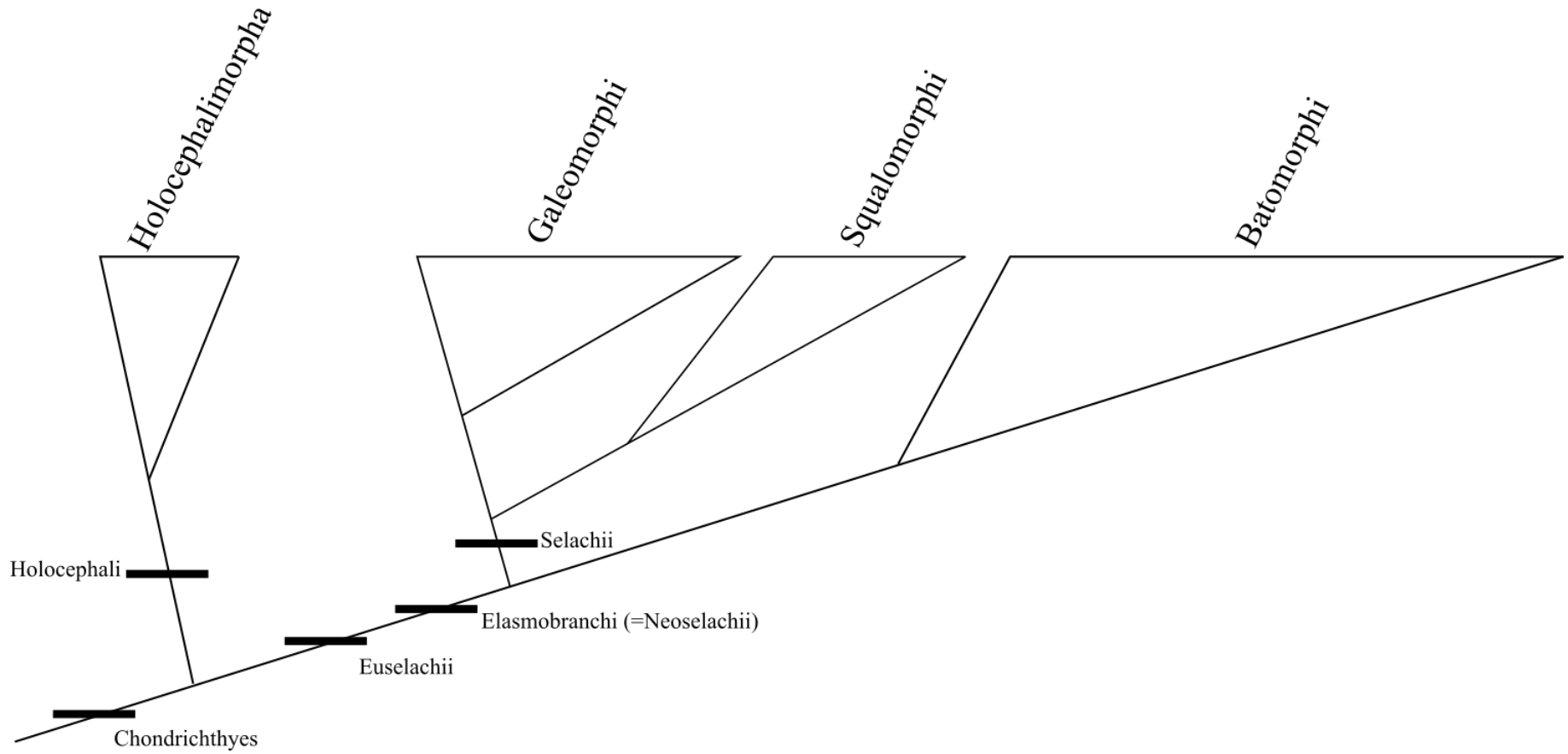


Fig.1.2: schema morfologico delle peculiarità della famiglia Scyliorhinidae. Si notano soprattutto le ultime aperture branchiali oltre la radice della pinna pettorale, un abbozzo di membrana nittitante, due piccole dorsali senza spine, dove la prima è posizionata posteriormente alla pinna pelvica, e le pinne anali. (e: occhio; ne: membrana nittitante; s: spiracolo; go: aperture branchiali; pcf: pinna pettorale; plf: pinna pelvica; df: prima pinna dorsale; sv: valvola spirale; af: pinna anale; sdf: seconda pinna dorsale; cf: pinna caudale.)

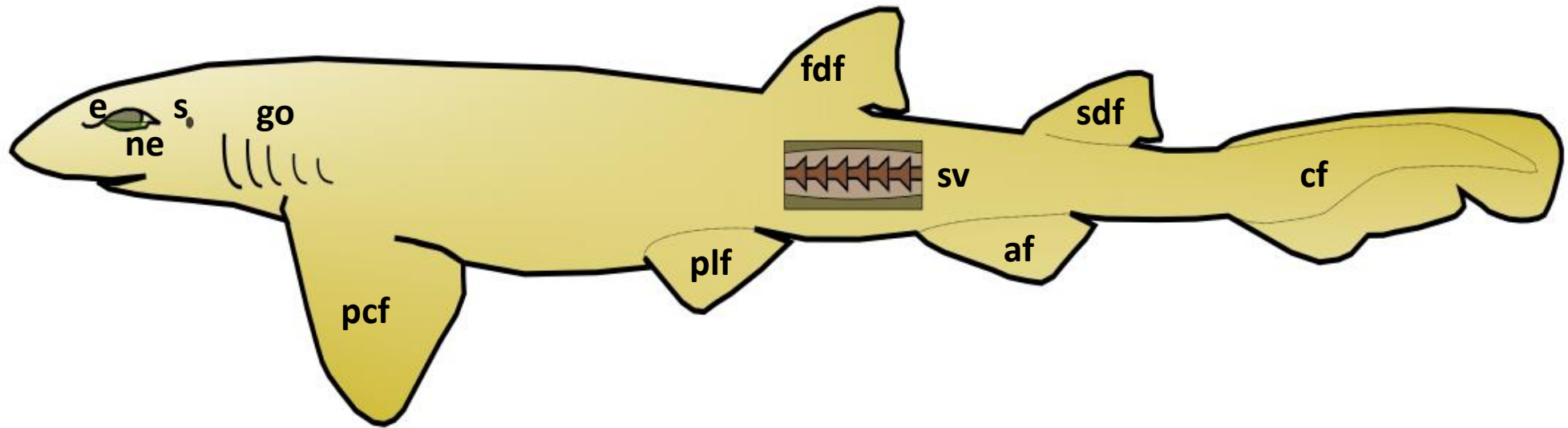


Fig.1.3: tassonomia e distribuzione di *Scyliorhinus canicula*.

| Dominio | Regno | Phylum | Classe | Ordine | Famiglia |
|--------------|----------|----------|---------------------------|-------------------|----------------|
| Eukaryota | Animalia | Chordata | Chondrichthies | Carcharhiniformes | Scyliorhinidae |
| Genere | | | Specie | | |
| Scyliorhinus | | | canicula (Linnaeus, 1758) | | |



Areale di *Scyliorhinus canicula* (sx) e foto di un esemplare (sopra)
(fonte foto: Wikipedia)

Fig.1.4: tassonomia e distribuzione di *Galeus melastomus*.

| Dominio | Regno | Phylum | Classe | Ordine | Famiglia |
|-----------|----------|----------|-------------------------------|-------------------|----------------|
| Eukaryota | Animalia | Chordata | Chondrichthies | Carcharhiniformes | Scyliorhinidae |
| Genere | | | Specie | | |
| Galeus | | | melastomus (Rafinesque, 1810) | | |



Areale di *Galeus melastomus* (sx) e foto di un esemplare (sopra)
(fonte foto: Wikipedia)

Fig. 1.5: Encefalo di Elasmobranco. Come si evince dalla figura, il bulbo olfattivo è una porzione consistente dell'encefalo. OR: rosetta olfattiva; OB: bulbo olfattivo; OT: tratto olfattivo; T: telencefalo; M: mesencefalo; D: diencefalo; C: cervelletto.

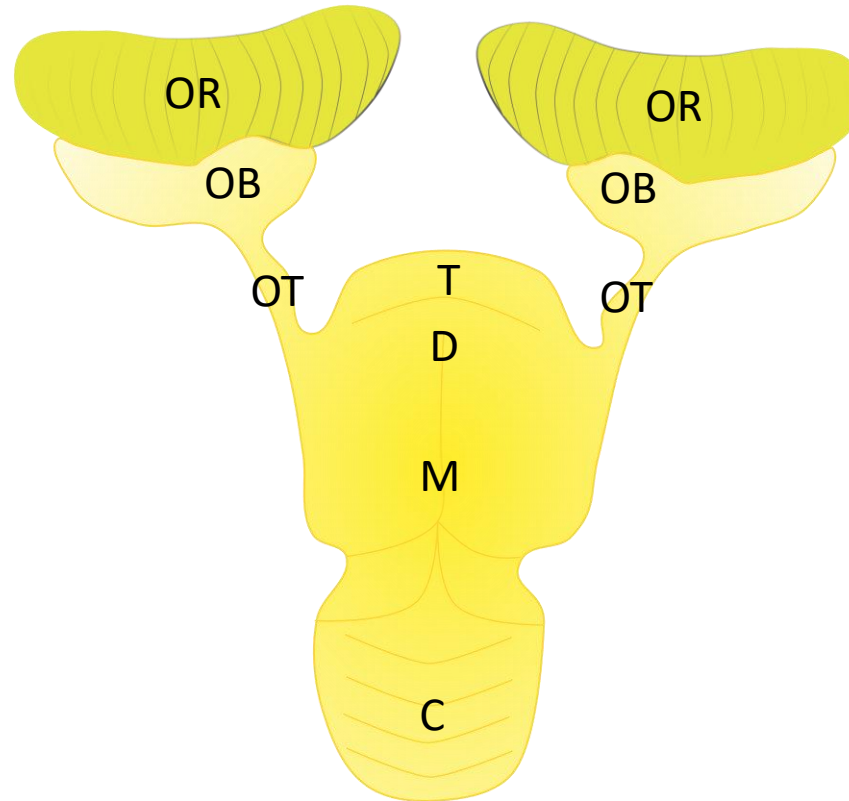


Fig. 1.6 Epitelio olfattivo (OE) della rosetta olfattiva (OR). I nuclei dei neuroni si distinguono per essere centrali (nello strato intermedio) e tondi. ONS: neuroni sensoriali; CrC: cellule cripta; SC: cellule di sostegno; IC: ionociti; BC: cellule basali; LP: lamina propria.

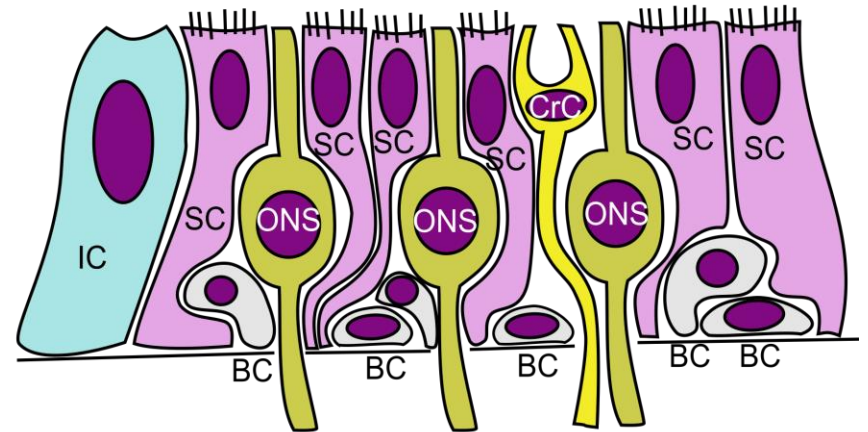
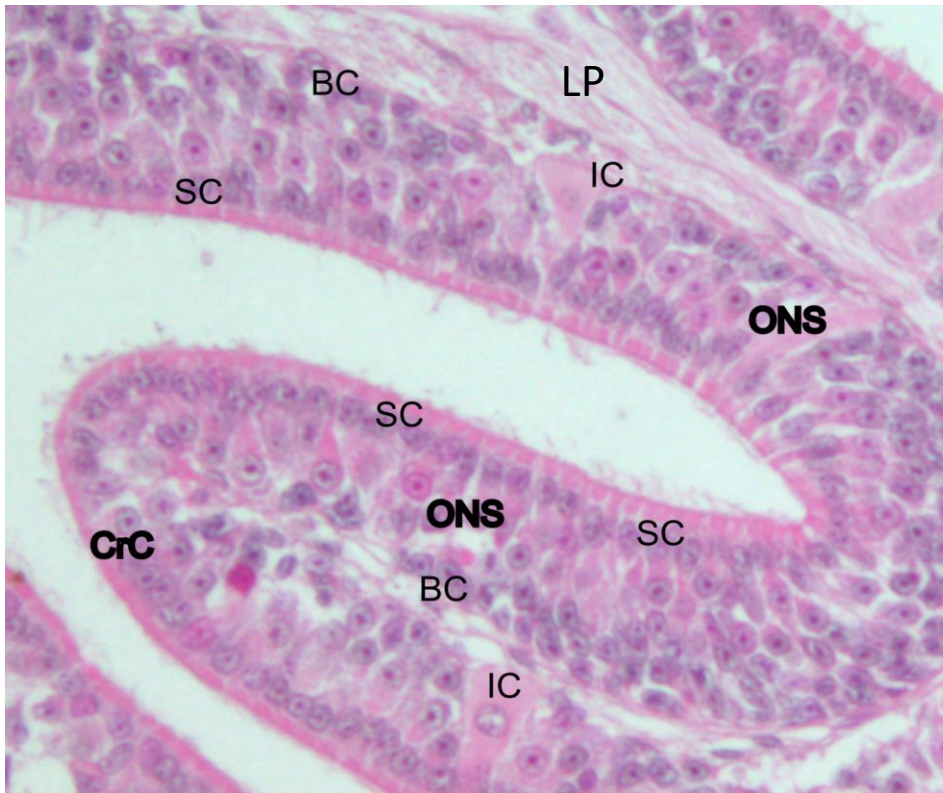
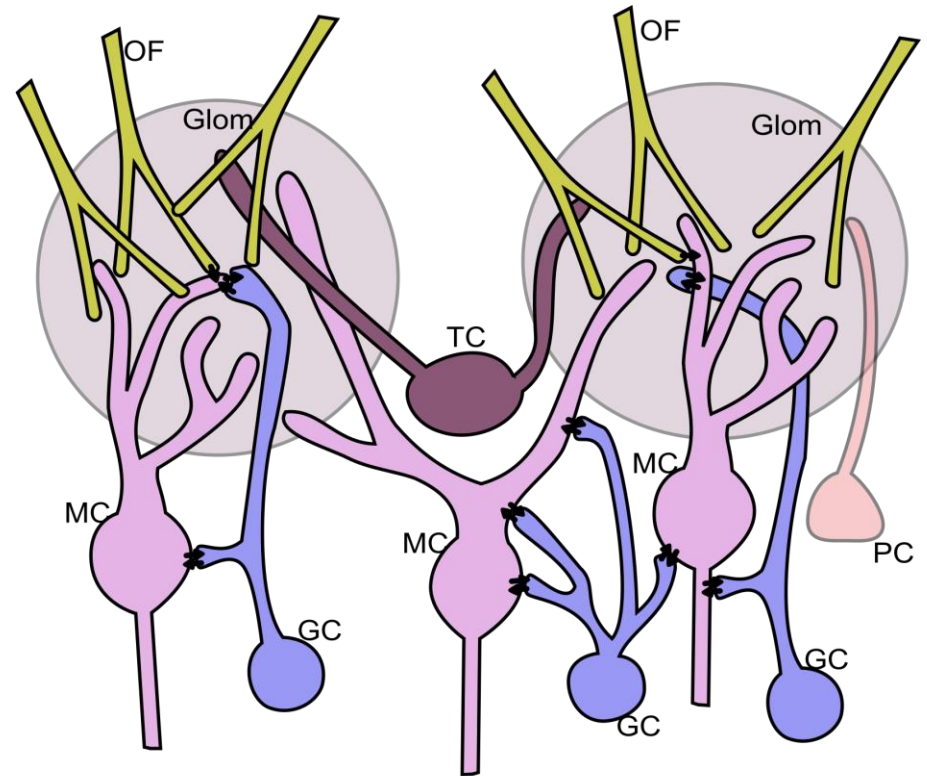
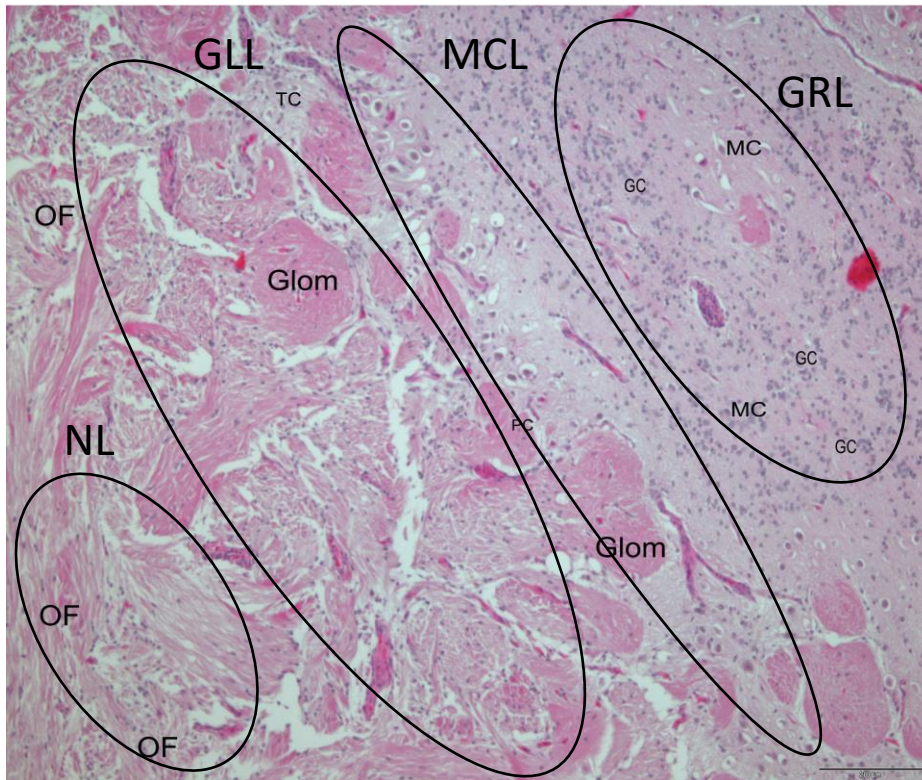


Fig. 1.7 Organizzazione microscopica del bulbo olfattivo (OB); le zone del bulbo sono indicative e possono relativamente sovrapporsi. NL: strato nervoso; GLL: strato glomerulare; MCL: strato delle cellule mitrali; GRL: strato granulare; OF: fibre olfattorie (dagli ONS); Glom: glomeruli; TC: cellule tuft; MC: cellule mitrali; GC: cellule granulari; PC: cellule periglomerulari.



Tab. 2.1: campioni di *S. canicula*. TL: Lunghezza totale (FAO), misurata dalla punta del muso alla punta della coda; M maschio; F: femmina; J :giovanile; AVG cells: media dei nuclei contati in camera di Burker; N%: percentuale di neuroni ottenuta.

| <i>Scyliorhinus canicula</i> raw data | | | | | |
|---------------------------------------|---------|-----|----------|-----------|------|
| # | TL [cm] | Sex | OBW (mg) | AVG cells | N % |
| 18.1 | 48 | M | 99 | 346 | 75.7 |
| 18.2 | 33 | M | 48 | 344 | 76.6 |
| 18.3 | 21 | M | 19 | 125 | 75 |
| 18.4 | 20 | F | 21 | 99 | 76.5 |
| 18.5 | 28.5 | M | 36 | 242 | 76.2 |
| 18.6 | 21.5 | F | 23 | 82 | 74.6 |
| 18.7 | 21 | F | 22 | 92 | 74.1 |
| 18.8 | 35.5 | M | 49 | 240 | 76.5 |
| 18.9 | 30.5 | M | 42 | 226 | 74.1 |
| 18.10 | 27.5 | F | 23 | 209 | 76 |
| 18.11 | 27.5 | F | 28 | 374 | 66 |
| 18.12 | 29 | F | 26 | 303 | 68.3 |
| 18.13 | 28 | M | 33 | 243 | 74.7 |
| 18.14 | 27 | M | 24 | 191 | 76.7 |
| 18.15 | 24.5 | M | 22 | 125 | 69 |
| 18.16 | 25 | F | 17 | 138 | 76.2 |
| 18.17 | 22.5 | M | 20 | 144 | 72.4 |

Campioni del 8/2/2018, Savona (SV)

Tab. 2.2: campioni di *G.melastomus*. TL: Lunghezza totale (FAO), misurata dalla punta del muso alla punta della coda; M maschio; F: femmina; J :giovanile; AVG cells: media dei nuclei contati in camera di Burker; N%: percentuale di neuroni ottenuta.

| <i>Galeus melastomus</i> raw data | | | | | |
|-----------------------------------|---------|-----|----------|-----------|------|
| # | TL [cm] | Sex | OBW (mg) | AVG cells | N % |
| 18.1 | 36 | F | 70 | 424 | 76.5 |
| 18.2 | 30 | M | 55 | 403 | 72.9 |
| 18.3 | 27 | M | 31 | 255 | 64.1 |
| 18.4 | 18 | F | 20 | 168 | 82.7 |
| 18.5 | 17 | F | 12 | 111 | 78.8 |
| 18.6 | 15 | J | 9 | 37 | 80 |
| 18.7 | 13.5 | J | 5 | 26 | 77.1 |
| 18.8 | 13.5 | J | 6 | 34 | 75 |
| 18.9 | 15 | M | 13 | 106 | 69.8 |
| 18.10 | 13 | J | 7 | 55 | 76.9 |
| 18.11 | 11 | J | 3 | 21 | 62.8 |

Campioni del 18/5/2018, S. Margherita Ligure (GE)

Fig. 2.1: schema di campionamento per uno squalo nell'ambito dello studio del sistema olfattivo. Se le dimensioni dell'animale lo consentono prelevare l'intera testa altrimenti è consigliabile dividerla a metà (premurandosi di non danneggiare le rosette olfattive).

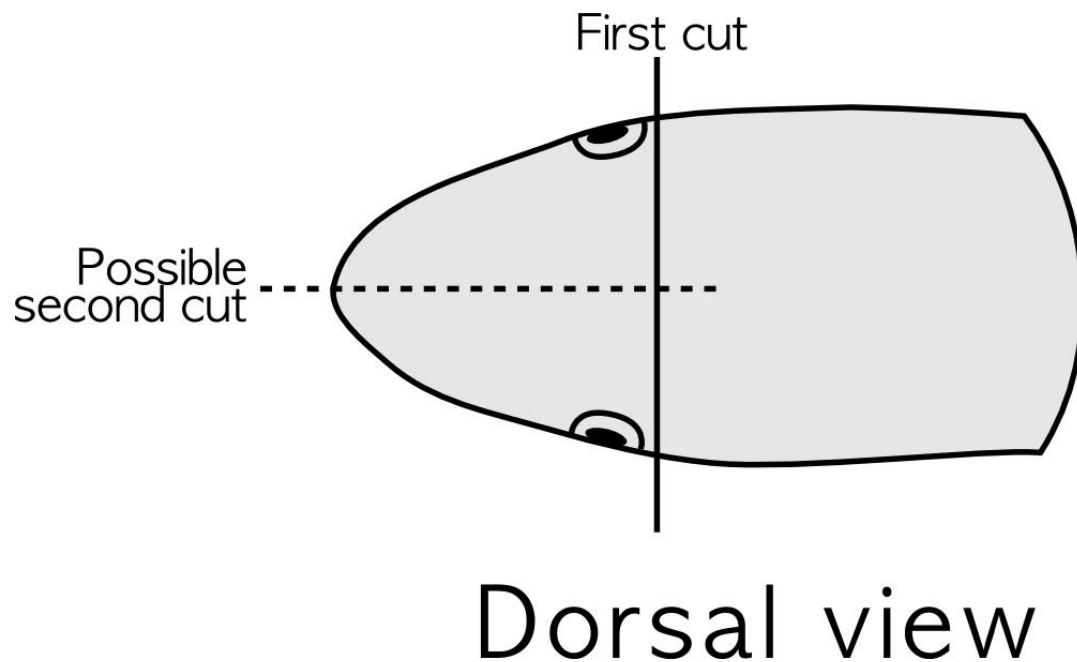


Fig.2.2 Schema di dissezione per il prelievo dell'apparato olfattivo di uno squalo. Il prelievo dell'apparato olfattivo di uno squalo prevede l'asportazione della cute che sovrasta la parte anteriore del capo (Tagliando lungo le due linee tratteggiate spesse). Dopodiché si procede all'asportazione della capsula olfattiva, che può essere più o meno vicina alla punta del naso (a seconda della lunghezza del rostro) Si conclude distaccando il bulbo dal resto del cranio e lo stesso dalla rosetta. OR: rosetta olfattiva; OB: bulbo olfattivo; R: rostro; OlfC: capsula olfattiva, OptC: capsula ottica; C: cranio.

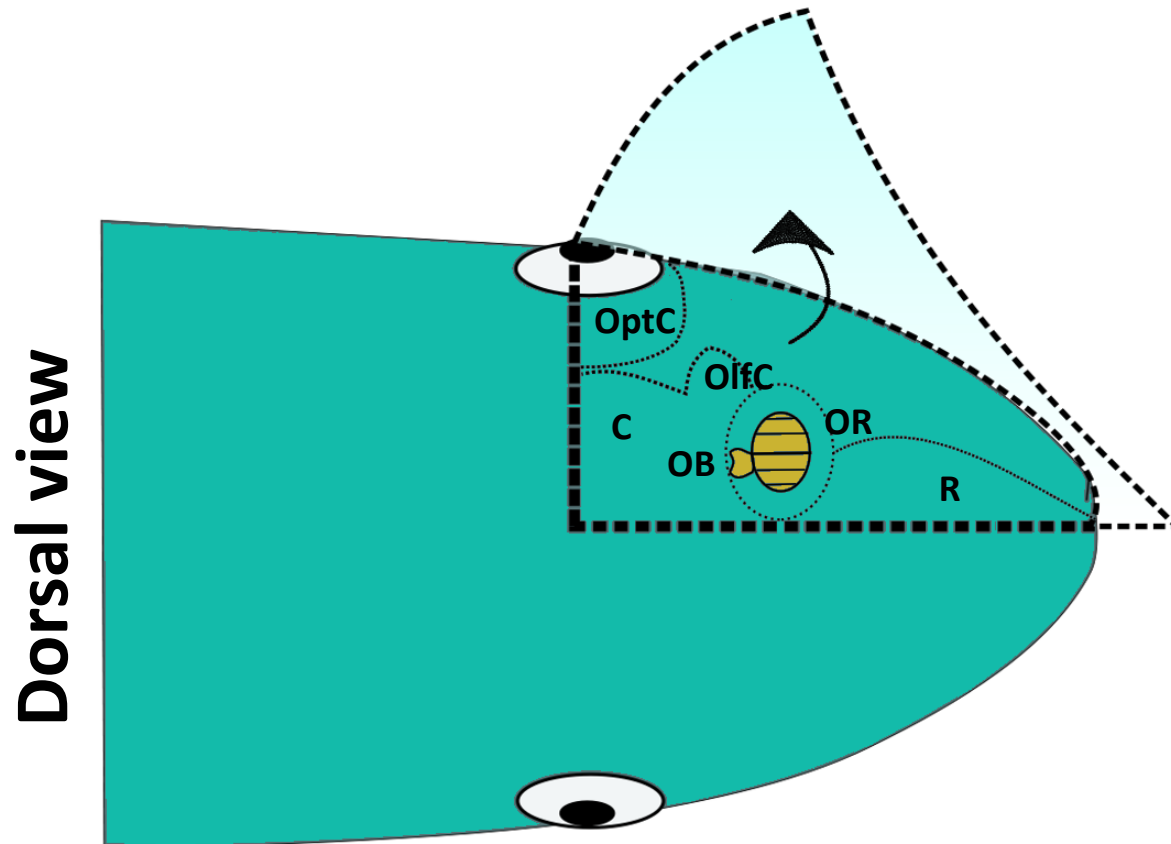


Fig. 2.3: per determinare la superficie totale dell'epitelio olfattivo dell'OR si procede a misurare la lunghezza del rafe e la larghezza delle lamelle, si ricava inoltre il numero lamellare, che varia da specie a specie. Dopodiché, tagliandola a metà si calcola la superficie, in mm², di una lamella grande e di una piccola. La superficie totale si ottiene grazie alla seguente formula:

$$(area\ lamella\ primaria\ grande * numero\ lamellare * 2 * 0.7) + \\ (area\ lamella\ primaria\ piccola * numero\ lamellare * 2 * 0.3)$$

N.B. si considera che circa il 70% delle lamelle primarie in una rosetta dal rafe allungato sia «grande» e il restante 30% «piccole».

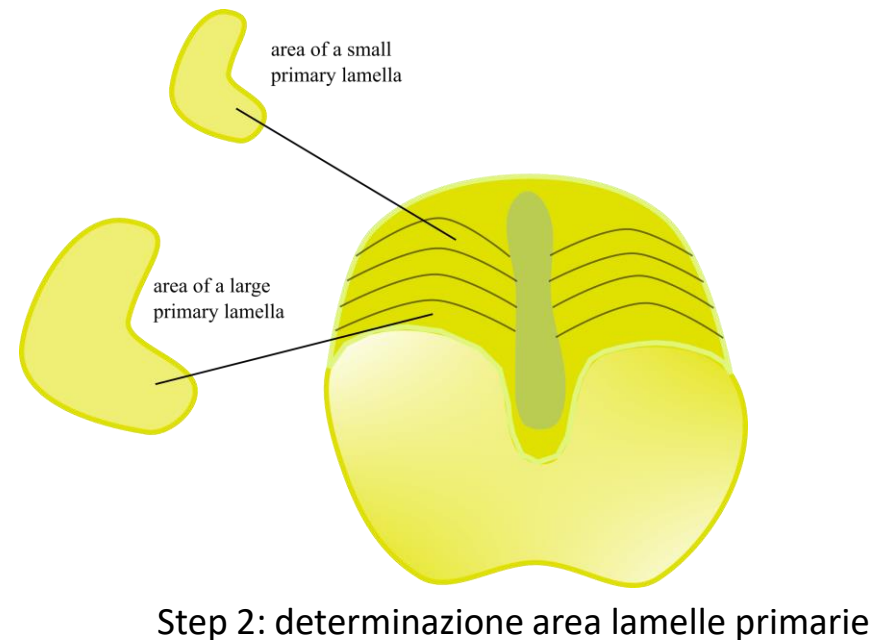
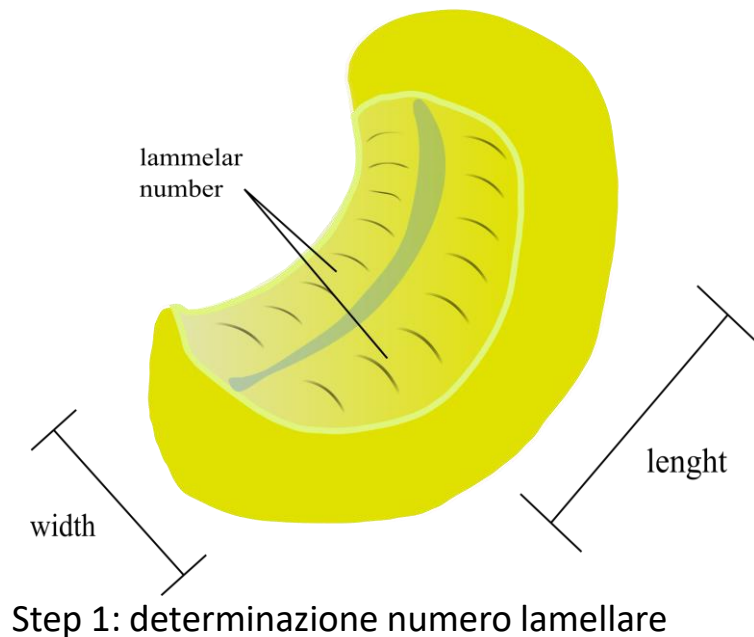


Fig. 2.4 dopo aver ottenuto la superficie data dalle lamelle primarie si calcola l'incremento dato dalle lamelle secondarie. Si calcola su quattro lamelle primarie con un taglio più o meno centrale. La formula è la seguente:

$$\left[\frac{L' - L}{L} \right] * 100$$

Dopodiché si moltiplica per la superficie ottenuta dalle sole lamelle primarie

Legenda:

L=distanza fra A e B;

L'=distanza fra A' e B'

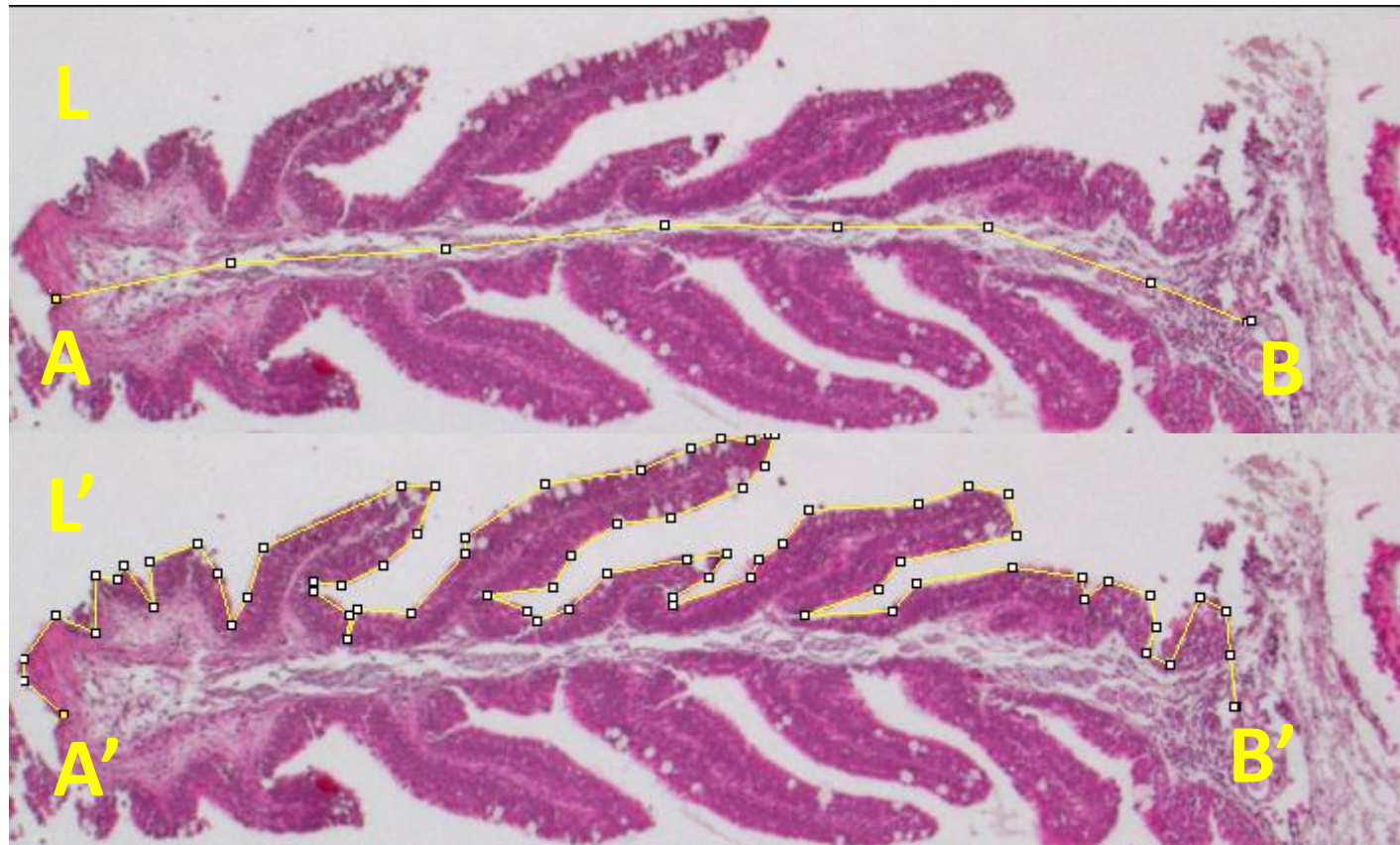
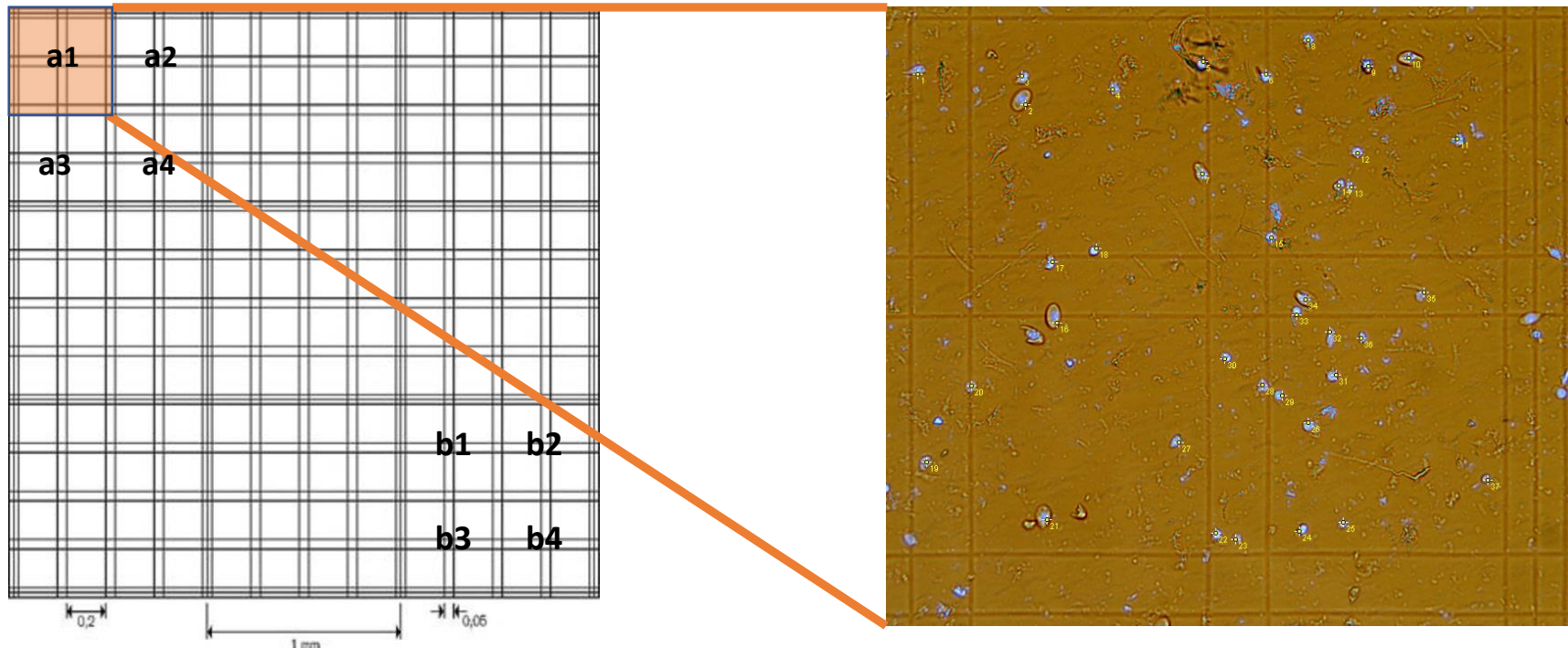
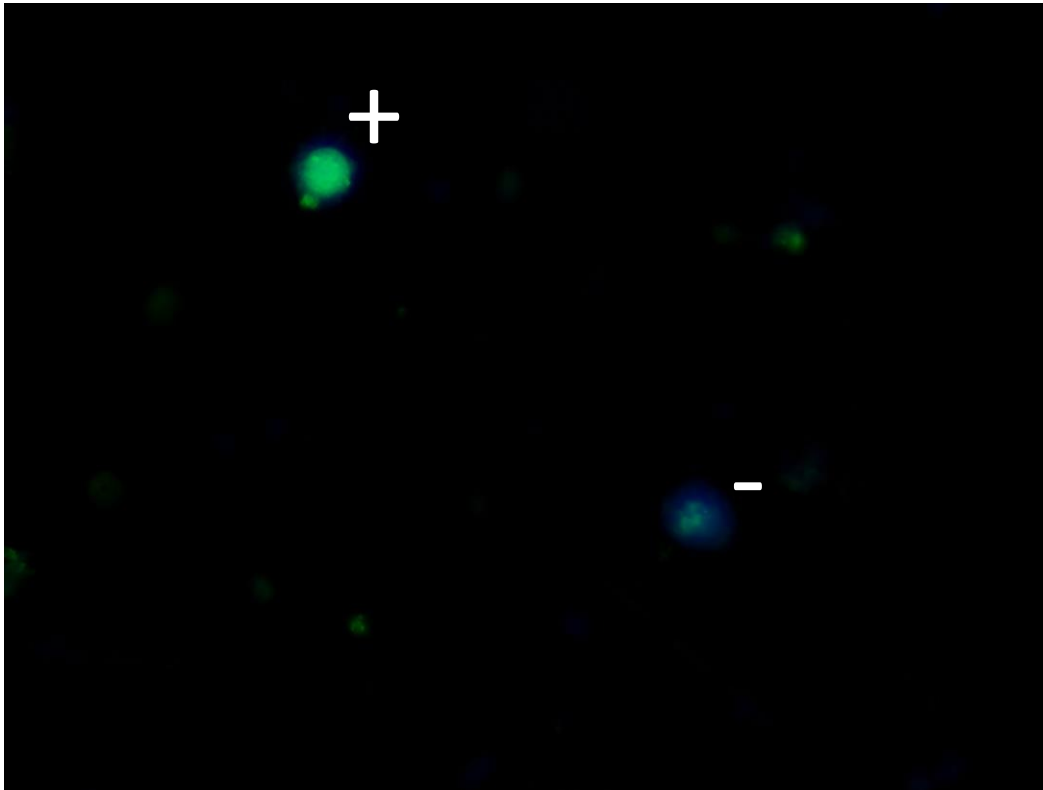


Fig. 2.5: determinare il numero totale di cellule nell'OB mediante la conta dei nuclei dei neuroni nella camera di Burker. Grazie al software ImageJ acquisire il numero di neuroni per fotografia, la quale corrisponde ad 1/36 della superficie della camera. Per ovviare errori di sovrastima si contano i nuclei su soli due dei quattro lati.



Per calcolare la media per quadrato (1/9 della camera) si utilizza la seguente formula: $(\sum a_n + \sum b_n)/2$. Dopodiché si mediano le varie repliche fra loro per una stima più accurata

Fig. 2.6: determinare la percentuale di neuroni dell'OB sul totale di cellule utilizzando il software ImageJ. Le foto doppie relative allo stesso campo (in luce UV e in luce blu) vengono sovrapposte. I nuclei positivi (+) saranno quelli dove l'anticorpo si è legato, e risulteranno verdi. I nuclei che appariranno solo blu (DAPI) o debolmente verdi, dopo la sovrapposizione, saranno considerati negativi (-).



Per calcolare la percentuale di neuroni totali nell'OB si utilizza la seguente formula:

$$\left(\frac{n^{\circ}nuclei\ positivi}{n^{\circ}nuclei\ obs}\right) \times 100$$

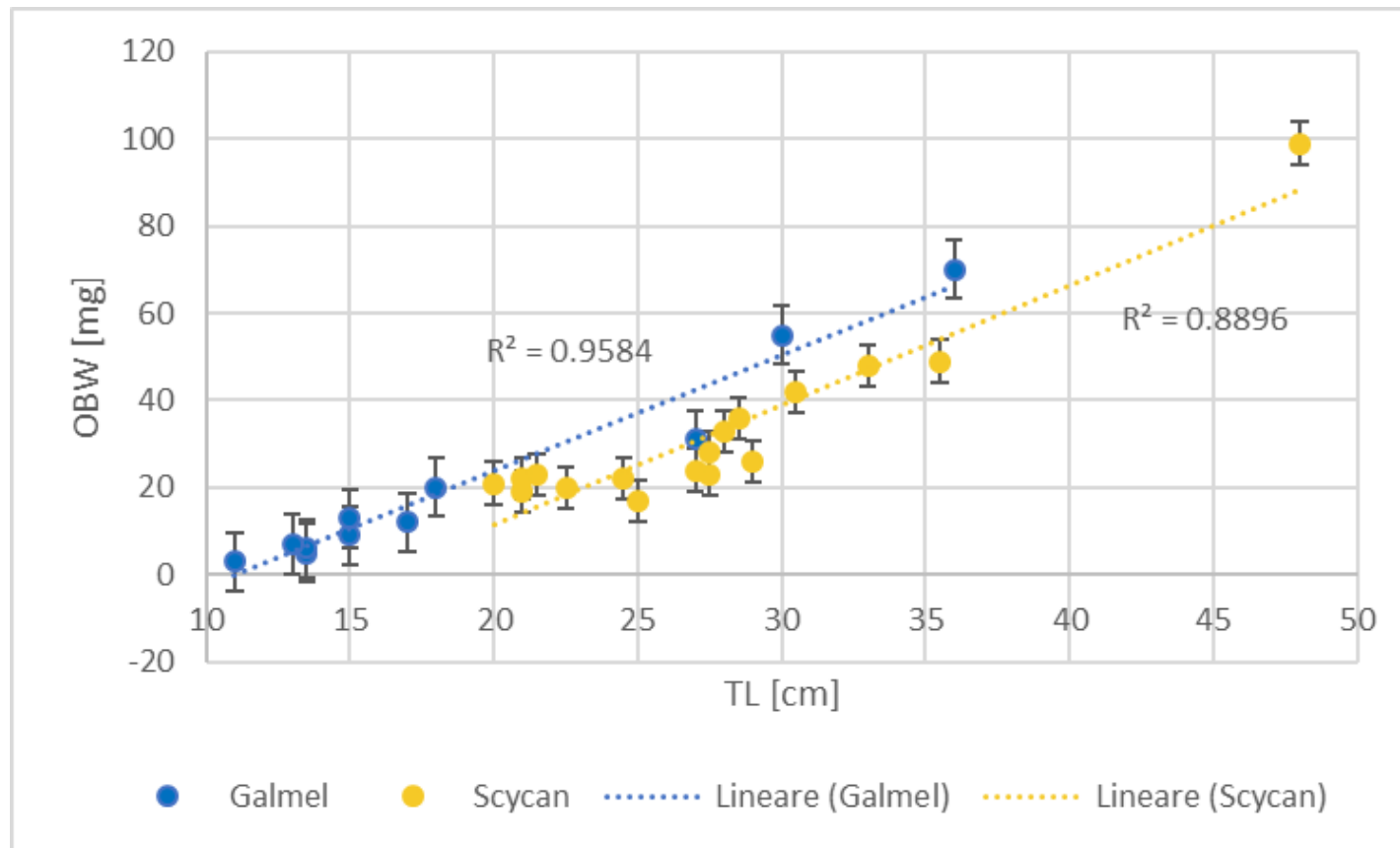
Tab. 3.1: dati OB di *S. canicula*. Ctot: numero totale di cellule nell'OB; Ntot: numero totale di neuroni nell'OB; N/mg: rapporto fra NTot e il peso dell'OB; Ocells: numero totale delle cellule non neuronali presenti nell'OB.; O/N: rapporto fra cellule non neuronali e neuroni nell'OB.

| <i>S. canicula</i> OB data | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|
| # | Ctot | Ntot | N/mg | Ocells | O/N |
| 18.1 | 2446220 | 1851789 | 18705 | 594431 | 0.321004 |
| 18.2 | 1228080 | 940709 | 19598 | 287371 | 0.305483 |
| 18.3 | 446250 | 334688 | 17615 | 111563 | 0.333333 |
| 18.4 | 349965 | 267723 | 12749 | 82242 | 0.30719 |
| 18.5 | 1222100 | 931240 | 25868 | 290860 | 0.312336 |
| 18.6 | 331280 | 247135 | 10745 | 84145 | 0.340483 |
| 18.7 | 371680 | 275415 | 12519 | 96265 | 0.349528 |
| 18.8 | 1212000 | 927180 | 18922 | 284820 | 0.30719 |
| 18.9 | 913040 | 676563 | 16109 | 236477 | 0.349528 |
| 18.10 | 633270 | 481285 | 20925 | 151985 | 0.315789 |
| 18.11 | 1133220 | 747925 | 26712 | 385295 | 0.515152 |
| 18.12 | 1530150 | 1045092 | 40196 | 485058 | 0.464129 |
| 18.13 | 1227150 | 916681 | 27778 | 310469 | 0.338688 |
| 18.14 | 964550 | 739810 | 30825 | 224740 | 0.303781 |
| 18.15 | 631250 | 435563 | 19798 | 195688 | 0.449275 |
| 18.16 | 696900 | 531038 | 31238 | 165862 | 0.312336 |
| 18.17 | 727200 | 526493 | 26325 | 200707 | 0.381215 |

Tab. 3.2: dati OB di *G.melastomus*. Ctot: numero totale di cellule nell'OB; Ntot: numero totale di neuroni nell'OB; N/mg= rapporto fra Ntot e il peso dell'OB; Ocells: numero totale delle cellule non neuronali presenti nell'OB.; O/N: rapporto fra cellule non neuronali e neuroni nell'OB

| <i>G. melastomus</i> OB data | | | | | |
|------------------------------|---------|---------|-------|--------|----------|
| # | Ctot | Ntot | N/mg | Ocells | O/N |
| 18.1 | 2141200 | 1638018 | 23400 | 503182 | 0.30719 |
| 18.2 | 2035150 | 1483624 | 26975 | 551526 | 0.371742 |
| 18.3 | 1287750 | 825448 | 26627 | 462302 | 0.560062 |
| 18.4 | 848400 | 701627 | 35081 | 146773 | 0.20919 |
| 18.5 | 560550 | 441713 | 36809 | 118837 | 0.269036 |
| 18.6 | 186850 | 149480 | 16609 | 37370 | 0.25 |
| 18.7 | 131300 | 101232 | 20246 | 30068 | 0.297017 |
| 18.8 | 171700 | 128775 | 21463 | 42925 | 0.333333 |
| 18.9 | 535300 | 373639 | 28741 | 161661 | 0.432665 |
| 18.10 | 277750 | 213590 | 30513 | 64160 | 0.30039 |
| 18.11 | 106050 | 66599 | 22200 | 39451 | 0.592357 |

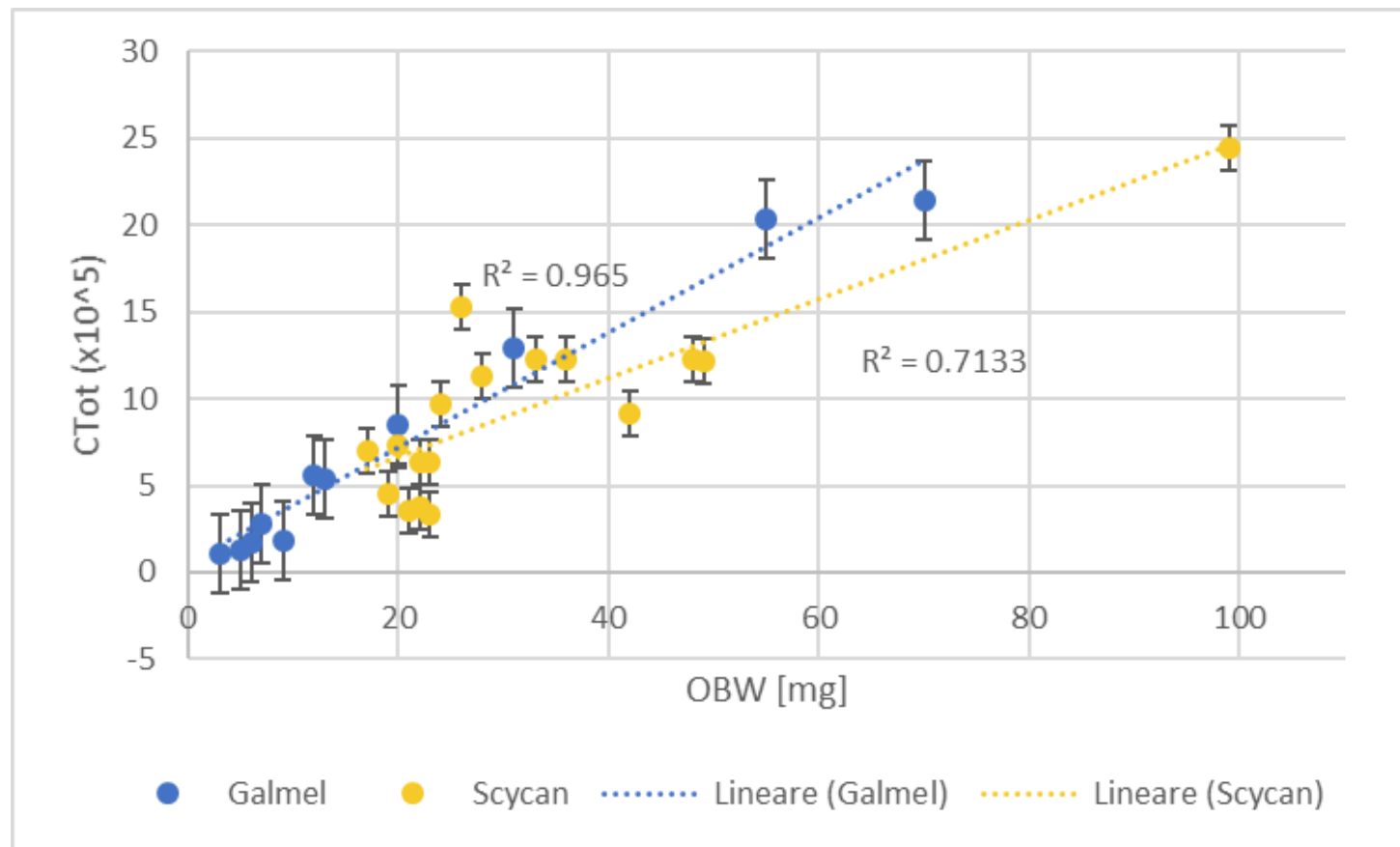
Graph. 3.1: Correlazione fra lunghezza totale e peso del bulbo olfattivo. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili.
Scycan: $r_s = 0.89066$; p-value = 0. Galmel: $r_s = 0.95435$; p-value = $1E-05$.
(TL: lunghezza totale; OBW: peso del bulbo olfattivo)



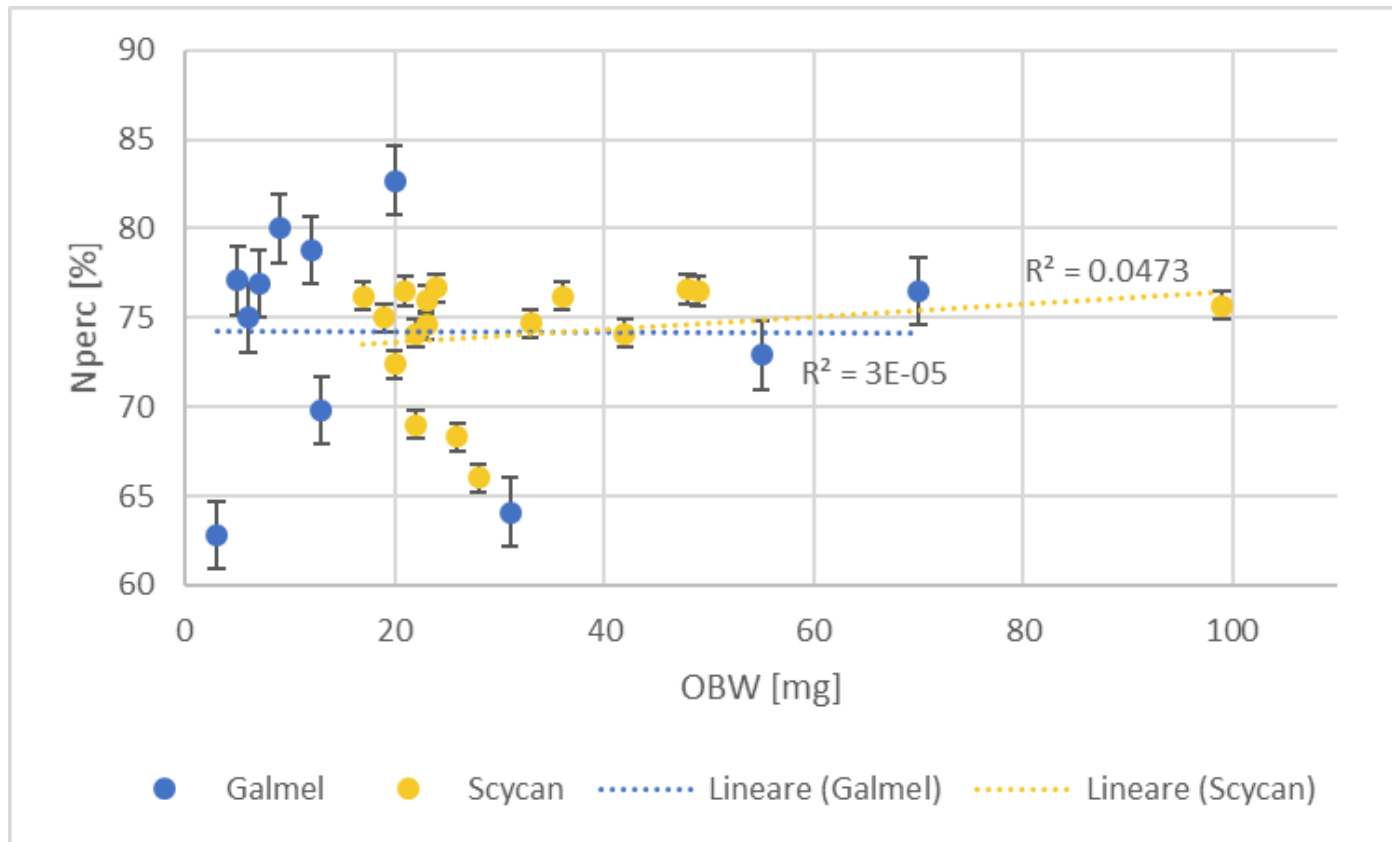
Graph. 3.2 : Correlazione peso del bulbo olfattivo e numero totale di cellule. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili.

Scycan $r_s = 0.75215$; p-value = 0.0005. Galmel: $r_s = 0.98182$; p-value = 0.

(OBW: peso del bulbo olfattivo; Ctot = numero totale di cellule $\times 10^5$)



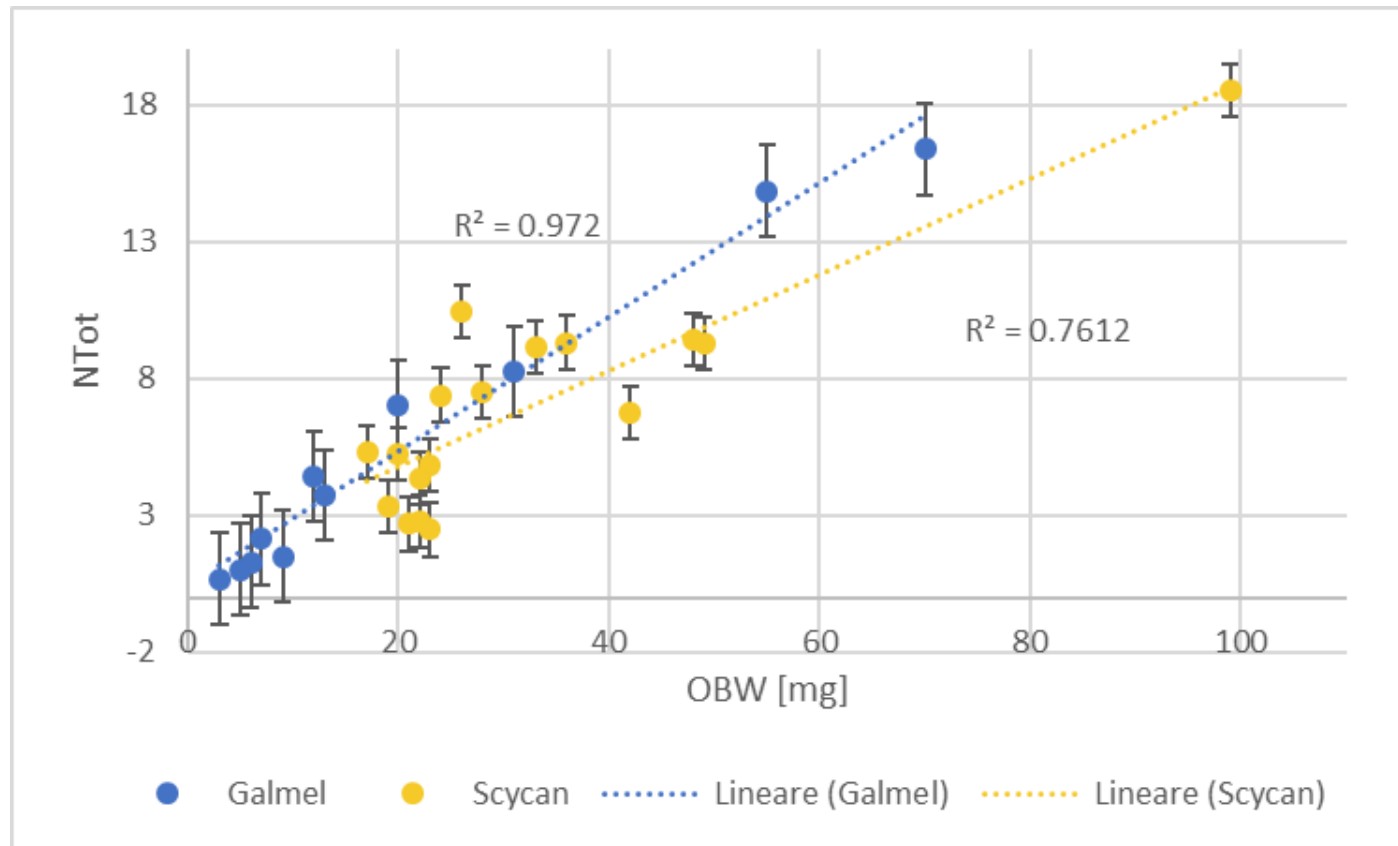
Graph. 3.3 : Correlazione peso del bulbo olfattivo e percentuale dei neuroni. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili.
 Scycan: $r_s = 0.16411$; p-value = 0.5291. Galmel: $r_s = 0.00909$; p-value = 0.97884.
 (OBW: peso del bulbo olfattivo; Nperc: percentuale di neuroni nell'OB)



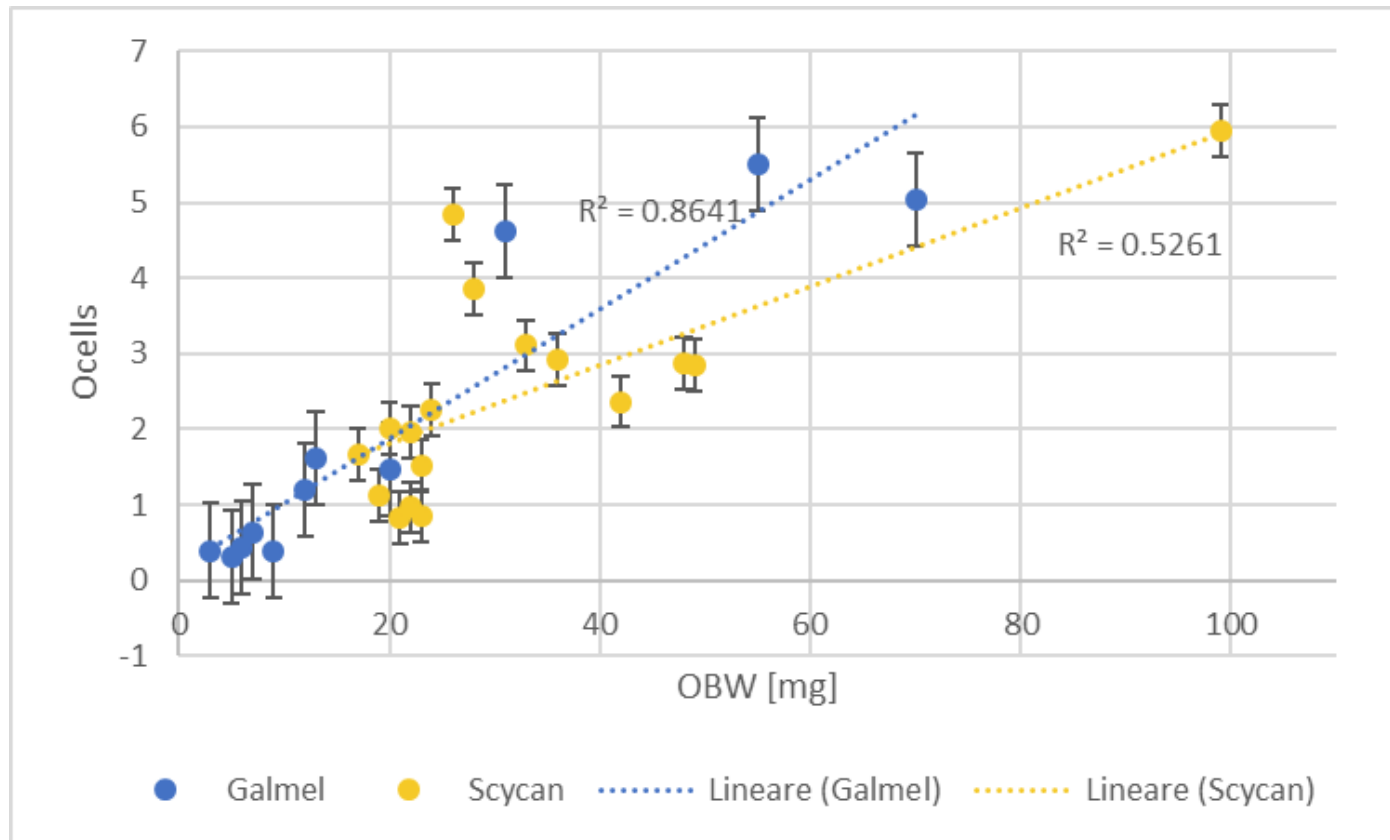
Graph. 3.4 : Correlazione peso del bulbo olfattivo e numero totale di neuroni. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili.

Scycan $r_s = 0.75951$; p-value = 0.00041. Galmel: $r_s = 0.98182$; p-value = 0.

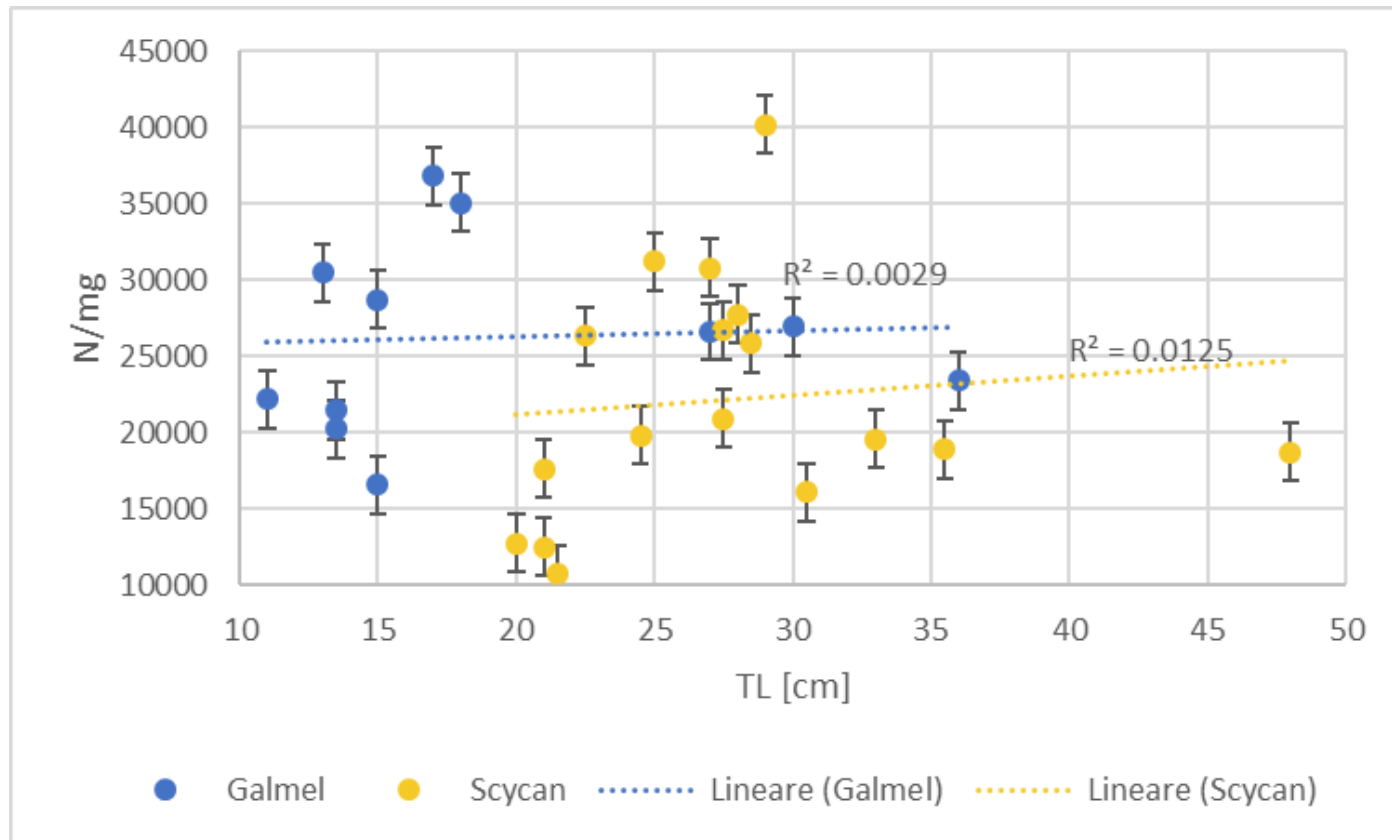
(OBW: peso del bulbo olfattivo; Ntot = numero totale di neuroni $\times 10^5$)



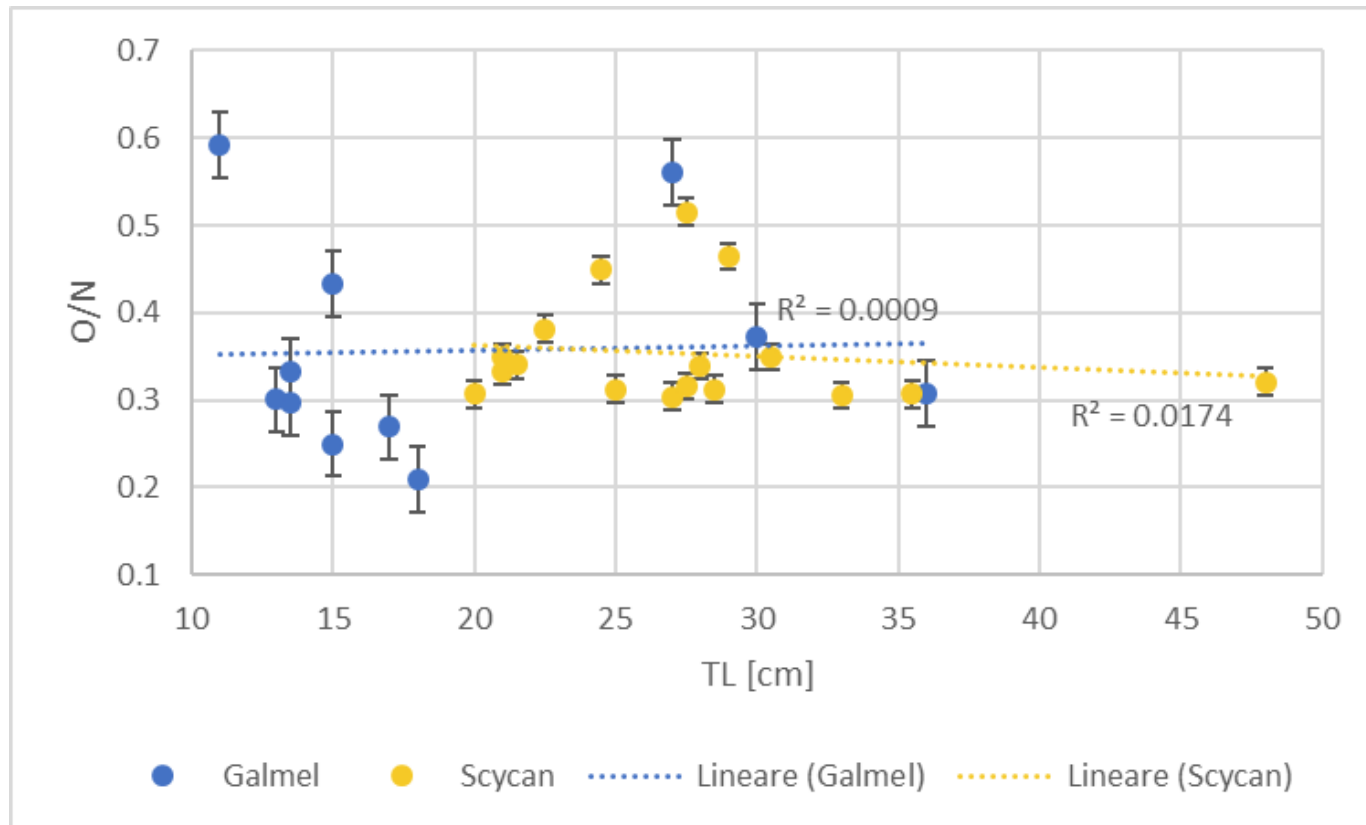
Graph. 3.5 : Correlazione peso del bulbo olfattivo e numero totale di cellule non neuronali. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili. Scycan $r_s = 0.73742$; p-value = 0.00073. Galmel: $r_s = 0.90909$; p-value = 0.00011. (OBW: peso del bulbo olfattivo; Ocells = numero totale di non neuroni $\times 10^5$)



Graph. 3.6 : Correlazione fra lunghezza totale e rapporto fra numero di neuroni e peso del bulbo olfattivo. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili. Scycan $r_s = 0.26748$; p-value = 0.2993. Galmel: $r_s = 0.26484$; p-value = 0.43126. (TL: Lunghezza Totale; N/mg: rapporto fra numero di neuroni e peso OB)



Graph. 3.7 : Correlazione fra lunghezza totale e rapporto fra cellule non neuronali e neuroni nell'OB. Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili. Scycan $r_s = -0.14812$; p-value = 0.57047. Galmel: $r_s = -0.10046$; p-value = 0.76885. (TL: Lunghezza Totale; O/N: rapporto fra numero di non neuroni e neuroni)

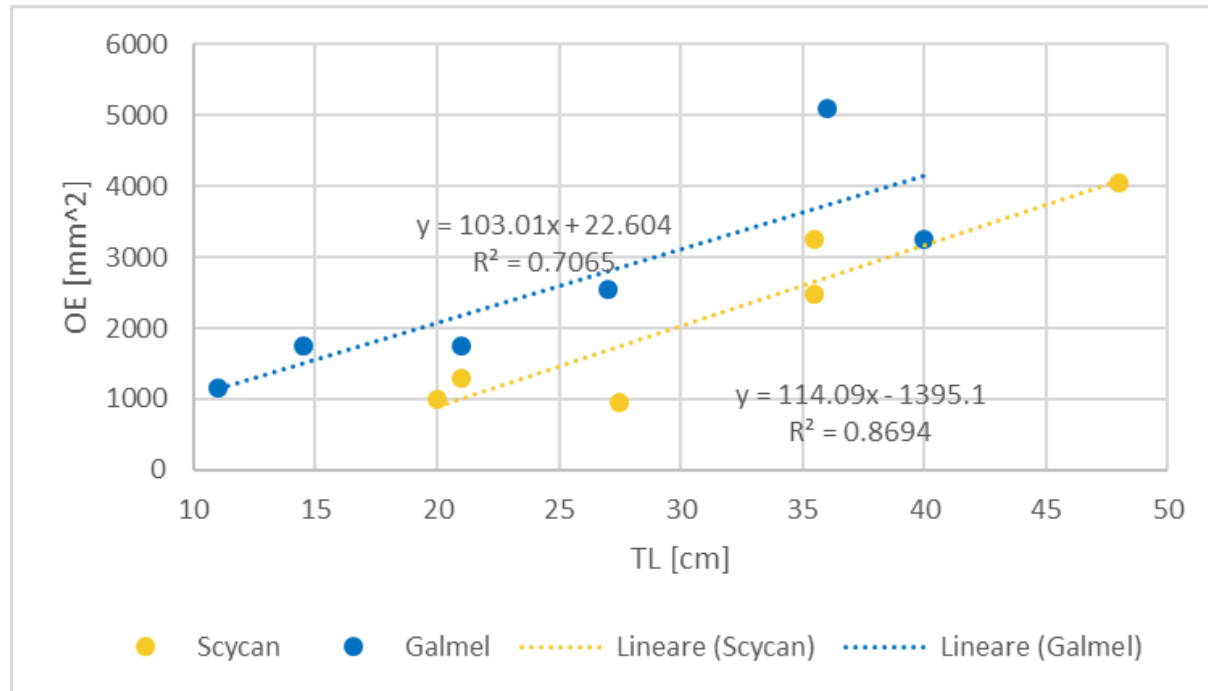


Graph. 3.8 : Calcolo della superficie di epitelio olfattivo (OE). Per una più corretta stima dell'estensione dell'OE associata ai dati sono stati utilizzati esemplari presi casualmente, anche non presenti in questo studio (ma che contenessero il range di taglia dei nostri esemplari). Una volta saggiata la bontà della correlazione fra lunghezza totale e superficie dell'OE grazie all'indice di correlazione di Spearman (r_s), si è calcolata la superficie degli esemplari del presente studio per interpolazione.

Scycan $r_s = 0.81168$; p-value = 0.04986; equazione della retta di regressione; $y = 114.09x - 1395.1$

Galmel: $r_s = 0.92763$; p-value = 0.00767; equazione della retta di regressione; $y = 103.01x + 22.604$;

(TL: Lunghezza Totale; OE: superficie di epitelio olfattivo nella rosetta olfattiva)



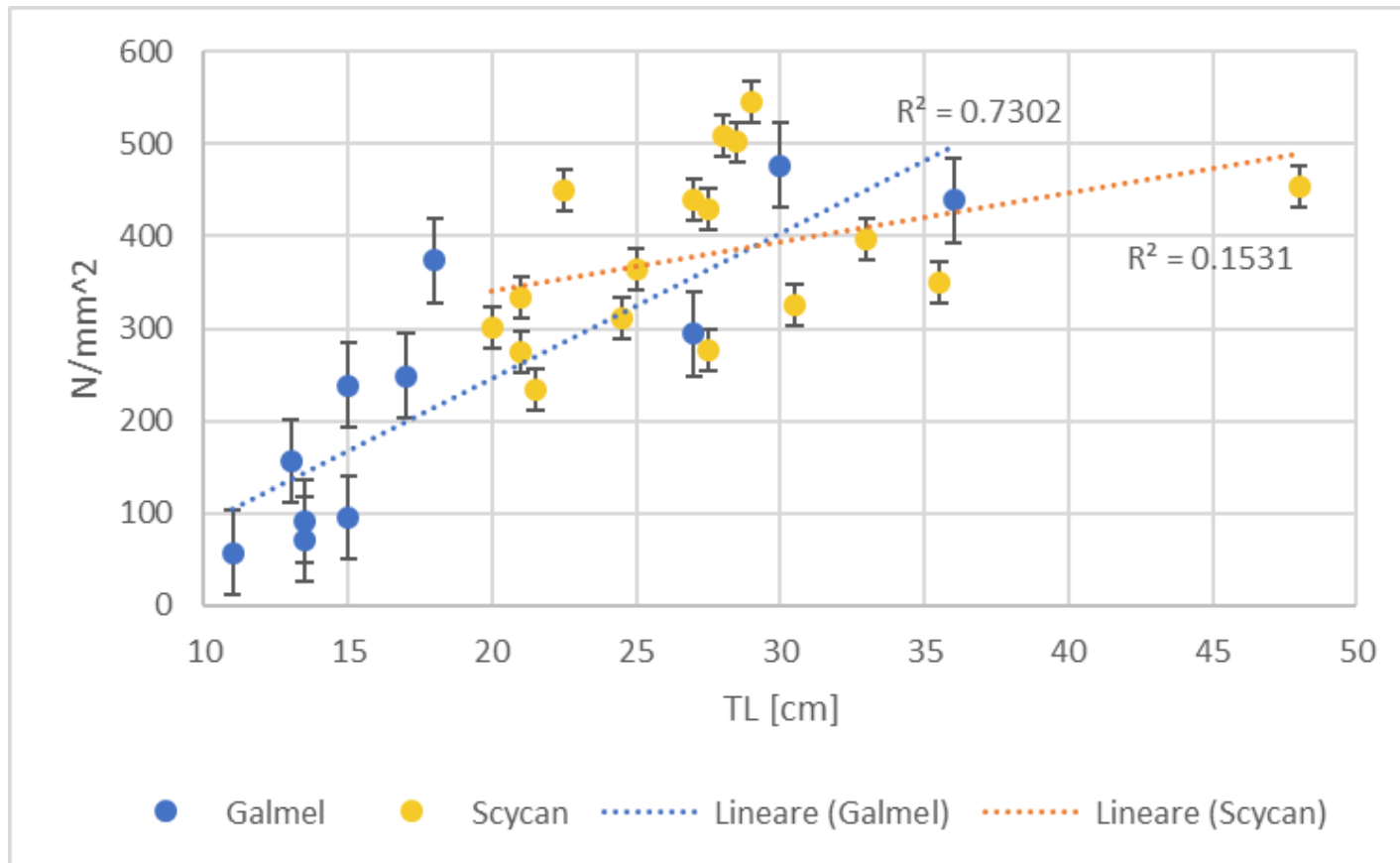
Tab. 3.3 : dati relativi all'epitelio olfattivo di *Scyliorhinus canicula*. Calculated surface OE: superficie di epitelio olfattivo associata all'esemplare calcolata per interpolazione secondo il metodo presente in Graph. 3.8; N/mm²: rapporto fra numero di neuroni nell'OB e superficie dell'OE

| <i>S. canicula</i> OE data | | |
|----------------------------|--|-------------------|
| # | Calculated surface OE [mm ²] | N/mm ² |
| 18.1 | 4081.2 | 453.7 |
| 18.2 | 2369.9 | 396.9 |
| 18.3 | 1000.8 | 334.4 |
| 18.4 | 886.7 | 301.9 |
| 18.5 | 1856.5 | 501.6 |
| 18.6 | 1057.8 | 233.6 |
| 18.7 | 1000.8 | 275.2 |
| 18.8 | 2655.1 | 349.2 |
| 18.9 | 2084.6 | 324.5 |
| 18.10 | 1742.4 | 276.2 |
| 18.11 | 1742.4 | 429.3 |
| 18.12 | 1913.5 | 546.2 |
| 18.13 | 1799.4 | 509.4 |
| 18.14 | 1685.3 | 439.0 |
| 18.15 | 1400.1 | 311.1 |
| 18.16 | 1457.2 | 364.4 |
| 18.17 | 1171.9 | 449.3 |

Tab. 3.4: dati relativi all'epitelio olfattivo di *Galeus melastomus*. Calculated surface OE: superficie di epitelio olfattivo associata all'esemplare calcolata per interpolazione secondo il metodo presente in Graph. 3.8; N/mm²: rapporto fra numero di neuroni nell'OB e superficie dell'OE

| <i>G. melastomus</i> OE data | | |
|------------------------------|--|-------------------|
| # | Calculated surface OE [mm ²] | N/mm ² |
| 18.1 | 3731.0 | 439.0 |
| 18.2 | 3112.9 | 476.6 |
| 18.3 | 2803.9 | 294.4 |
| 18.4 | 1876.8 | 373.8 |
| 18.5 | 1773.8 | 249.0 |
| 18.6 | 1567.8 | 95.3 |
| 18.7 | 1413.2 | 71.6 |
| 18.8 | 1413.2 | 91.1 |
| 18.9 | 1567.8 | 238.3 |
| 18.10 | 1361.7 | 156.9 |
| 18.11 | 1155.7 | 57.6 |

Graph. 3.9 : Correlazione fra lunghezza totale e rapporto fra neuroni nell'OB e superficie dell'epitelio olfattivo (OE). Per ogni serie è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (r_s) al fine di saggiare la bontà della relazione fra variabili. Scycan $r_s = 0.63374$; p-value = 0.02734. Galmel: $r_s = 0.91782$; p-value = 7E-05. (TL: Lunghezza Totale; N/mm²: rapporto fra numero di neuroni nell'OB e superficie dell'OE)



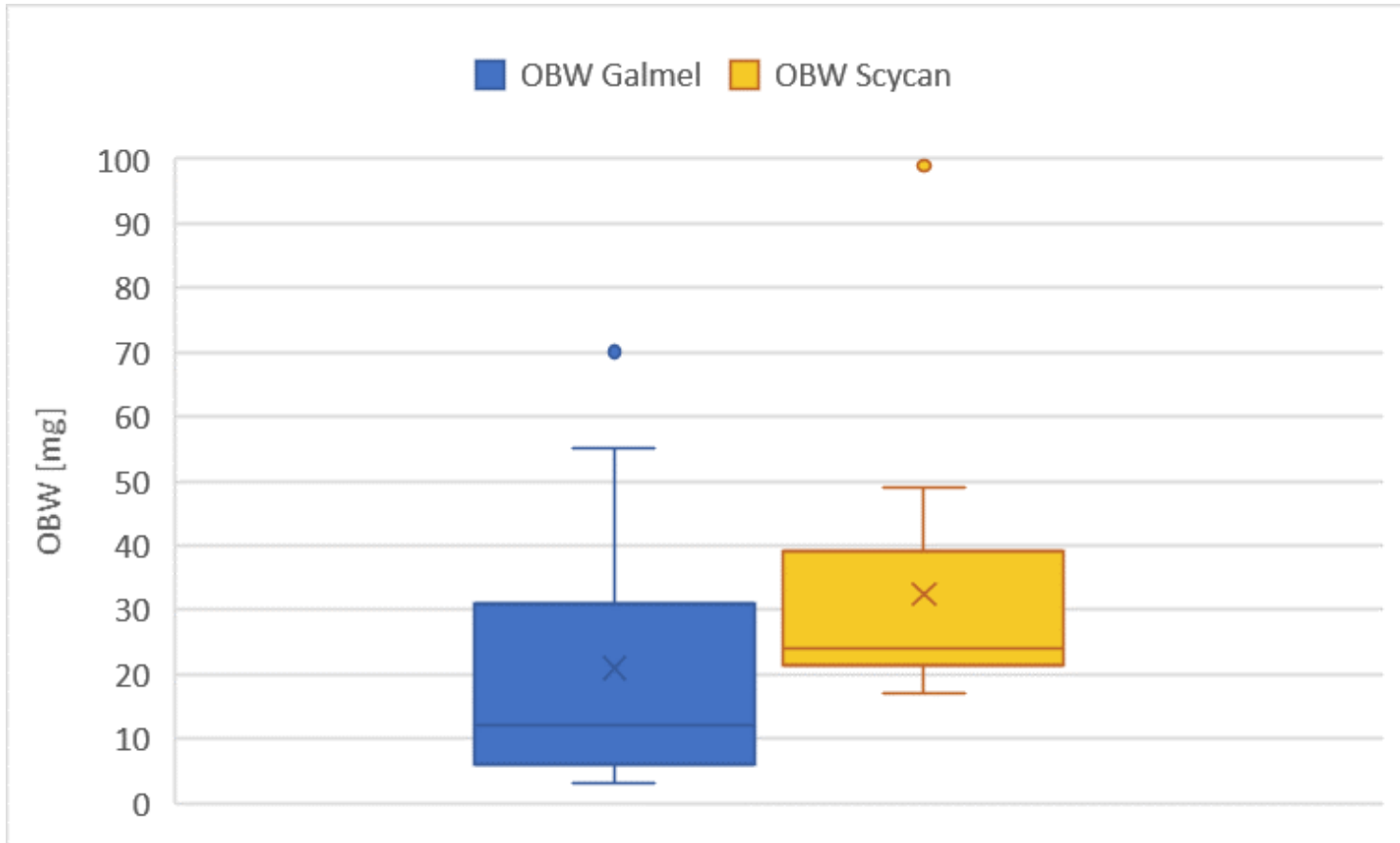
Tab. 3.5: Riassuntivo delle variabili associate a *Scyliorhinus canicula*. (AVG±SE: media della variabile con errore standard associato; MIN: osservazione minima; MAX: osservazione massima; Increase: aumento netto della variabile durante la fascia d'età considerata. TL: lunghezza totale; OBW: peso dell'OB; Ctot: numero di cellule totali nell'OB; N %: percentuale di neuroni calcolata nell'OB; Ntot: numero di neuroni totali nell'OB; Ocells: numero di cellule non neuronali totali nell'OB; N/mg: rapporto fra il numero totale di neuroni nell'OB e il suo peso; O/N: rapporto fra cellule non neuronali e neuroni nell'OB; N/mm²: rapporto fra il numero totale di neuroni nell'OB e la superficie dell'epitelio olfattivo dell'OR.)

| <i>Scyliorhinus canicula</i> | | | | | | | |
|------------------------------|---------|---|--------|-------|-------|----------|-----|
| | AVG | ± | SE | MIN | MAX | Increase | |
| TL [cm] | 28 | ± | 1.7 | 20 | 48 | X | 2.4 |
| OBW [mg] | 32.5 | ± | 4.8 | 17 | 99 | X | 5.8 |
| Ctot (x10 ⁵) | 9.4 | ± | 1.3 | 3.3 | 24.5 | X | 7.4 |
| N% | 74.0 | ± | 0.8 | 66 | 76.7 | X | 1.2 |
| Ntot (x10 ⁵) | 7.0 | ± | 1.0 | 2.5 | 19 | X | 7.5 |
| Ocells (x10 ⁵) | 2.5 | ± | 0.3 | 0.8 | 5.9 | X | 7.2 |
| N/mg | 22154.5 | ± | 1889.7 | 10745 | 40196 | X | 3.7 |
| O/N | 0.35 | ± | 0.02 | 0.30 | 0.52 | X | 1.7 |
| N/mm ² | 382.1 | ± | 22.3 | 233.6 | 546.2 | X | 2.3 |

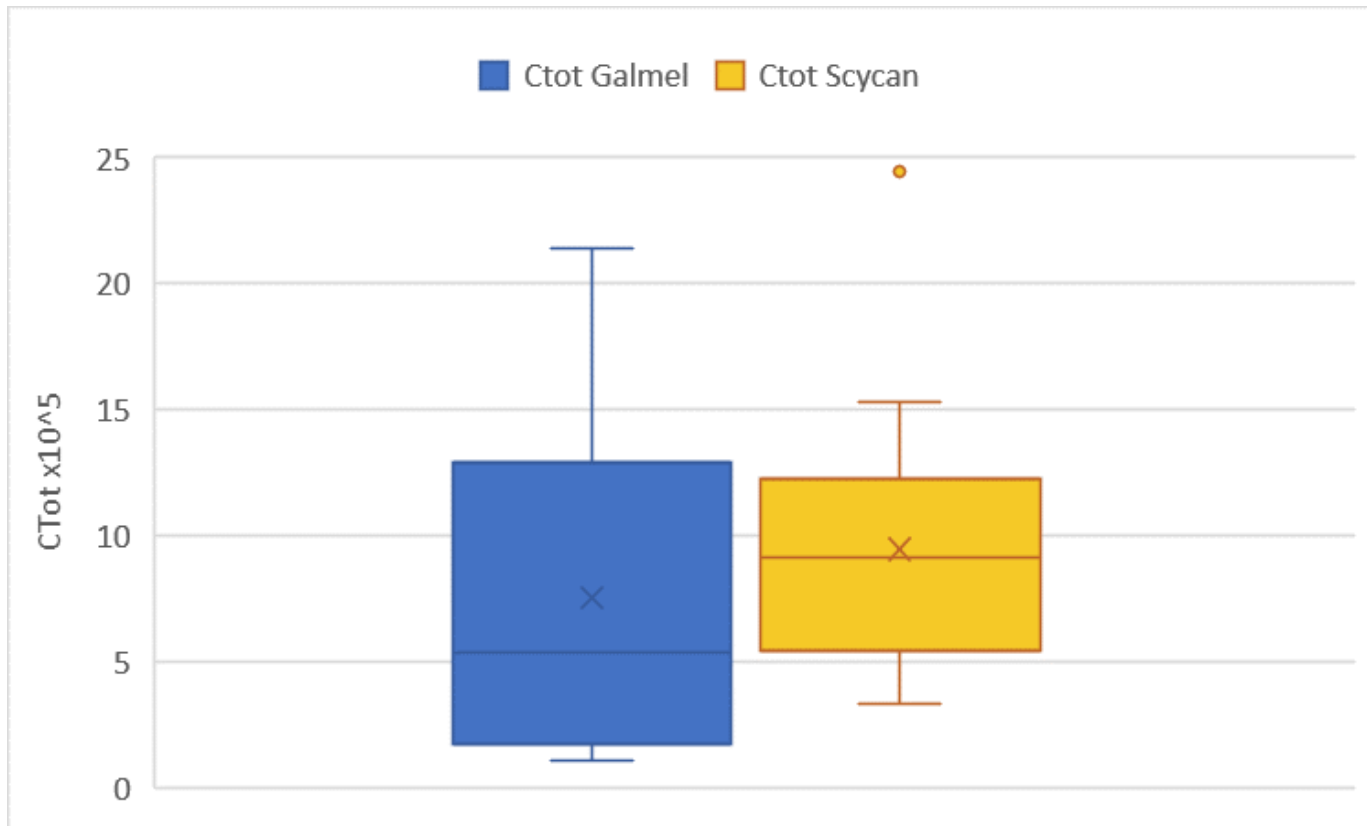
Tab. 3.6: Riassuntivo delle variabili associate a *Galeus melastomus*. (AVG±SE: media della variabile con errore standard associato; MIN: osservazione minima; MAX: osservazione massima; Increase: aumento netto della variabile durante la fascia d'età considerata. TL: lunghezza totale; OBW: peso dell'OB; Ctot: numero di cellule totali nell'OB; N %: percentuale di neuroni calcolata nell'OB; Ntot: numero di neuroni totali nell'OB; Ocells: numero di cellule non neuronali totali nell'OB; N/mg: rapporto fra il numero totale di neuroni nell'OB e il suo peso; O/N: rapporto fra cellule non neuronali e neuroni nell'OB; N/mm²: rapporto fra il numero totale di neuroni nell'OB e la superficie dell'epitelio olfattivo dell'OR.)

| <i>Galeus melastomus</i> | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---|--------|-------|-------|----------|------|
| | AVG | ± | SE | MIN | MAX | Increase | |
| TL [cm] | 19 | ± | 2.5 | 11 | 36 | X | 3.3 |
| OBW [mg] | 21 | ± | 6.7 | 3 | 70 | X | 23.3 |
| Ctot (x10 ⁵) | 7.5 | ± | 2.3 | 1.1 | 21.4 | X | 20.2 |
| N% | 74.2 | ± | 1.9 | 62.8 | 82.7 | X | 1.3 |
| Ntot (x10 ⁵) | 5.6 | ± | 1.7 | 0.7 | 16 | X | 24.6 |
| Ocells (x10 ⁵) | 2.0 | ± | 0.6 | 0.3 | 5.5 | X | 18.3 |
| N/mg | 26242.3 | ± | 1885.3 | 16609 | 36809 | X | 2.2 |
| O/N | 0.36 | ± | 0.04 | 0.2 | 0.6 | X | 2.8 |
| N/mm ² | 231.3 | ± | 45.5 | 58 | 477 | X | 8.3 |

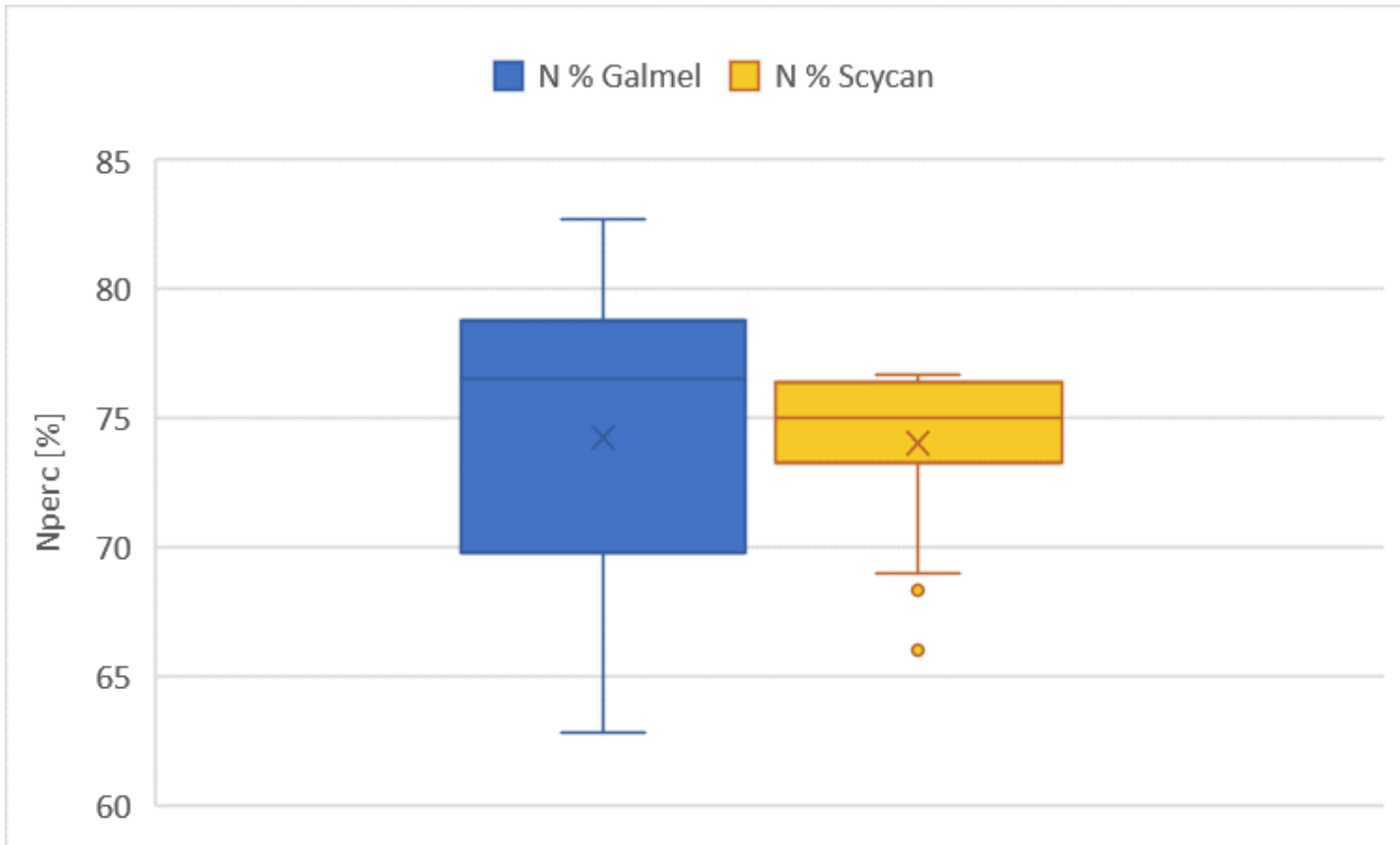
Graph. 3.10: Test U di Mann-Whitney sul peso del bulbo olfattivo (OBW); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 45.5$; $p\text{-value} = 0.02574$.



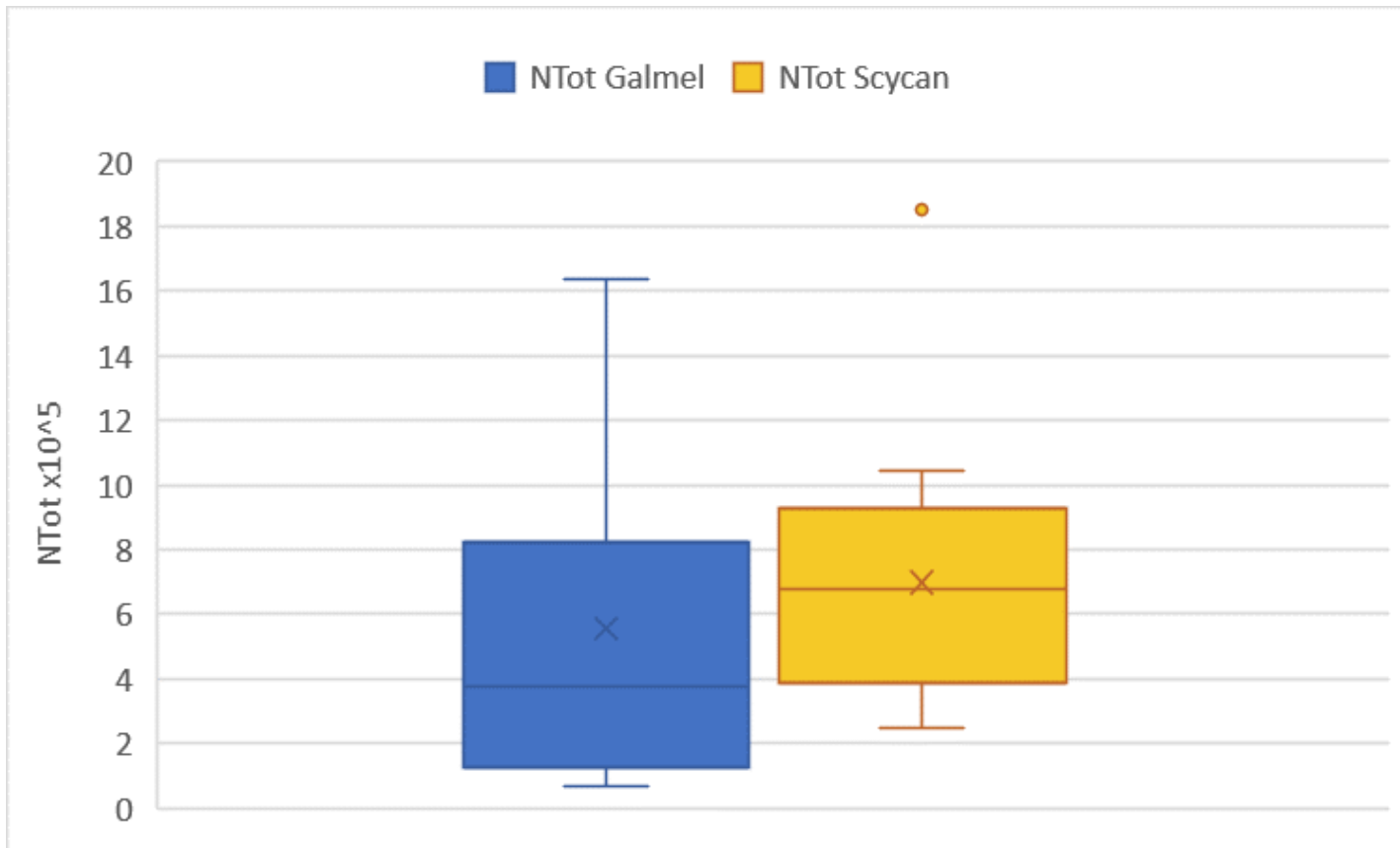
Graph. 3.11: Test U di Mann-Whitney sul numero totale di cellule nell'OB (CTot); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 63$; p-value = 0.15854.



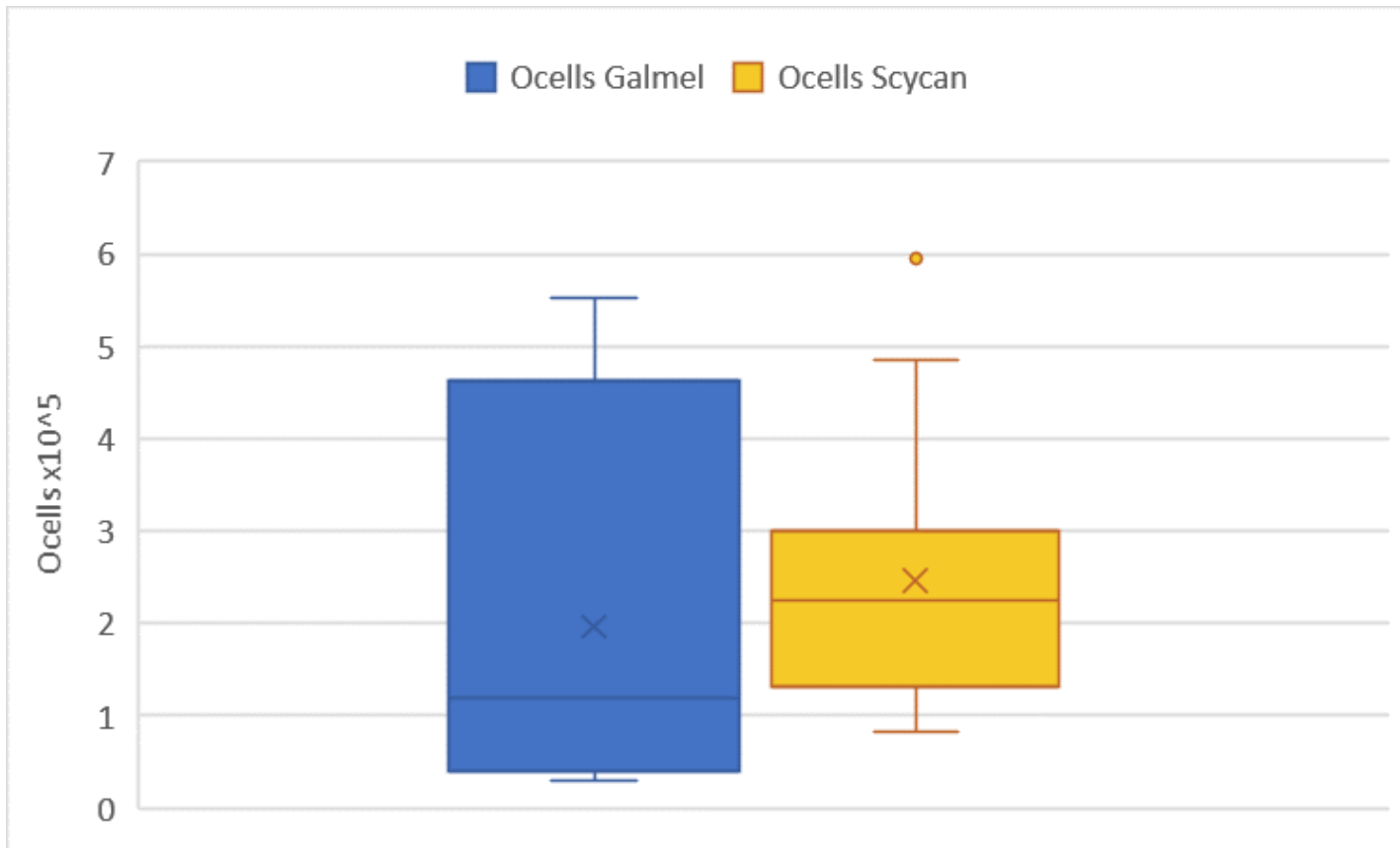
Graph. 3.12: Test U di Mann-Whitney sulla percentuale di neuroni nell'OB (Nperc); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 72.5$; $p\text{-value} = 0.33706$.



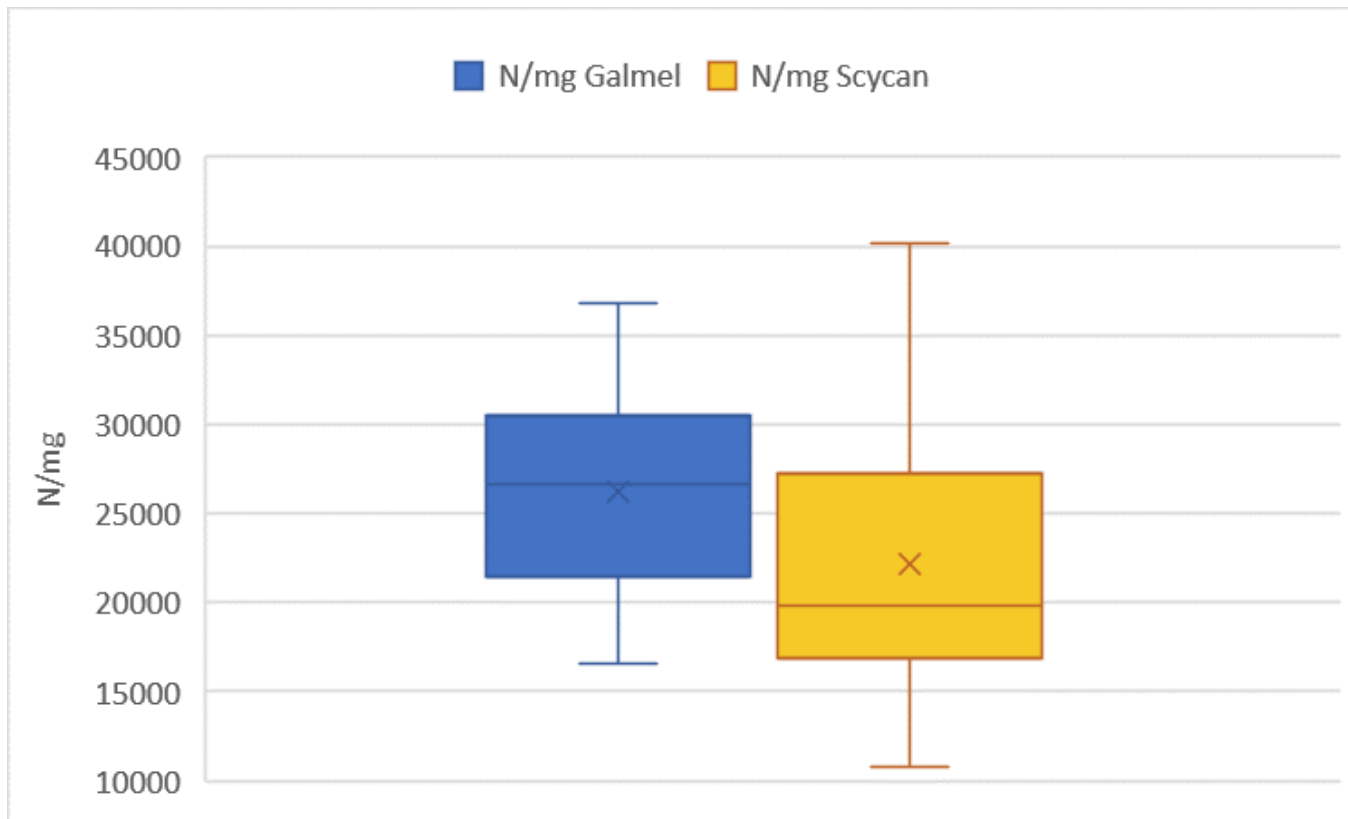
Graph. 3.13: Test U di Mann-Whitney sul numero totale di neuroni nell'OB (NTot); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 61$; p-value = 0.13104.



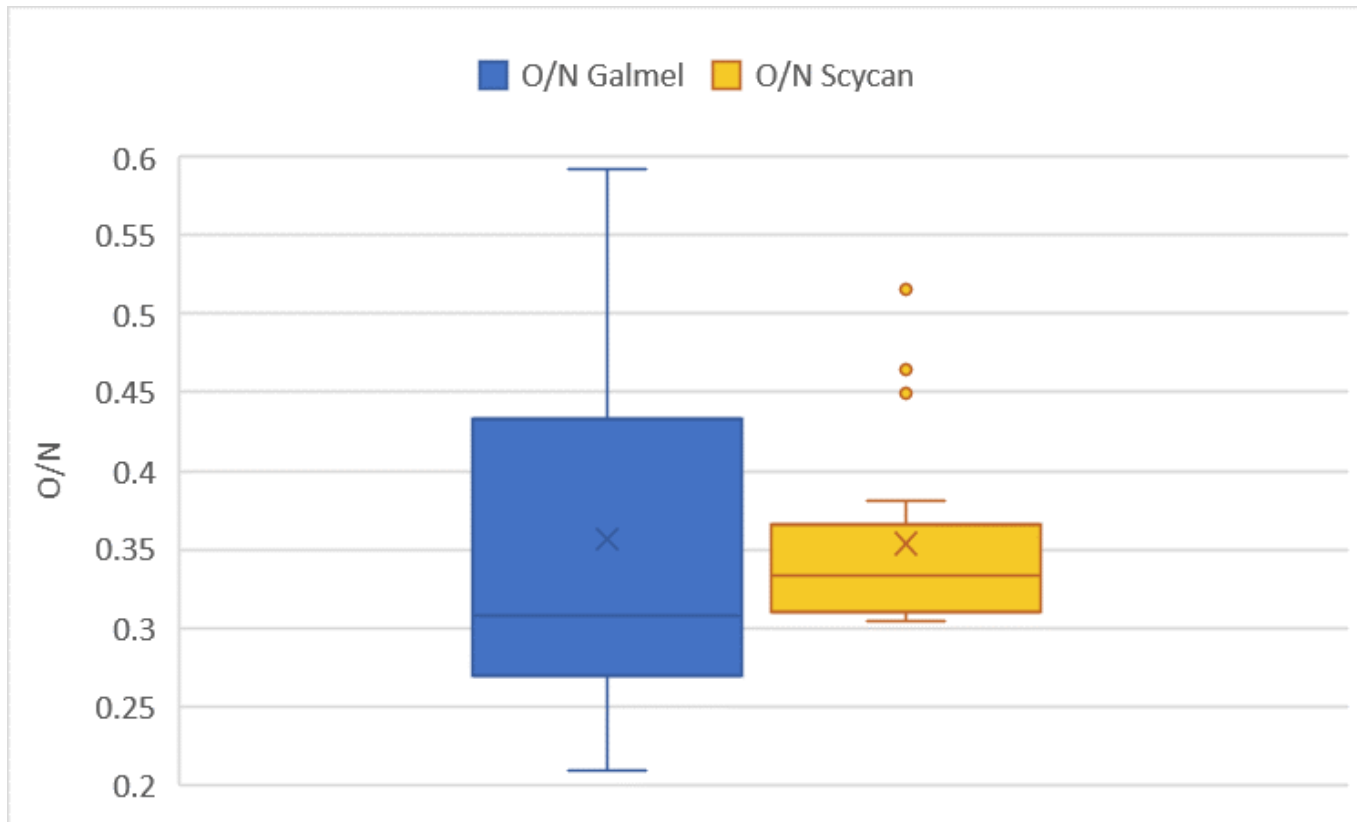
Graph. 3.14: Test U di Mann-Whitney sul numero totale di non neuroni nell'OB (Ocells); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 60$; p-value = 0.12114.



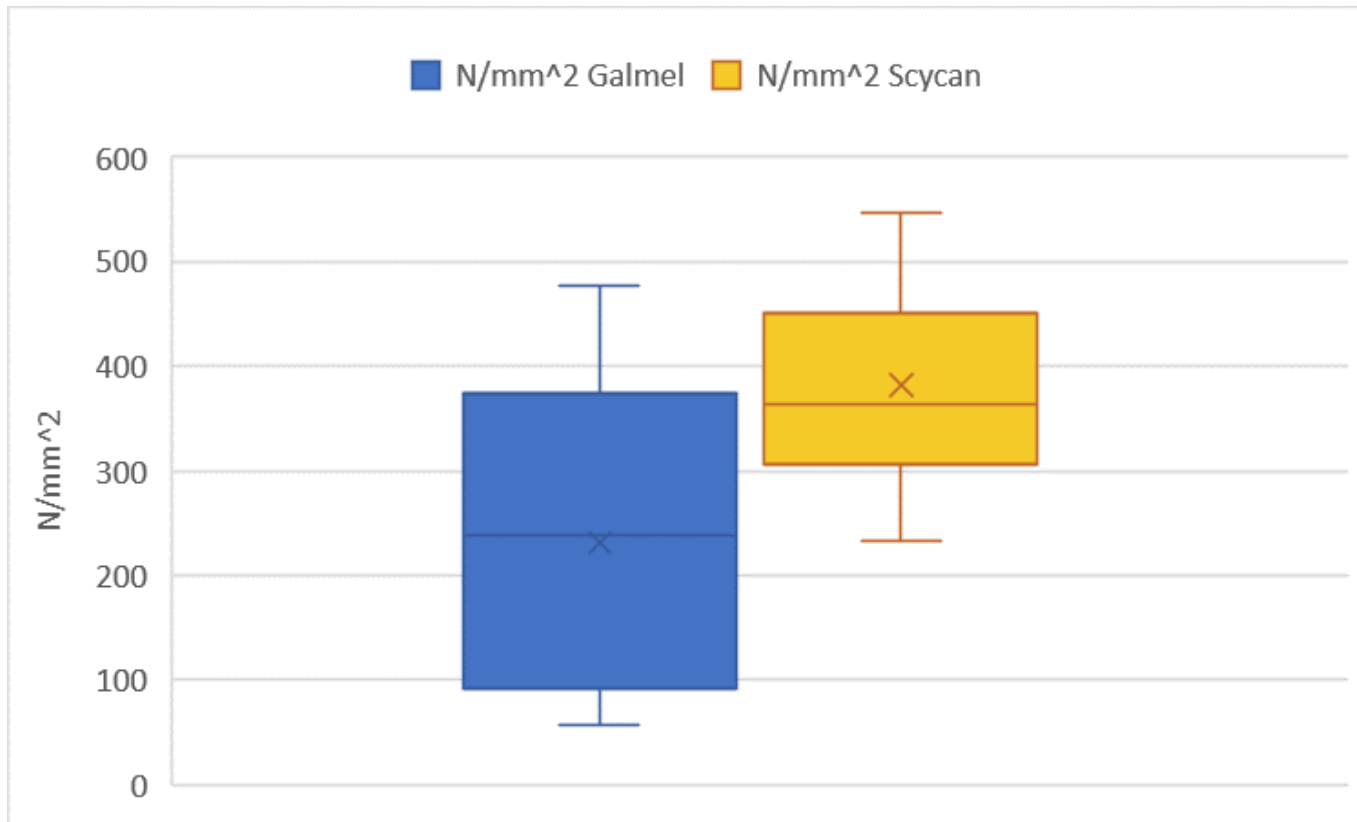
Graph. 3.15: Test U di Mann-Whitney sul rapporto fra numero di neuroni e peso del bulbo olfattivo (N/mg); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 59$; p-value = 0.1096.



Graph. 3.16: Test U di Mann-Whitney sul e rapporto fra cellule non neuronali e neuroni nell'OB (O/N); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 72.5$; p-value = 0.33706.



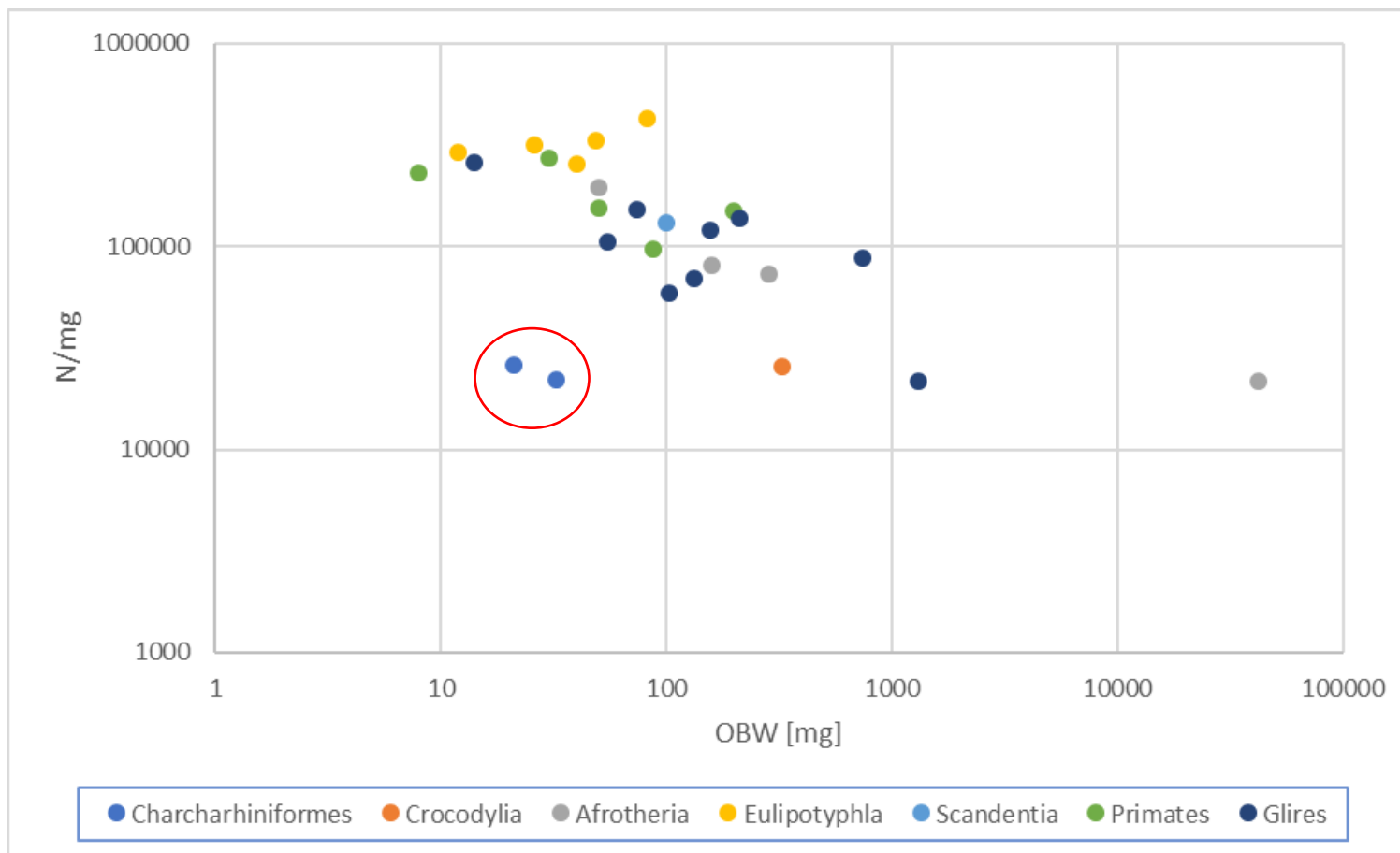
Graph. 3.17: Test U di Mann-Whitney sul e rapporto fra neuroni nell'OB e superficie dell'epitelio olfattivo (N/mm^2); IPOTESI: H_0 : le differenze sono dovute al caso; H_1 : la variabile «specie» spiega le differenze riscontrate. Rigetto dell'ipotesi nulla quando $U < U_{critico}$ con $\alpha=0.05$. (in questo caso $U_{critico} = 51$). $U = 35$; p-value = 0.00634.



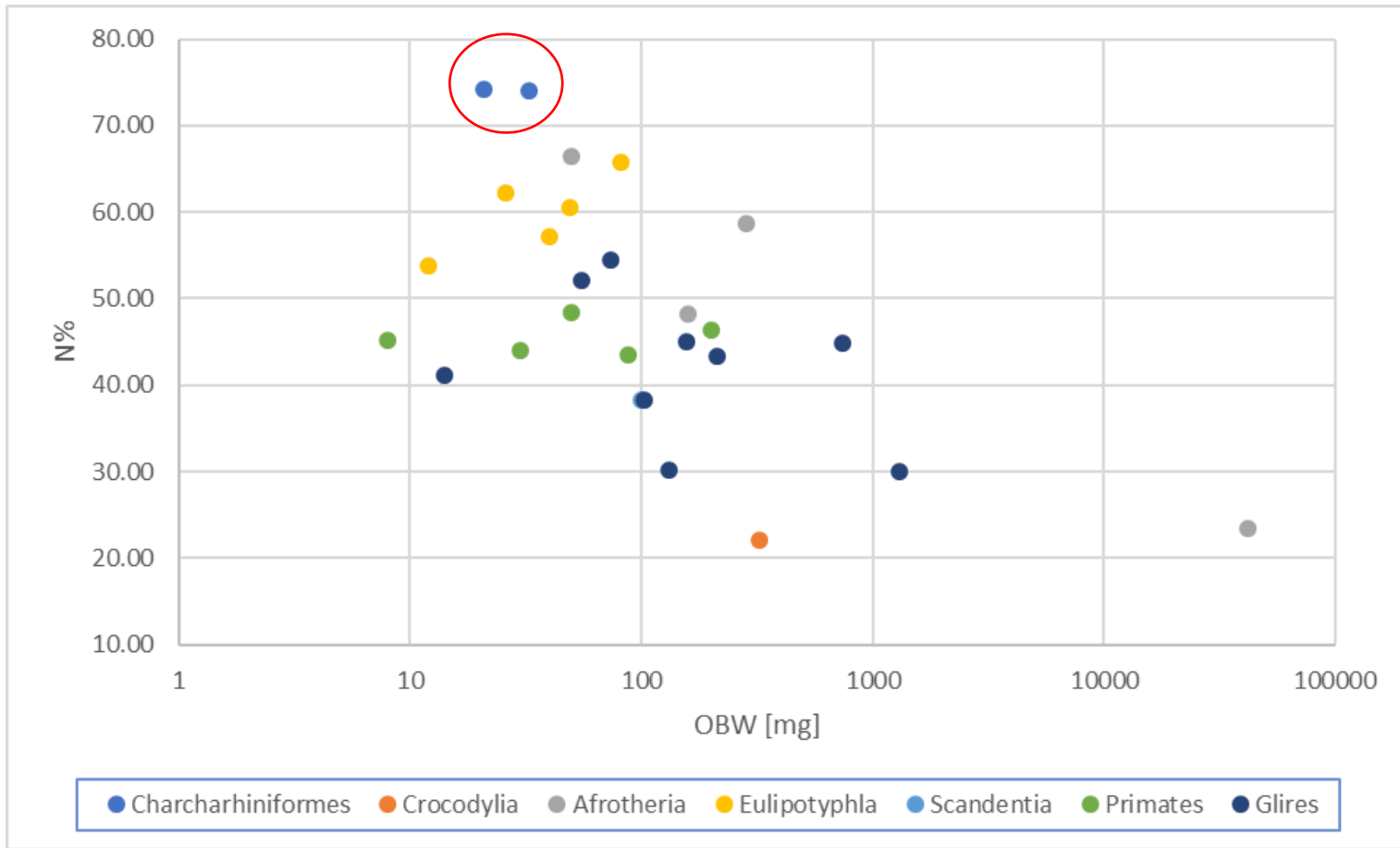
Tab 4.1.: comparativo fra i dati del presente studio e i dati presenti in letteratura. (i dati sono stati adeguati alle u. M. utilizzate)

| Clade | Species | OBW [mg] | Ntot | N/mg | Ocells | N% | O/N | References |
|--------------------|----------------------------------|----------|--------|----------|---------|-------|------|--------------------------------|
| Charcharhiniformes | <i>Galeus melastomus</i> | 21 | 0.56 | 26242.3 | 0.19 | 74.20 | 0.35 | present study |
| | <i>Scyliorhinus canicula</i> | 32.5 | 0.7 | 22154.48 | 0.25 | 74.00 | 0.35 | |
| Crocodylia | <i>Crocodylus niloticus</i> | 324 | 6.01 | 25661 | 21.31 | 22.00 | 3.55 | Ngwenya et al., 2016 |
| Afrotheria | <i>Loxodonta africana</i> | 41900 | 908.37 | 21687 | 2973.55 | 23.40 | 3.27 | Herculano-Houzel et al., 2014b |
| | <i>Petrodomus tetradactylus</i> | 159 | 12.83 | 80805 | 13.79 | 48.20 | 1.07 | |
| | <i>Elephantulus myurus</i> | 50 | 9.69 | 194678 | 4.88 | 66.50 | 0.50 | |
| | <i>Procavia capensis</i> | 286 | 20.91 | 73110 | 14.77 | 58.60 | 0.71 | |
| Eulipotyphla | <i>Sorex fumeus</i> | 12 | 3.33 | 289806 | 2.86 | 53.80 | 0.86 | |
| | <i>Blarina brevicauda</i> | 26 | 8.09 | 318164 | 4.92 | 62.20 | 0.61 | |
| | <i>Parascalops breweri</i> | 49 | 16.75 | 333590 | 10.94 | 60.50 | 0.65 | |
| | <i>Condylura cristata</i> | 40 | 10.55 | 254720 | 7.93 | 57.10 | 0.75 | |
| | <i>Scalopus aquaticus</i> | 82 | 34.61 | 423520 | 17.99 | 65.80 | 0.52 | |
| Scandentia | <i>Tupaia glis</i> | 100 | 12.7 | 130173 | 20.46 | 38.30 | 1.61 | |
| Primates | <i>Microcebus murinus</i> | 30 | 7.64 | 270894 | 9.72 | 44.00 | 1.27 | Ribeiro et al., 2014 |
| | <i>Callithrix jacchus</i> | 8 | 2.11 | 232309 | 2.56 | 45.20 | 1.21 | |
| | <i>Otolemur garnetti</i> | 200 | 30.24 | 149219 | 35.07 | 46.30 | 1.16 | |
| | <i>Aotus trivirgatus</i> | 50 | 7.92 | 155879 | 8.44 | 48.40 | 1.07 | |
| | <i>Macaca mulatta</i> | 88 | 8.47 | 96293 | 11.00 | 43.50 | 1.30 | |
| Glires | <i>Mus musculus</i> | 14 | 3.89 | 257475 | 5.57 | 41.10 | 1.43 | |
| | <i>Mesocricetus auratus</i> | 55 | 5.75 | 105418 | 5.29 | 52.10 | 0.92 | |
| | <i>Rattus norvegicus</i> | 74 | 11.1 | 152373 | 9.30 | 54.40 | 0.84 | |
| | <i>Proechimys cayennensis</i> | 132 | 9.14 | 69254 | 21.12 | 30.20 | 2.31 | |
| | <i>Cavia porcellus</i> | 103 | 6.06 | 58560 | 9.80 | 38.20 | 1.62 | |
| | <i>Sciurus carolinensis</i> | 212 | 28.84 | 137532 | 37.61 | 43.40 | 1.30 | |
| | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 156 | 18.76 | 120288 | 22.93 | 45.00 | 1.22 | |
| | <i>Dasyprocta primnolopha</i> | 737 | 58.12 | 88008 | 71.32 | 44.90 | 1.23 | |
| | <i>Hydrochoerus hydrochoeris</i> | 1302 | 28.56 | 21864 | 66.64 | 30.00 | 2.33 | |

Graph. 4.1: Comparativo fra le variabili OBW e N/mg fra i dati del presente studio (nel cerchio rosso) e i dati già presenti in letteratura. Gli assi sono stati settati in scala logaritmica per una miglior distribuzione dei dati.

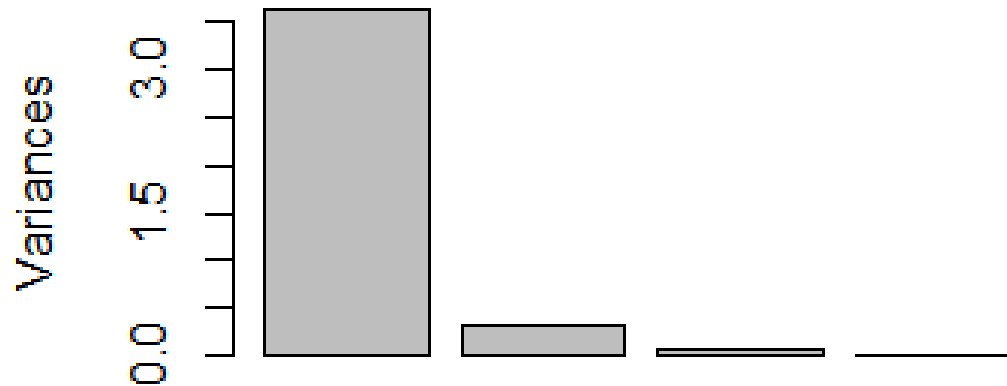


Graph. 4.2: Comparativo fra le variabili OBW e Nperc fra i dati del presente studio (nel cerchio rosso) e i dati già presenti in letteratura. L'asse delle x è stato settato in scala logaritmica per una miglior distribuzione dei dati.



Graph. 4.3: Valori e varianza delle variabili relative ai quattro assi della PCA. Come si evince dal grafico, la quasi totalità della varianza è spiegata dall'asse orizzontale PC1.

| | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 |
|-------------------|----------|----------|----------|-----------|
| CTot | -0.5198 | -0.26065 | -0.21493 | 7.85E-01 |
| NTot | -0.51519 | -0.25254 | -0.57545 | -5.83E-01 |
| Ocells | -0.50918 | -0.27132 | 0.78896 | -2.11E-01 |
| N/mm ² | -0.45291 | 0.891442 | 0.014265 | -5.55E-17 |



Graph. 4.4: Analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi è stata condotta su quattro variabili: Ctot, Ntot, Ocells, N/mm². Le differenti dimensioni delle silhouette indicano una maggiore presenza della corrispondente preda nella dieta degli animali

