



**Università  
di Genova**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

---

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,  
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)  
Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in  
Biologia ed Ecologia Marina

**Il bulbo olfattivo dei condroitti:  
prima mappatura dei glomeruli in  
*Scyliorhinus canicula***

Laureando:  
Christian Discepoli

Relatore:  
Prof. Sara Ferrando  
Correlatore:  
Prof. Federico Betti

ANNO ACCADEMICO 2024-2025



## RIASSUNTO/ABSTRACT

Il sistema olfattivo dei vertebrati comprende un neuroepitelio sensoriale i cui neuroni hanno una parte dendritica per la ricezione degli odoranti e una porzione assonica che forma il nervo olfattivo, afferendo alla regione telencefalica detta bulbo olfattivo. Qui gli assoni confluiscono a porzioni tondeggianti di sostanza bianca dette glomeruli. Generalmente, l'afferenza è chemotopica, cioè si riuniscono in uno o pochi glomeruli gli assoni di neuroni che esprimono lo stesso recettore olfattivo. I recettori olfattivi sono recettori sette volte transmembrana associati a proteine G eterotrimeriche e fanno parte di una famiglia di proteine che è una delle più numerose nei vertebrati. Il numero di glomeruli nel bulbo olfattivo di una certa specie dovrebbe essere compreso tra il numero di recettori olfattivi di quella specie e circa il doppio o triplo di questo numero. La classe dei condroitti è caratterizzata da un numero particolarmente basso di recettori olfattivi nel genoma. In particolare, nella specie *Scyliorhinus canicula* sono al massimo 40 i geni che potrebbero essere espressi nell'epitelio olfattivo e pertanto i glomeruli attesi nel bulbo olfattivo di questa specie dovrebbero essere 40-120. Scopo di questa tesi è stato, usando tecniche istologiche e analisi di immagine: verificare il numero di glomeruli in tre esemplari di *S. canicula*, dare una descrizione istologica e quantitativa del loro aspetto e organizzazione, verificare se la distribuzione sia o meno stereotipata in diversi individui. Il numero di glomeruli in *S. canicula* è circa 410. Le dimensioni dei vari glomeruli sono molto diverse. Ciascuno dei 4-5 glomeruli più grandi è, in volume, circa lo 0.5-1% della porzione glomerulare del bulbo. La posizione dei glomeruli, almeno quelli più riconoscibili è abbastanza stereotipata (in alcuni casi sembra però che quello che appare come un glomerulo in un esemplare possa essere rappresentato, in un altro esemplare, da due o tre glomeruli particolarmente vicini). Questo ha portato a ipotizzare l'esistenza di "cluster" glomerulari, raggruppamenti anatomicamente riconoscibili. Ne sono stati identificati 30, successivamente mappati in 3D. Questo studio dimostra che *S. canicula* possiede un numero di glomeruli molto più alto del previsto e una distribuzione stereotipata, ma complessa. L'introduzione del concetto di cluster aiuta a semplificare l'interpretazione di questa complessità, ma andrà validato con marcatori specifici e su un numero maggiore di esemplari. Che il sistema olfattivo dei condroitti sfugga

quantitativamente alle regole viste per altri vertebrati è già noto, nel nostro laboratorio (Laboratorio di Anatomia Comparata del DiSTAV) abbiamo già dimostrato come il basso numero di recettori si scontri con dimensione e complessità dell'organo olfattivo periferico di questi pesci. Anche il bulbo olfattivo, con un notevole numero di glomeruli, non rispecchia il modesto arsenale molecolare che caratterizza la chemorecezione di questa classe di vertebrati.

## **ABSTRACT**

The vertebrate olfactory system comprises a sensory neuroepithelium whose neurons possess a dendritic portion for the reception of odorants and an axonal portion that forms the olfactory nerve, projecting to the telencephalic region known as the olfactory bulb. Within the bulb, axons converge into rounded areas of white matter called glomeruli. Typically, this afferent input is chemotopic, meaning that axons from neurons expressing the same olfactory receptor tend to converge into one or a few glomeruli. Olfactory receptors are seven-transmembrane domain proteins associated with heterotrimeric G proteins and belong to one of the largest protein families in vertebrates. The number of glomeruli in the olfactory bulb of a given species is generally expected to range between the number of olfactory receptors and approximately two to three times that number. The class Chondrichthyes is characterized by a particularly low number of olfactory receptor genes in the genome. Specifically, in the species *Scyliorhinus canicula*, no more than 40 genes are potentially expressed in the olfactory epithelium, and thus the expected number of glomeruli in the olfactory bulb should range between 40 and 120.

The aim of this thesis was, using histological techniques and image analysis, to: determine the number of glomeruli in three specimens of *S. canicula*, provide a histological and quantitative description of their morphology and organization, and assess whether their distribution is stereotyped across individuals. The number of glomeruli in *S. canicula* is approximately 410. The size of individual glomeruli varies considerably. Each of the 4–5 largest glomeruli accounts for approximately 0.5–1% of the total volume of the glomerular portion of the bulb. The position of the glomeruli, at least of the most recognizable ones, appears to

be fairly stereotyped (although in some cases, what appears as a single glomerulus in one specimen may correspond to two or three closely adjacent glomeruli in another). This led to the hypothesis of anatomically recognizable glomerular “clusters.” Thirty such clusters were identified and subsequently mapped in 3D.

This study demonstrates that *S. canicula* possesses a significantly higher number of glomeruli than expected, with a stereotyped yet complex distribution. The introduction of the concept of clusters helps simplify the interpretation of this complexity, although it requires validation through specific markers and a larger number of specimens. That the olfactory system of chondrichthyans quantitatively deviates from the patterns observed in other vertebrates is already known; in our laboratory (Comparative Anatomy Laboratory at DiSTAV), we have previously shown how the low number of receptors contrasts with the size and complexity of the peripheral olfactory organ in these fishes. Similarly, the olfactory bulb, with its substantial number of glomeruli, does not reflect the modest molecular repertoire that characterizes chemoreception in this vertebrate class.

# INDICE

INTRODUZIONE .....	6
Anatomia del sistema olfattivo dei vertebrati .....	6
Recettori olfattivi .....	15
Relazione tra l'anatomia del sistema olfattivo e i recettori.....	15
I Condroitti.....	16
<i>Scyliorhinus canicula</i> (Linnaeus, 1758) .....	16
Sistema olfattivo dei condroitti.....	18
Sistema olfattivo <i>S. canicula</i> .....	20
Recettori olfattivi nei condroitti.....	22
SCOPO DELLA TESI .....	23
MATERIALI E METODI .....	24
Campionamento e fissazione .....	24
Tecniche istologiche .....	24
Osservazione e fotografia .....	26
Conta e mappatura dei glomeruli.....	27
Calcolo volumi.....	27
Conta e mappatura cluster .....	28
Ricostruzione tridimensionale dei cluster.....	29
RISULTATI.....	30
Osservazioni macroscopiche .....	30
Osservazioni istologiche.....	30
Analisi quantitative.....	34
Confronto tra i bulbi di due esemplari .....	35
Misura dei glomeruli.....	37
Conta dei cluster .....	38
DISCUSSIONE .....	43
CONCLUSIONI .....	49
BIBLIOGRAFIA .....	50
RINGRAZIAMENTI.....	57

# INTRODUZIONE

## **Anatomia del sistema olfattivo dei vertebrati**

La capacità di percepire stimoli di natura chimica è una caratteristica comune a tutti gli esseri viventi, dai più semplici ai più complessi, anche se spesso può risultare difficile stabilire in quali casi sia corretto parlare di un vero e proprio senso dell'olfatto paragonabile a quello osservato nei vertebrati. Nei vertebrati, l'organo olfattivo è localizzato nelle cavità nasali e, dal punto di vista strutturale, può presentarsi, a seconda della classe ma con differenze anche a livello di singola specie, come una semplice superficie sensoriale che riveste una parte della cavità nasale, oppure come un organo complesso e morfologicamente elaborato. Nei pesci, quando l'organo è complesso, troviamo lamelle che possono sollevarsi direttamente dalle pareti della cavità nasale o che sono sorrette da un supporto centrale chiamato rafe; queste lamelle in genere sono lisce negli agnati mentre possono essere lisce o presentare pieghe secondarie, date dal sollevamento della mucosa che le riveste, nei pesci gnatostomi. Nei mammiferi invece si parla di turbinati. Anche se si può ritenere che queste strutture siano necessarie principalmente per aumentare la superficie olfattiva, non sempre è così. Nei pesci le lamelle spesso sono totalmente ricoperte da mucosa olfattiva e la loro forma è legata anche alla necessità di indirizzare i flussi di acqua alle varie parti della camera olfattiva, e a mantenere un flusso costante con appropriate velocità e pressione (Cox, 2008; Cox et al., 2021). Nei mammiferi i turbinati non sono tutti olfattivi; con la presenza delle coane e con la respirazione polmonare, le cavità nasali entrano a far parte anche dell'apparato respiratorio e infatti i turbinati nasali hanno funzioni legate alla preparazione dell'aria che dovrà raggiungere il delicato epitelio polmonare: questa verrà infatti ripulita da particolato, umidificata e riscaldata proprio grazie al passaggio attraverso queste cavità dalla forma articolata (Weber e Werner, 2013). Possiamo comunque dire che queste differenze morfologiche sono strettamente correlate all'ambiente di vita, acquatico o terrestre, e alle specifiche esigenze ecologiche e comportamentali degli animali, riflettendo le specializzazioni acquisite nel corso dell'evoluzione per ottimizzare la capacità olfattive per le molecole nell'aria o disciolte nell'acqua. Il sistema olfattivo svolge un ruolo cruciale nella percezione di sostanze chimiche coinvolte in funzioni fondamentali per la sopravvivenza e

il successo riproduttivo, come il riconoscimento e la localizzazione dei partner e della prole attraverso i feromoni, la regolazione dei processi neuroendocrini, le risposte comportamentali di vario tipo, l'orientamento spaziale, la navigazione su lunghe distanze, il riconoscimento di conspecifici e di individui appartenenti ad altre specie come predatori o prede, oltre che nella selezione del cibo, in quanto la percezione dei sapori deriva dall'integrazione dei segnali olfattivi con quelli gustativi.

Il sistema olfattivo origina dallo sviluppo embrionale del placode olfattivo, che è un placode cranico pari anche in quei vertebrati, i ciclostomi, definiti monorini, in cui la cavità olfattiva nell'adulto è una sola (Poncelet e Shimeld, 2020). Tale placode dà origine all'organo olfattivo e ad altri eventuali organi chemorecettori associati, ma non è questa la sua unica funzione. Dal placode olfattivo, infatti, prende anche origine una popolazione di cellule che, eccezionalmente, migra all'interno del sistema nervoso centrale e dà luogo ad alcuni neuroni nell'ipotalamo (Murakami et al., 2022). Per andare a costituire le cavità nasali e il neuroepitelio che le riveste, il placode olfattivo può avere due vie. Nei ciclostomi, nei condroitti e negli osteitti attinopterigi, il placode inizia ad inspessirsi a partire dalla superficie del muso e da lì si invagina per andare a costituire una cavità che rimarrà in continuità con l'ambiente esterno tramite la narice o, a volte, tramite due aperture, le narici anteriori e posteriori. Negli osteitti sarcopterigi invece il placode olfattivo viene trascinato, insieme all'ectoderma che prende parte alla formazione dello stomodeo e, pertanto, comincia a formare la cavità nasale all'interno della bocca o comunque in prossimità della rima boccale (Patthey et al 2014).

In ogni caso, la cavità olfattiva è rivestita da una mucosa olfattiva in cui le sostanze odorose, disciolte in acqua o presenti in forma volatile nell'aria, possono entrare in contatto con il neuroepitelio sensoriale attraverso le narici esterne o, nei vertebrati dotati di coane, anche attraverso queste aperture interne che mettono in comunicazione la cavità orale e quella nasale. Nella mucosa olfattiva è presente, come detto, un neuroepitelio specializzato, detto epitelio olfattivo, costituito da un insieme di cellule recettrici (che sono veri e propri neuroni), cellule secernenti e cellule di sostegno, e ricoperto, nella sua parte apicale, da uno strato di muco che rappresenta il primo mezzo in cui le sostanze odorose vengono

disciolte. Inoltre, nello strato basale dell'epitelio sono presenti una o più popolazioni di cellule staminali che possono proliferare e rinnovare continuamente tutti i tipi cellulari del neuroepitelio stesso (Schwob et al., 2017). I meccanismi molecolari che stanno alla base della funzione olfattiva iniziano a livello periferico, dove avviene la captazione delle molecole odorose e la loro successiva trasduzione da parte di recettori olfattivi espressi sulla membrana delle specializzazioni apicali dei neuroni recettori. I neuroni olfattivi primari presenti nell'epitelio sono infatti neuroni bipolari, dotati di un dendrite apicale provvisto di ciglia (cioè, specializzazioni apicali sorrette da un assonema di microtubuli) o microvilli (cioè, specializzazioni apicali sorrette da microfilamenti di actina) che aumentano notevolmente la superficie esposta agli stimoli chimici. Queste specializzazioni dendritiche, come detto, sono immerse nel muco che, oltre a facilitare la dissoluzione e la concentrazione delle molecole odorose, svolge un ruolo protettivo. All'estremo opposto del corpo cellulare di ciascun neurone emerge un prolungamento assonico che si riunisce con quelli di altri neuroni primari, andando a costituire le fila olfattorie che si uniscono a formare il nervo olfattivo, cioè il primo nervo cranico (Sterzi, G. 1909). Il nervo olfattivo, così formato, trasmette le informazioni sensoriali al sistema nervoso centrale afferendo a una regione del telencefalo specializzata, denominata bulbo olfattivo (OB), che rappresenta il primo centro di elaborazione degli stimoli chimici. L'OB, in tutti i vertebrati, mostra una struttura organizzata in quattro strati concentrici che circondano il rinocelo, una cavità interna che corrisponde a una sottile diramazione del ventricolo laterale del telencefalo. Dal più esterno al più interno, questi strati sono lo strato nervoso, lo strato glomerulare, lo strato delle cellule mitrali e lo strato granulare.

Lo strato nervoso è formato dagli assoni provenienti dal nervo olfattivo, i quali penetrano nell'OB e si distribuiscono in modo da dirigersi, una volta raggiunto lo strato glomerulare, verso specifici glomeruli. Lo strato glomerulare comprende appunto numerosi glomeruli, strutture sferoidali o tondeggianti costituite da un fitto intreccio di fibre nervose formate dalle afferenze olfattive e dai dendriti delle cellule mitrali, che costituiscono il successivo strato. Le cellule mitrali sono grandi neuroni dotati di estese arborizzazioni dendritiche che si estendono nello strato glomerulare dove ricevono direttamente le informazioni dai neuroni olfattivi primari; i loro assoni lasciano l'OB costituendo il tratto olfattivo

primario, suddiviso in una porzione laterale e una mediale, che trasporta le informazioni verso altre aree olfattive e altri centri encefalici. Lo strato granulare è lo strato più interno, ricco di piccoli interneuroni che svolgono un'importante funzione di modulazione e integrazione dei segnali olfattivi in arrivo.

La modalità con cui le cellule mitrali innervano i diversi glomeruli varia notevolmente tra le specie: nei mammiferi e in zebrafish, le evidenze sperimentali indicano che ciascuna cellula mitrale riceve informazioni da (cioè innerva con i suoi dendriti) un singolo glomerulo; al contrario, in molti altri teleostei, studi morfologici suggeriscono un pattern multiplo in cui le arborizzazioni dendritiche di una singola cellula mitrale possono contattare più glomeruli, consentendo una diversa modalità di integrazione e codifica degli stimoli olfattivi (Fuller et al., 2006).

I glomeruli costituiscono una delle strutture più distintive e facilmente riconoscibili del sistema nervoso centrale, rappresentando una vera e propria unità funzionale della processazione sensoriale. Oltre alle fibre olfattive primarie e ai dendriti delle cellule mitrali, nei glomeruli possono convergere altri tipi di fibre e neuroni. Un esempio sono le "tufted cells", presenti nell'OB di molti vertebrati, compresi i mammiferi, i cui assoni lasciano anch'essi l'OB per raggiungere target distinti da quelli delle cellule mitrali, contribuendo al tratto olfattivo primario; queste cellule sono tuttavia più piccole e meno facilmente identificabili senza l'ausilio di specifici marcatori istologici. Inoltre, i glomeruli sono circondati dai neuroni periglomerulari, interneuroni che possono stabilire circuiti locali atti a modulare le informazioni sensoriali già nella fase precoce dell'elaborazione (Kosaka e Kosaka, 2005). Si ritiene che ogni glomerulo riceva afferenze da neuroni olfattivi primari esprimenti lo stesso recettore olfattivo, generando così un'organizzazione funzionale a mappa: la mappa olfattiva. In essa, ogni recettore specifico espresso nel neuroepitelio olfattivo corrisponde a uno o pochi glomeruli nell'OB, con assoni che possono terminare anche in 2-3 glomeruli contigui, creando una topografia precisa per la rappresentazione degli stimoli chimici. Lo strato delle cellule granulari contiene interneuroni che stabiliscono connessioni con le cellule mitrali, modulandone l'attività per affinare la sensibilità e il contrasto delle risposte olfattive. Accanto a questi tipi cellulari principali, sono presenti anche cellule gliali come ad esempio gli astrociti, che supportano la funzione neuronale e contribuiscono all'omeostasi

dell'ambiente extracellulare (Aicardi, 2023), le olfactory ensheathing cells (OECs), cellule gliali specializzate che avvolgono gli assoni olfattivi, i quali sono fibre non mielinizzate. L'epitelio olfattivo, essendo soggetto a continuo rinnovamento per tutta la vita del vertebrato, richiede la formazione costante di nuovi neuroni i cui assoni devono proiettarsi correttamente dall'epitelio olfattivo fino allo strato nervoso dell'OB per raggiungere il glomerulo appropriato. Eventuali errori di direzionamento assonico possono comportare un rimodellamento degli assoni stessi o, in alternativa, l'apoptosi del neurone coinvolto; in entrambi i casi si generano detriti cellulari che devono essere rimossi. In studi sul topo è stato osservato che le OECs svolgono un'importante funzione di "pulizia" dei frammenti cellulari derivanti sia dal normale turnover sia da danni maggiori, ma non solo: l'assenza delle OECs è stata correlata a una ridotta crescita degli assoni, suggerendo un ruolo fondamentale di queste cellule nella guida assonica e nel supporto allo sviluppo del sistema olfattivo. Pur derivando l'epitelio olfattivo dal placode cranico, le OECs sembrano originare da precursori cellulari provenienti dalla cresta neurale, un aspetto che le rende uniche e particolarmente interessanti anche in prospettiva terapeutica (Nazareth et al., 2015). La capacità di percepire stimoli di natura chimica è una caratteristica comune a tutti gli esseri viventi, dai più semplici ai più complessi, anche se risulta difficile stabilire in quali casi sia corretto parlare di un vero e proprio senso dell'olfatto paragonabile a quello osservato nei vertebrati.

Nei vertebrati, l'organo olfattivo è localizzato nelle cavità nasali e, dal punto di vista strutturale, può presentarsi, a seconda della classe, ma con differenze anche a livello di singola specie, come una semplice superficie sensoriale che riveste una parte della cavità nasale oppure come un organo complesso e morfologicamente elaborato, con forme e disposizioni che variano notevolmente. Nei pesci, quando l'organo è complesso, troviamo lamelle che possono sollevarsi direttamente dalle pareti della cavità nasale o sorrette da un supporto centrale chiamato rafe; queste lamelle in genere sono lisce negli agnati, possono essere lisce o la mucosa che le riveste può essere sollevata in pieghe secondarie nei pesci gnatostomi. Nei mammiferi invece si parla di turbinati. Anche se si può ritenere che queste strutture siano necessarie principalmente per aumentare la superficie olfattiva, non sempre è così. Nei pesci le lamelle non sempre sono totalmente ricoperte da mucosa olfattiva e la loro forma è legata anche alla necessità di

indirizzare i flussi di acqua alle varie parti della camera olfattiva, e a mantenere un flusso costante con appropriate velocità e pressione (Cox, 2008; Cox et al., 2021). Nei mammiferi i turbinati non sono tutti olfattivi, con la presenza delle coane e con la respirazione polmonare, le cavità nasali entrano a far parte anche dell'apparato respiratorio e infatti i turbinati nasali hanno funzioni legate alla preparazione dell'aria che dovrà raggiungere il delicato epitelio polmonare: verrà infatti ripulita da particolato, umidificata e riscaldata proprio grazie al passaggio attraverso queste cavità dalla forma articolata (Weber e Werner, 2013).

Possiamo quindi dire che queste differenze morfologiche sono strettamente correlate all'ambiente di vita, acquatico o terrestre, e alle specifiche esigenze ecologiche e comportamentali degli animali, riflettendo le specializzazioni acquisite nel corso dell'evoluzione per ottimizzare la capacità olfattive per le molecole nell'aria o disciolte nell'acqua. Il sistema olfattivo svolge un ruolo cruciale nella percezione di sostanze chimiche coinvolte in funzioni fondamentali per la sopravvivenza e il successo riproduttivo, come il riconoscimento e la localizzazione dei partner e della prole attraverso i feromoni, la regolazione dei processi neuroendocrini, le risposte comportamentali di vario tipo, l'orientamento spaziale, la navigazione su lunghe distanze, il riconoscimento di conspecifici e di individui appartenenti ad altre specie come predatori o prede, oltre che nella selezione del cibo, in quanto la percezione dei sapori deriva dall'integrazione dei segnali olfattivi con quelli gustativi. I meccanismi molecolari che stanno alla base della funzione olfattiva iniziano a livello periferico, dove avviene la captazione delle molecole odorose e la loro successiva trasduzione da parte di recettori olfattivi espressi sulla membrana delle specializzazioni apicali dei neuroni recettori. Il sistema olfattivo origina dallo sviluppo embrionale del placode olfattivo, che è un placode pari anche in quei vertebrati, i ciclostomi, definiti monorini, in cui la cavità olfattiva nell'adulto è una sola (Poncelet e Shimeld, 2020). Tale placode dà origine all'organo olfattivo e ad altri eventuali organi chemorecettori associati, ma non è questa la sua unica funzione. Dal placode olfattivo, infatti, prende anche origine una popolazione di cellule che, eccezionalmente, migra all'interno del sistema nervoso centrale per andare a costituire alcuni dei neuroni nell'ipotalamo (Whitlock, 2004). Per andare a costituire le cavità nasali e il neuroepitelio che le riveste, il placode olfattivo può avere due vie. Nei ciclostomi, nei condroitti e negli osteitti

attinopterigi, il placode inizia ad inspessirsi a partire dalla superficie del muso e da lì si invagina per andare a costituire una cavità che rimarrà in continuità con l'ambiente esterno tramite la narice o, a volte, tramite due aperture, le narici anteriori e posteriori. Negli osteitti sarcopterigi invece il placode olfattivo viene trascinato insieme all'ectoderma che prende parte alla formazione dello stomodeo e pertanto comincia a formare la cavità nasale all'interno della bocca o comunque in prossimità della rima boccale (Schlosser, 2005).

In ogni caso, la cavità olfattiva è rivestita da una mucosa olfattiva in cui le sostanze odorose, disciolte in acqua o presenti in forma volatile nell'aria, possono entrare in contatto con l'epitelio sensoriale attraverso le narici esterne o, nei vertebrati dotati di coane, anche attraverso queste aperture interne che mettono in comunicazione la cavità orale e quella nasale. Nella mucosa olfattiva è presente un neuroepitelio specializzato, detto epitelio olfattivo, costituito da un insieme di cellule recettrici, cellule secernenti e cellule di sostegno, e ricoperto, nella sua parte apicale, da uno strato di muco che rappresenta il primo mezzo in cui le sostanze odorose vengono disciolte.

I neuroni olfattivi primari presenti nell'epitelio sono neuroni bipolari, dotati di un dendrite apicale provvisto di ciglia (cioè, specializzazioni apicali sorrette da un assonema di microtubuli) o microvilli (cioè, una specializzazione apicale sorretta da microfilamenti di actina) che aumentano notevolmente la superficie esposta agli stimoli chimici. Queste specializzazioni dendritiche sono immerse nel muco che, oltre a facilitare la dissoluzione e la concentrazione delle molecole odorose, svolge un ruolo protettivo. All'estremo opposto del corpo cellulare di ciascun neurone emerge un prolungamento assonico che si riunisce con quelli di altri neuroni primari, andando a costituire le fila olfattorie che si uniscono a formare il nervo olfattivo, cioè il primo nervo cranico (Sterzi, G. 1909). Il nervo olfattivo, così formato, trasmette le informazioni sensoriali al sistema nervoso centrale afferendo alla regione del telencefalo specializzata, OB, che rappresenta il primo centro di elaborazione degli stimoli chimici. L'OB, in tutti i vertebrati, mostra una struttura organizzata in quattro strati concentrici che circondano il rinocelo, una cavità interna che corrisponde a una sottile diramazione del ventricolo laterale del telencefalo. Dal più esterno al più interno, questi strati sono lo strato nervoso, lo strato glomerulare, lo strato delle cellule mitrali e lo strato granulare.

Lo strato nervoso è formato dagli assoni provenienti dal nervo olfattivo, i quali penetrano nell'OB e si distribuiscono verso specifici glomeruli. Lo strato glomerulare comprende numerosi glomeruli, strutture sferoidali o tondeggianti costituite da un fitto intreccio di fibre nervose formate dalle afferenze olfattive e dai dendriti delle cellule mitrali, che costituiscono il successivo strato. Le cellule mitrali sono grandi neuroni dotati di estese arborizzazioni dendritiche che si estendono nello strato glomerulare, contribuendo alla formazione dei glomeruli e ricevendo direttamente le informazioni dai neuroni olfattivi primari; i loro assoni lasciano l'OB costituendo il tratto olfattivo primario, suddiviso in una porzione laterale e una mediale, che trasporta le informazioni verso le aree olfattive corticali e altri centri encefalici superiori. Lo strato granulare è lo strato più interno, ricco di piccoli interneuroni che svolgono un'importante funzione di modulazione e integrazione dei segnali olfattivi in arrivo.

La modalità con cui le cellule mitrali innervano i diversi glomeruli varia notevolmente tra le specie: nei mammiferi e in zebrafish, le evidenze sperimentali indicano che ciascuna cellula mitrale riceve informazioni da un singolo glomerulo; al contrario, in molti altri teleostei, studi morfologici suggeriscono un pattern multiplo in cui le arborizzazioni dendritiche di una singola cellula mitrale possono contattare più glomeruli, consentendo una diversa modalità di integrazione e codifica degli stimoli olfattivi (Fuller et al., 2006).

I glomeruli costituiscono una delle strutture più distintive e facilmente riconoscibili del sistema nervoso centrale, rappresentando una vera e propria unità funzionale del processamento sensoriale. Oltre alle fibre olfattive primarie e ai dendriti delle cellule mitrali, nei glomeruli possono convergere altri tipi di fibre e neuroni. Un esempio sono le "tufted cells", presenti nell'OB di molti vertebrati, compresi i mammiferi, i cui assoni lasciano anch'essi l'OB per raggiungere target distinti da quelli delle cellule mitrali, contribuendo al tratto olfattivo primario; queste cellule sono tuttavia più piccole e meno facilmente identificabili senza l'ausilio di specifici marcatori istologici. Inoltre, i glomeruli sono circondati dai neuroni periglomerulari, interneuroni che possono stabilire circuiti locali atti a modulare le informazioni sensoriali già nella fase precoce dell'elaborazione (Kosaka e Kosaka, 2005). Si ritiene che ogni glomerulo riceva afferenze da neuroni olfattivi primari esprimenti lo stesso recettore olfattivo, generando così un'organizzazione funzionale a mappa: la mappa olfattiva. In

essa, ogni recettore specifico espresso nel neuroepitelio olfattivo corrisponde a uno o pochi glomeruli nell'OB, con assoni che possono terminare anche in 2-3 glomeruli contigui, creando una topografia precisa per la rappresentazione degli stimoli chimici. Lo strato delle cellule mitrali comprende pochi grandi neuroni che, attraverso le loro proiezioni assoniche, trasmettono l'informazione agli altri centri cerebrali. Lo strato delle cellule granulari, invece, contiene interneuroni che stabiliscono connessioni con le cellule mitrali, modulandone l'attività per affinare la sensibilità e il contrasto delle risposte olfattive. Accanto a questi tipi cellulari principali, sono presenti altri neuroni e cellule gliali come gli astrociti, che supportano la funzione neuronale e contribuiscono all'omeostasi dell'ambiente extracellulare (Aicardi, 2023). Oltre ai neuroni, l'OB ospita tipi cellulari specifici come le olfactory ensheathing cells (OECs), cellule gliali specializzate che avvolgono gli assoni olfattivi, i quali sono fibre non mielinizzate. L'epitelio olfattivo, essendo soggetto a continuo rinnovamento per tutta la vita del vertebrato, richiede la formazione costante di nuovi neuroni i cui assoni devono proiettarsi correttamente dall'epitelio olfattivo fino allo strato nervoso dell'OB per raggiungere il glomerulo appropriato. Eventuali errori di direzionamento assonico possono comportare un rimodellamento degli assoni stessi o, in alternativa, l'apoptosi del neurone coinvolto; in entrambi i casi si generano detriti cellulari che devono essere rimossi. In studi sul topo è stato osservato che le OECs svolgono un'importante funzione di "pulizia" dei frammenti cellulari derivanti sia dal normale turnover sia da danni maggiori, ma non solo: l'assenza delle OECs è stata correlata a una ridotta crescita degli assoni, suggerendo un ruolo fondamentale di queste cellule nella guida assonica e nel supporto allo sviluppo del sistema olfattivo. Pur derivando l'epitelio olfattivo dal placode cranico, le OECs sembrano originare da precursori cellulari provenienti dalla cresta neurale, un aspetto che le rende uniche e particolarmente interessanti anche in prospettiva terapeutica (Nazareth et al., 2015).

## **Recettori olfattivi**

Inizialmente l'organizzazione funzionale dell'OB è stata studiata nei mammiferi e la maggior parte degli studi riguarda questa classe. È stato dimostrato che le diverse sostanze chimiche vengono recepite dall'ambiente tramite recettori settevolte transmembrana legati a proteine G eterotrimeriche (GPCR) presenti sulla membrana dendritica dei neuroni recettori olfattivi (Mombaerts, 2004).

Le famiglie di GPCR che prendono parte all'olfatto dei vertebrati sono almeno quattro diverse. La famiglia dei recettori olfattivi propriamente detti (olfactory receptors - OR), la famiglia dei recettori associati alle amine in traccia (Trace amine-associated receptors - TAAR), la famiglia dei recettori vomeronasali di tipo 1 (Vomeronasal receptor type I – V1R) e la famiglia dei recettori vomeronasali di tipo 2 (Vomeronasal receptor type II – V2R). Le proteine appartenenti a queste quattro famiglie sono legate a diverse proteine G, che in particolare differiscono per la subunità alfa. I recettori OR e TAAR sono legati a proteine G con subunità alfa di tipo G-alfa-olf. Invece i recettori di tipo V1R sono associati a proteine G-alfa-q oppure G-alfa-i. Infine i recettori V2R sono associati a proteine G-alfa-o.

Generalmente i recettori OR e TAAR sono espressi in neuroni che presentano ciglia nella loro porzione dendritica, mentre i recettori V1R e V2R sono espressi in neuroni con microvilli (Jia and Halpern, 1996; Malnic et al. 1999; Mombaerts, 2004; Liberles e Buck, 2006).

Le famiglie di recettori sopra elencate sono tra le famiglie di proteine più numerose in assoluto. In particolare, la famiglia OR è rappresentata in alcuni mammiferi da quasi 1500 proteine diverse (Quignon et al., 2005).

## **Relazione tra l'anatomia del sistema olfattivo e i recettori**

Ogni neurone olfattivo, nell'epitelio sensoriale, esprime una sola di queste proteine ed è quindi specifico per riconoscere una o poche molecole odorose. Pertanto, l'epitelio olfattivo è costituito da centinaia o migliaia di neuroni con specificità odorosa diversa. Questi neuroni con diversa specificità non sono raggruppati nell'epitelio bensì sono sparsi. Tuttavia, i loro assoni, pur provenendo da tutta l'area dell'epitelio olfattivo vanno a confluire ad uno o pochi specifici

glomeruli. Quindi, anche se nell'epitelio olfattivo non ci sono zone sensibili a determinati odoranti, nel OB ci sono glomeruli specifici per ogni recettore (Mombaerts, 2004).

Da questa descrizione deriva il fatto che il numero di glomeruli in ogni OB dovrebbe essere correlato con il numero di recettori olfattivi di una certa specie. In molti casi i neuroni esprimenti un singolo recettore sono stati visti afferire però non ad un solo glomerulo ma a pochi glomeruli vicini. Questo porterebbe il numero dei glomeruli a non essere necessariamente uguale al numero di recettori. Se ci sia un motivo funzionale che differenzia il fatto, per gli assoni provenienti da neuroni che esprimono un certo recettore, di afferire ad un singolo glomerulo oppure a due o a tre, non è noto.

## **I Condroitti**

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 sempre in aggiornamento, ma le ultime stime lo attestano a circa 1200 (Nelson et al., 2016). Le specie sono 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

### ***Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758)**

Lo *Scyliorhinus canicula* anche detto gattuccio, è uno squalo appartenente alla famiglia Scyliorhinidae. È il più diffuso nel Mar Mediterraneo (dall'Adriatico allo Stretto di Gibilterra, nonché nel Mar Egeo) e si trova anche lungo le coste atlantiche orientali, dalla Guinea fino al Mare del Nord e al Mar Baltico, lungo le coste scandinave. Si segnala la sua presenza anche nel Mar Nero, benché in Crimea non si peschi un gattuccio dal 1937. L'habitat che predilige di più sono i

fondali sassosi, sabbiosi e corallini, specie se ricchi di gorgonie (*Paramuricea clavata* o *Eunicella cavolinii*, sui rami delle quali depone le uova). Le acque che frequenta sono basse e medio-profonde, essendo riscontrabile la sua presenza da 10 a 400 metri di profondità.

Il suo corpo è allungato e poco compresso ai lati, con testa appuntita, occhi dal taglio allungato e lungo peduncolo caudale. Le pinne dorsali sono arretrate, la prima è dietro la ventrale, la seconda dietro l'anale; la coda è formata da due lobi, quello superiore più sviluppato dell'inferiore. Difficilmente raggiunge lunghezze superiori a 100 cm.

Per quanto riguarda la livrea ha la caratteristica di essere simile a quella di *S. stellaris*, con dorso beige puntinato di bruno e giallastro, ma nel nostro caso possiamo notare la presenza di macchie più fitte e minute. È una specie ovipara: la femmina, dopo essere stata fecondata, depone degli astucci ovarici dalla forma tipica (i borsellini della sirena) dove l'embrione si sviluppa autonomamente. Questa specie viene ampiamente pescata e commercializzata in tutta Europa; in Italia è apprezzata soprattutto lungo le coste adriatiche e in Sardegna. Si pesca con le reti da posta, reti a strascico e con i palamiti (Franceschini e Ciani, 1993). Benché *S. canicula* non possa essere considerato un animale modello a tutti gli effetti, tra i condroitti, questa specie presenta numerosi vantaggi che l'hanno resa comunque oggetto di studio di grande valore nello studio dell'evoluzione degli gnatostomi (Coolen et al., 2008).

Le sue dimensioni ridotte e la relativamente semplice riproduzione in cattività, ne hanno fatto un modello per la biologia dello sviluppo. Inoltre, lo sviluppo di risorse genomiche e trascrittomiche su larga scala ha rilanciato il suo utilizzo negli ultimi decenni. Il primo condroitto in assoluto per cui sia stato disponibile un genoma completo è stato l'olocefalo *Callorhinchus milii* (Venkatesh et al., 2014), ma tra gli elasmobranchi il primo genoma ad essere stato sequenziato è stato quello di *S. canicula* (Genome Assembly sScyCan1.1, 2020). Questa specie è stata utilizzata ad per studi sullo sviluppo del sistema nervoso centrale (es. Carrera et al., 2008; Pose-Méndez et al. 2016) e degli organi di senso (es. Rodríguez-Moldes e Pereira-Guldrís, 2025), sull'evoluzione della muscolatura (es. Dearden et al., 2021) e delle scaglie (es. Nicklin et al., 2024) e per innumerevoli altri.

## **Sistema olfattivo dei condroitti**

È stato osservato che le natiche dello *S. canicula* sono di piccole dimensioni e sono situate in posizione ventro-laterale della porzione anteriore della testa, tra la punta del muso e la bocca. L'organo olfattivo di *S. canicula*, all'interno delle cavità, è un organo lamellare costituito mediamente da circa 32 lamelle disposte sui due lati del rafe (Ferrando et al., 2017), le quali aumentano considerevolmente la superficie disponibile per la percezione degli stimoli odorosi. Queste lamelle sono ricoperte dalla mucosa olfattiva, che comprende un neuroepitelio specializzato e una lamina propria sottostante; è proprio nella lamina propria che le fila olfattoria si riuniscono per iniziare il loro percorso verso l'OB, trasmettendo le informazioni sensoriali ricevute dai neuroni recettori. All'interno del neuroepitelio olfattivo si possono distinguere diversi tipi di neuroni recettori, principalmente i neuroni con microvilli e i neuroni cripta, facilmente riconoscibili per la loro differente morfologia; invece, i recettori ciliati sono assenti in *S. canicula* e probabilmente in tutti i condroitti (Ferrando et al., 2006a). I neuroni con microvilli rappresentano la popolazione più abbondante: si caratterizzano per un nucleo rotondeggiante con un nucleolo molto prominente, generalmente localizzato nella parte mediana dell'epitelio, e sono distribuiti in modo piuttosto uniforme lungo le lamelle. I neuroni cripta, invece, sono molto meno numerosi e si contraddistinguono per la presenza di una sorta di invaginazione apicale, la cripta appunto, e per un nucleo dalla tipica forma reniforme; questi neuroni si concentrano principalmente nella regione apicale dell'epitelio e la loro distribuzione appare più discontinua e isolata. Accanto a queste popolazioni neuronali, il neuroepitelio olfattivo comprende anche diversi altri tipi cellulari con funzioni di supporto, rigenerazione e secrezione, come le cellule di sostegno ciliate, le cellule basali, che costituiscono il serbatoio di cellule staminali deputate al rinnovo dell'epitelio sensoriale, le cellule mucose coinvolte nella produzione del muco che ricopre le lamelle e le cellule a scambio ionico, importanti per il mantenimento dell'omeostasi ionica dell'epitelio (Ferrando et al., 2006b).

Dal punto di vista molecolare, i neuroni con microvilli mostrano una marcata immunoreattività per la proteina G-alpha-o, una subunità delle G-protein accoppiate ai recettori olfattivi, e presentano la concomitante espressione di recettori della famiglia V2R, suggerendo una specializzazione per il rilevamento di specifiche classi di composti odorosi (Ferrando et al., 2009; Syed et al., 2023).

La proliferazione cellulare nell'epitelio olfattivo sembra verificarsi sia a livello delle cellule basali, considerate la principale fonte di rinnovamento, sia a livello dello strato apicale dove sono presenti i nuclei delle cellule di sostegno. Al contrario, i fenomeni apoptotici sono stati osservati prevalentemente nello strato basale dell'epitelio, indicando un turnover cellulare localizzato (Ferrando et al., 2010).

L'OB di *S. canicula* presenta una complessa organizzazione: esso è diviso in due sottobulbi e contiene un ampio rinocele, una cavità centrale rivestita da uno strato di cellule endodimali. Analogamente a quanto osservato negli altri vertebrati, anche nei condroitti l'OB è organizzato in strati distinti: lo strato nervoso, lo strato glomerulare dove avviene la prima sinapsi tra le fila olfattorie e le cellule del bulbo, lo strato delle cellule mitrali e quello delle cellule granulari (Franceschini e Ciani, 1993; Ferrando et al., 2009). Le cellule endodimali che rivestono il rinocele formano un ulteriore strato. Tra i principali tipi cellulari presenti nell'OB si annoverano le cellule mitrali, con un diametro di circa 40  $\mu\text{m}$  e un ruolo cruciale nella trasmissione delle informazioni agli altri centri del sistema nervoso centrale; le cellule granulari, di dimensioni più ridotte (circa 10  $\mu\text{m}$ ), coinvolte nei circuiti di modulazione intrabulbare; le cellule tufted e le cellule periglomerulari, entrambe di diametro attorno ai 20  $\mu\text{m}$  e difficili da distinguere unicamente sulla base della morfologia istologica (Ferrando et al., 2012). La distinzione tra queste ultime due popolazioni è resa complicata dalla somiglianza dimensionale e dalla distribuzione sovrapposta all'interno dello strato glomerulare. Le cellule granulari, inoltre, possono essere suddivise in ulteriori sottopopolazioni in base all'espressione di specifici marker molecolari come l'enzima ossido nitrico sintasi (NOS-like) e il neurotrasmettitore acido gamma-aminobutirrico (GABA-like), quest'ultimo espresso anche dalle cellule tufted, suggerendo un ruolo comune nella modulazione sinaptica e nell'elaborazione degli stimoli olfattivi (Ferrando et al., 2012).

## **Sistema olfattivo *S. canicula***

L'organo olfattivo di *Scyliorhinus canicula* è un organo lamellare costituito mediamente da circa 32 lamelle disposte radialmente (Ferrando et al., 2017), le quali aumentano considerevolmente la superficie disponibile per la percezione degli stimoli odorosi. Queste lamelle sono ricoperte dalla mucosa olfattiva, che comprende un neuroepitelio specializzato e una lamina propria sottostante; è proprio nella lamina propria che le fila olfattoria si riuniscono per iniziare il loro percorso verso l'OB, trasmettendo le informazioni sensoriali ricevute dai neuroni recettori. All'interno del neuroepitelio olfattivo si possono distinguere diversi tipi di neuroni recettori, principalmente i neuroni con microvilli e i neuroni cripta, facilmente riconoscibili per la loro differente morfologia (Ferrando et al., 2006a). I neuroni con microvilli rappresentano la popolazione più abbondante: si caratterizzano per un nucleo rotondeggiante con un nucleolo molto prominente, generalmente localizzato nella parte mediana dell'epitelio, e sono distribuiti in modo piuttosto uniforme lungo le lamelle. I neuroni cripta, invece, sono molto meno numerosi e si contraddistinguono per la presenza di una sorta di invaginazione apicale, la cripta appunto, e per un nucleo dalla tipica forma reniforme; questi neuroni si concentrano principalmente nella regione apicale dell'epitelio e la loro distribuzione appare più discontinua e isolata. Accanto a queste popolazioni neuronali, il neuroepitelio olfattivo comprende anche diversi altri tipi cellulari con funzioni di supporto, rigenerazione e secrezione, come le cellule di sostegno ciliate, le cellule basali — che costituiscono il serbatoio di cellule staminali deputate al rinnovo dell'epitelio sensoriale —, le cellule mucose coinvolte nella produzione del muco che ricopre le lamelle e le cellule a scambio ionico, importanti per il mantenimento dell'omeostasi ionica dell'epitelio (Ferrando et al., 2006b).

Dal punto di vista molecolare, i neuroni con microvilli mostrano una marcata immunoreattività per la proteina G- $\alpha$ -o, una subunità delle G-protein accoppiate ai recettori olfattivi, e presentano la concomitante espressione di recettori della famiglia V2R, suggerendo una specializzazione per il rilevamento di specifiche classi di composti odorosi (Ferrando et al., 2009; Syed et al., 2023). La proliferazione cellulare nell'epitelio olfattivo sembra verificarsi sia a livello delle cellule basali, considerate la principale fonte di rinnovamento, sia a livello dello strato apicale dove sono presenti i nuclei delle cellule di sostegno. Al

contrario, i fenomeni apoptotici sono stati osservati prevalentemente nello strato basale dell'epitelio, indicando un turnover cellulare localizzato (Ferrando et al., 2010).

L'OB di *S. canicula* presenta una complessa organizzazione: esso è diviso in due emi-bulbi e contiene un ampio rinocele, una cavità centrale rivestita da uno strato di cellule endoteliali. Analogamente a quanto osservato negli altri vertebrati, anche nei condroitti l'OB è organizzato in strati distinti: lo strato nervoso, lo strato glomerulare dove avviene la prima sinapsi tra le fila olfattorie e le cellule del bulbo, lo strato delle cellule mitrali e quello delle cellule granulari (Franceschini e Ciani, 1993; Ferrando et al., 2009). Le cellule endoteliali che rivestono il rinocele formano un ulteriore strato. Tra i principali tipi cellulari presenti nell'OB si annoverano le cellule mitrali, con un diametro di circa 40  $\mu\text{m}$  e un ruolo cruciale nella trasmissione delle informazioni agli altri centri del sistema nervoso centrale; le cellule granulari, di dimensioni più ridotte (circa 10  $\mu\text{m}$ ), coinvolte nei circuiti di modulazione intrabulbare; le cellule tufted e le cellule periglomerulari, entrambe di diametro attorno ai 20  $\mu\text{m}$  e difficili da distinguere unicamente sulla base della morfologia istologica (Ferrando et al., 2012). La distinzione tra queste ultime due popolazioni è resa complicata dalla somiglianza dimensionale e dalla distribuzione sovrapposta all'interno dello strato glomerulare. Le cellule granulari, inoltre, possono essere suddivise in ulteriori sottopopolazioni in base all'espressione di specifici marker molecolari come l'enzima ossido nitrico sintasi (NOS-like) e il neurotrasmettitore acido gamma-aminobutirrico (GABA-like), quest'ultimo espresso anche dalle cellule tufted, suggerendo un ruolo comune nella modulazione sinaptica e nell'elaborazione degli stimoli olfattivi (Ferrando et al., 2012).

## **Recettori olfattivi nei condroitti**

Il genoma di diversi condroitti è ormai stato sequenziato e il numero di geni per le 4 diverse famiglie di recettori olfattivi è stato stimato in 11 diverse specie appartenenti sia alla sottoclasse degli olocefali, sia a quella degli elasmobranchi. Il numero di questi geni sembra essere molto basso rispetto a quelli riscontrati in altri vertebrati e stabile tra le diverse specie di condroitti. La famiglia di geni più numerosa (ma si parla pur sempre di poche decine di geni) è quella dei V2R, la cui espressione a livello di epitelio olfattivo è stata verificata, almeno nella specie *S. canicula*. Invece la famiglia OR sembra non essere espressa nell'epitelio olfattivo, mentre per le famiglie V1R e TAAR è espresso un solo gene (Syed et al., 2023).

## SCOPO DELLA TESI

Scopo di questo lavoro è stata la prima conta e mappatura dei glomeruli nel OB di una specie di condroitto. L'obiettivo era quello di capire in che relazione stessero i glomeruli e i recettori olfattivi in questa classe di vertebrati e, per questo motivo, è stata scelta una specie considerata “modello”, cioè lo *S. canicula* (Coolen et al, 2008). Per questa specie sono già noti i recettori olfattivi presenti nel genoma, ma anche la loro espressione nell'organo olfattivo (Syed et al., 2023). Si tratta inoltre di una specie relativamente comune e di dimensioni ridotte, cosa che la rende adatta a questo tipo di studi. Per quanto non si tratti di uno squalo di grandi dimensioni, uno studio in toto del OB sarebbe stato piuttosto complicato. Per questo si è pensato di utilizzare le tecniche istologiche che permettono di analizzare microscopicamente anche oggetti biologici macroscopici. Sezioni seriate dei bulbi olfattivi di tre esemplari sono stati usati per determinare il numero dei glomeruli ma anche per valutare la stereotipizzazione degli stessi nei diversi individui, dato che questa è stata proposta, ma non assodata, per altri vertebrati. In ultimo si voleva valutare la percentuale di volume del OB dedicata allo strato glomerulare e la dimensione dei glomeruli, questo nell'ambito dello studio dell'anatomia quantitativa del sistema olfattivo dei condroitini, iniziata da alcuni anni nel laboratorio in cui è stata svolta questa tesi (Aicardi et al., 2023).

# MATERIALI E METODI

## Campionamento e fissazione

Tre esemplari di gattuccio *S. canicula* sono stati campionati in Mar Ligure come catture accidentali nell'ambito della pesca professionale. Gli esemplari sono stati sbarcati già privi di vita e si è proceduto a determinarne il sesso, a misurarli e campionarne parte del capo. In Tabella I sono riportati gli identificativi dei tre esemplari e le informazioni inerenti. I campioni sono stati immersi in formalina al 10% tamponata a pH 7.4 per 24 ore e, successivamente, lavati in soluzione tampone fosfato e posti per la conservazione in etanolo al 70%.

Tab. I – Esemplari di *S. canicula* utilizzati nello studio

Identificativo	Lunghezza totale (cm)	Sesso	Vetrini ottenuti per l'OB sinistro
Scycan 18.2	33	M	100
Scycan 18.7	21	F	102
Scycan 19.4	42	F	84

Come si può osservare dalla tabella i nostri esemplari presentano dimensioni variabili e, per quanto riguarda i sessi, troviamo la presenza di due femmine, ovvero l'esemplare 18.7 e il 19.4, e un maschio, l'esemplare 18.2. Il numero di vetrini è stato riportato solo per completezza e non rispecchia le dimensioni del OB dei diversi individui ma solo la presenza o meno dell'organo olfattivo (o rosetta olfattiva). Nell'esemplare 19.4, che pure è il più grande, si ha un numero minore di vetrini, in quanto la rosetta olfattiva era stata isolata precedentemente, a differenza degli esemplari 18.2 e 18.7 in cui rosetta e OB sono stati tagliati insieme. Il numero di sezioni per ogni vetrino era 4.

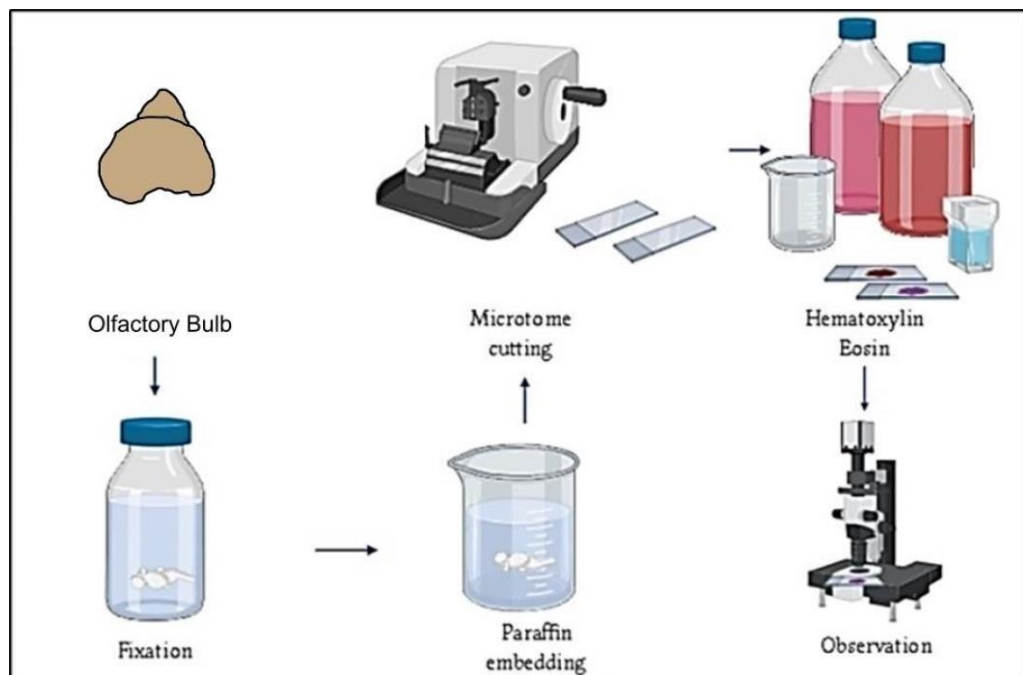
## Tecniche istologiche

Prima di procedere all'inclusione in paraffina, le teste di *S. canicula* sono state dissezionate allo stereomicroscopio MZ APO (Leica, Germania) per isolare da ognuna l'OB sinistro. Si è quindi proceduto all'inclusione in paraffina in modo da rendere il campione della giusta consistenza per il successivo taglio al microtomo. Per effettuare l'inclusione in paraffina, è stato necessario disidratare il campione utilizzando etanolo sempre più concentrato ('salita degli alcoli'), e

impregnarlo con un solvente organico miscibile sia con l'alcool sia con la paraffina dal nome commerciale di Bioclear.

Si è proceduto secondo il seguente protocollo:

- 2 ore etanolo 80%
- 2 ore etanolo 90%
- 8 ore etanolo 95%
- 3 cambi da 1 ora etanolo 100%
- 15 min etanolo/Bioclear 50/50
- 3 cambi da 2 min Bioclear
- 15 min Bioclear/paraffina 50/50 (56°C)
- 3 cambi da 1 ora in paraffina
- Inclusione



**Figura 1:** Esempio schematico dei passaggi eseguiti in laboratorio.

Dopo l'inclusione il campione è stato tagliato al microtomo con l'obiettivo di ottenere sezioni dello spessore di 5  $\mu\text{m}$ ; queste sono state posizionate su vetrini per le successive colorazioni. Si è mantenuto lo stesso piano di taglio per tutti e tre gli OB, cioè quello frontale (procedendo in direzione dorso-ventrale). Ognuno dei tre OB è stato sezionato integralmente, ottenendo vetrini con sezioni seriali. Il numero di vetrini ottenuto per ogni esemplare è riportato in Tab. I, le sezioni

per ogni vetrino erano circa 4. Quasi tutti i vetrini sono stati colorati con Ematossilina-Eosina (Carlo Erba, Italia) in modo da poter osservare la morfologia microscopica dei bulbi nella loro interezza. L'Ematossilina colora in blu-violetto acidi nucleici o parti acide della cellula; invece, l'Eosina colora di rosa le proteine e le parti basiche dei tessuti.

Per effettuare la colorazione è necessario sparaffinare le sezioni su vetrino utilizzando il Bioclear (Bio-Optica, Italia, 2 passaggi da 15 min) e reidratarle attraverso la discesa degli alcoli (immersione in alcool sempre meno concentrato) per poi procedere con la colorazione vera e propria:

- 6 min Ematossilina (gocce sul vetrino)
- 10 min acqua di rubinetto (immersione)
- 1 min acqua distillata acidificata con HCl 1N (immersione)
- 1 min acqua distillata
- 6 min Eosina (gocce sul vetrino)
- 5 min acqua distillata (immersione)

Dopo la colorazione, per poter chiudere il vetrino con apposito montante Eukitt (O. Kindler, Germania) e vetrino coprioggetto, si è proceduto alla salita degli alcoli (immersione in etanolo sempre più concentrato), alla chiarificazione in Bioclear e alla chiusura vera e propria. Le procedure istologiche sono riassunte schematicamente in Fig. 1.

## **Osservazione e fotografia**

Per ciascun vetrino colorato, è stata selezionata una sezione, poi fotografata con un ingrandimento di 25X. Nella maggior parte dei casi, è bastata una singola immagine per acquisire l'intera sezione. Da questo punto in avanti, ci si riferirà a queste immagini come "fotografie a piccolo ingrandimento". Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio ottico a luce trasmessa Leica ICC50 HD, dotato di videocamera Leica (Leica, Germania). Inoltre, numerose sezioni sono state fotografate ad ingrandimento maggiore (X100-400) utilizzando un microscopio ottico a luce trasmessa Leica DMRB equipaggiato con videocamera Leica (Leica, Germania).

## **Conta e mappatura dei glomeruli**

Tutte le fotografie a piccolo ingrandimento sono state importate nel software gratuito Inkscape (Versione 1.3.2) e poste ciascuna su un livello, rispettando la sequenza dei vetrini. Utilizzando diversi valori di trasparenza è stato possibile allineare, traslando e ruotando i singoli livelli, le immagini di sezioni consecutive in modo da farle combaciare. Questo passaggio è stato necessario per procedere con la conta dei glomeruli, seguendo il metodo descritto di seguito:

1. Analisi della prima fotografia e individuazione dei diversi strati.
2. Identificazione dei glomeruli.
3. Assegnazione di un numero a ciascun glomerulo.
4. Osservazione della fotografia successiva e riconoscimento degli strati.
5. Identificazione dei glomeruli.
6. Assegnazione del numero a ogni glomerulo già presente nella foto precedente, basandosi sulla numerazione già attribuita, oppure assegnazione di un nuovo numero se il glomerulo compare per la prima volta.
7. Ripetizione dei passaggi dal punto 4 fino all'analisi di tutte le fotografie.

Per quanto riguarda la mappatura, dopo la conta e identificazione dei singoli glomeruli, si è cercato di mappare i glomeruli più grandi (all'incirca tre o quattro) osservando dove erano posizionati tridimensionalmente nel bulbo (quindi in ogni sezione e nelle sezioni consecutive).

## **Calcolo volumi**

Successivamente è stata misurato il volume del bulbo 18.2 e 19.4 in  $\text{mm}^3$ , utilizzando il software Imagej (Image processing and analysis in java, Schneider et al., 2012) e successivamente messe a confronto le differenze tra i due. Sapendo che ogni sezione era spessa  $5 \mu\text{m}$  e ogni vetrino aveva mediamente 4 sezioni, la distanza tra sezioni di vetrini adiacenti è stata stimata in  $20 \mu\text{m}$  (cioè,  $5 \mu\text{m}$  per le 4 sezioni). Queste distanze stimate tra le sezioni sono state usate per calcolare i volumi. Con l'utilizzo del software sono state misurate le varie aree come quella totale del bulbo, o quella degli strati glomerulare, granulare e nervoso. Una volta ottenute le varie aree si è proseguito con la determinazione dei volumi e delle

rispettive percentuali. Il volume tra due sezioni consecutive è stato calcolato come quello di un tronco di cono dove le due aree rappresentavano la base maggiore e quella minore

$$(V=h/3*(A1+A2+\sqrt{A1*A2}))V=h/3*(A1+A2+\sqrt{A1*A2}).$$

Per le sezioni situate più all'estremo si è considerato il volume di un cono la cui base è la sezione stessa e l'altezza lo spessore stimato tra la sezione e il vetrino in cui l'oggetto misurato non era più visibile ( $V = (A * h)/3$ ).

Allo stesso tempo, è stata eseguita la stessa tecnica per andare a misurare i volumi dei 3 glomeruli più grandi osservati nei due bulbi che erano rispettivamente nell'esemplare 18.2 il glomerulo 308, 371 e 384, mentre per quanto riguarda il 19.4 erano 321 (A) e (B), 308 (I) e 387(L).

Una volta determinata l'area e il volume di essi è stato eseguito un confronto delle percentuali tra glomerulo e bulbo e tra glomerulo e regione granulosa.

## **Conta e mappatura cluster**

Poiché i glomeruli si presentano raggruppati in gruppi detti cluster, questi sono stati contati e mappati (numero max 30). Per questo sono state prese le foto dei bulbi a piccolo ingrandimento con una distanza media tra una sezione e l'altra di circa cinque vetrini (circa 100  $\mu$ m) tranne che in casi particolari dove erano presenti dei sovraffollamenti o delle incertezze sono state prese delle sezioni intermedie. Tutto il lavoro è stato effettuato utilizzando sempre il software Inkscape; per ogni foto sono stati determinati i vari cluster andando a cerchiare gruppi di glomeruli, osservando quanto questi proseguivano nelle sezioni successive e allo stesso tempo determinando quando se ne presentavano di nuovi. Per non fare troppa confusione e principalmente per osservare l'andamento dei vari cluster nelle diverse sezioni abbiamo optato per diverse colorazioni dei contorni usati per definire i cluster.

Un gruppo di glomeruli veniva considerato un cluster quando i glomeruli stessi erano raggruppati rispetto ai glomeruli circostanti e più vicini tra loro di quando fossero con i glomeruli di cluster adiacenti.

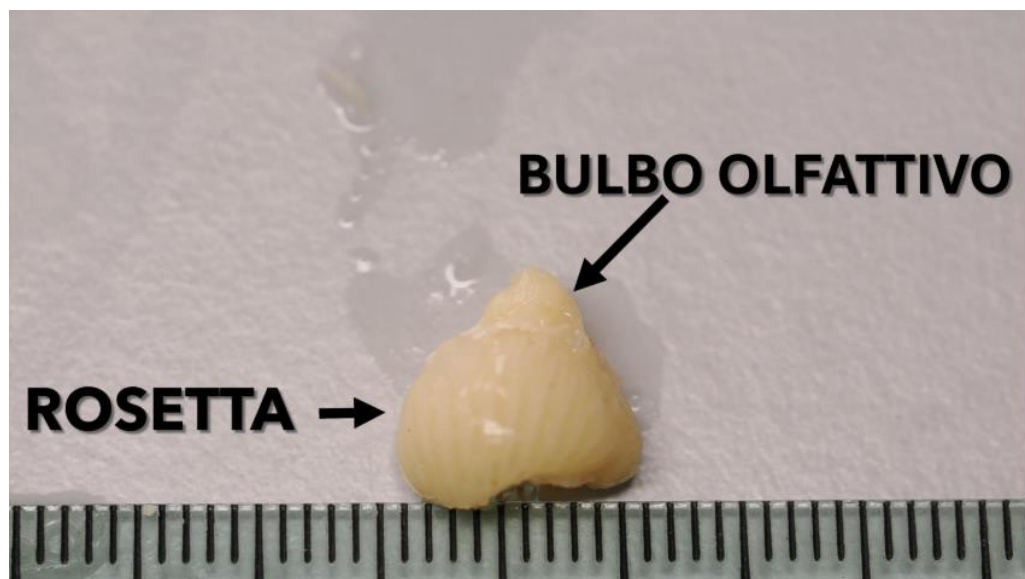
## **Ricostruzione tridimensionale dei cluster**

Le immagini con la mappatura dei cluster sono state utilizzate per creare una ricostruzione dello strato glomerulare dell'OB che permettesse di capire la loro organizzazione tridimensionale (3D). Ogni immagine è stata preparata rendendo lo sfondo nero e ogni cluster completamente colorato con diversi colori. Queste immagini sono state aperte in imageJ e trasformate in uno stack. Lo stack è stato usato per salvare un video della rotazione del volume creato grazie al comando 3D project. Lo spessore delle sezioni presenti nello stack è stato calcolato trasformando in pixel i 125  $\mu\text{m}$  stimati come distanza tra i vetrini considerati (uno ogni 5). Inoltre, lo stack è stato usato come base per il plugin Volume Viewer che ha permesso di acquisire degli screenshot ottimizzando l'inclinazione e la luce applicata sull'oggetto 3D.

# RISULTATI

## Osservazioni macroscopiche

L'OB di *S. canicula* è collegato al resto del telencefalo da un breve peduncolo. Ha una forma ellissoidale che, almeno esternamente, non mostra una suddivisione in due emi-bulbi come riportato in letteratura e come visibile poi all'osservazione istologica. Le dimensioni dell'OB sono di molto inferiori a quelle della rosetta olfattiva a cui è strettamente addossato. Questa rosetta è avvolta in una capsula connettivale che tuttavia non impedisce di vedere la forma delle lamelle sottostanti (Fig. 2)

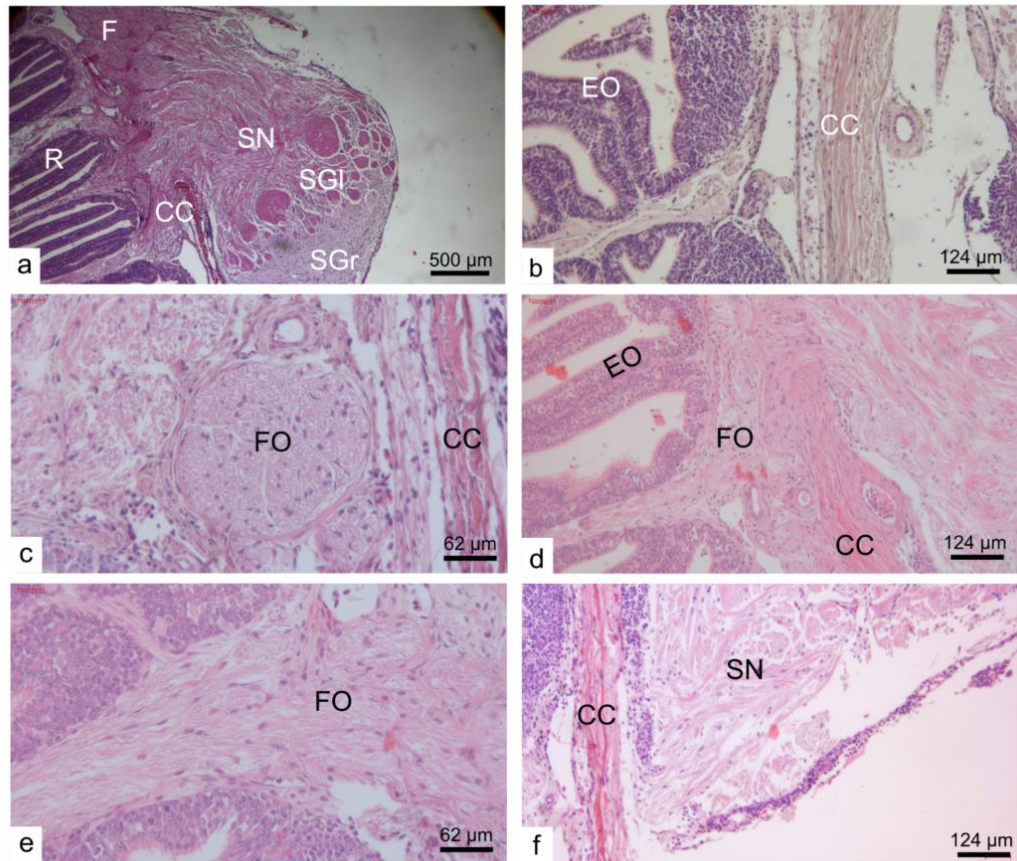


**Figura 2:** Rosetta e OB di *S. canicula* dopo la dissezione.

## Osservazioni istologiche

L'OB di *S. canicula* è suddiviso dalla rosetta da una capsula connettivale, la quale è più lassa sul lato vicino alla rosetta e più compatta e fibrosa sul lato vicino all'OB. La rosetta è costituita da lamelle rivestite da epitelio olfattivo. Le fibre nervose che prendono origine dai neuroni dell'epitelio, dette *fila olfactoria*, decorrono nel connettivo nella lamina propria delle lamelle fino a raggiungere la base delle stesse. Qui si uniscono a quelle provenienti da altre lamelle e formano dei grossi fasci di fibre che si dirigono verso l'OB circondate da OEC (fig. 3). Inizialmente questi fasci di fibre si dispongono ordinatamente, una volta raggiunto il bulbo iniziano a intrecciarsi per raggiungere i vari glomeruli, rendendo lo strato nervoso caotico. Possiamo osservare che i fasci nervosi sono circondati da tessuto connettivo che allo stesso tempo circonda fasci più sottili

(fig. 3c). Nei pressi dei fasci si possono vedere due tipi di nuclei colorati dall'ematossilina e facilmente distinguibili nella forma, quelli più allungati sono i nuclei dei fibroblasti mentre i nuclei più tondeggianti appartengono proprio alle OEC (fig. 3c-e).

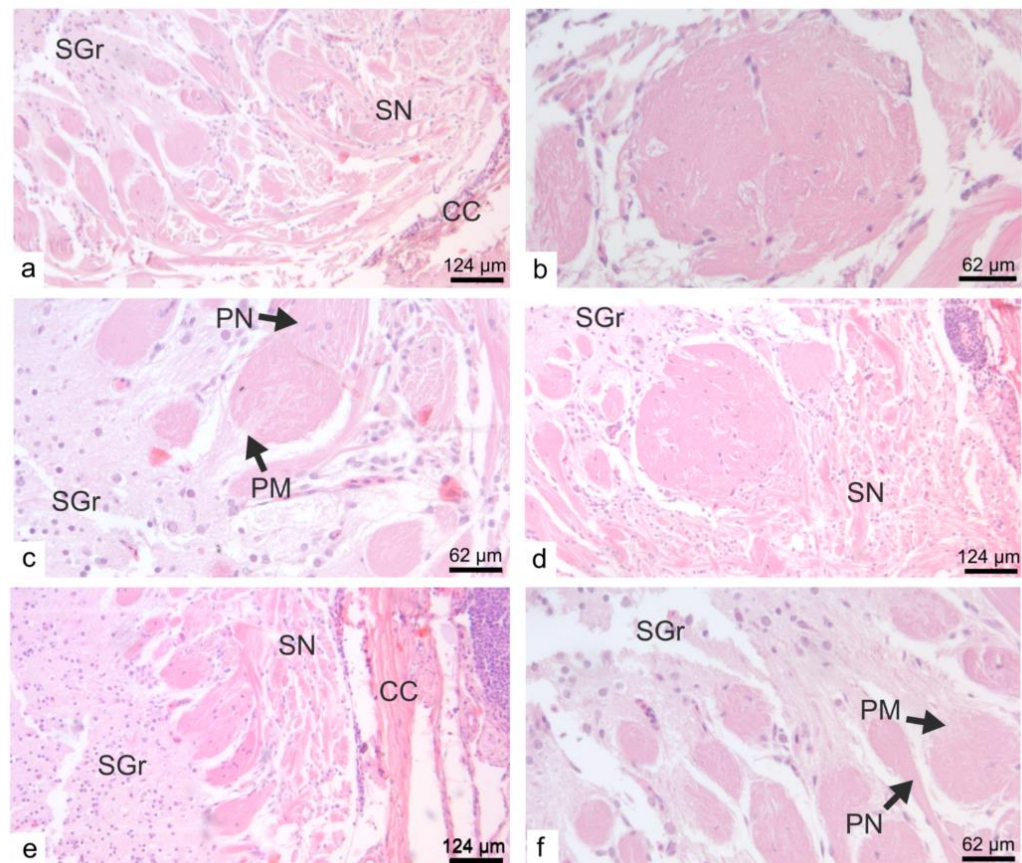


**Figura 3:** Sezioni istologiche di OB di *S. canicula*, ematossilina-eosina. CC: capsula connettivale; EO: epitelio olfattivo; F: fibre; FO: *fila olfattoria*; R: rosetta; SGI: strato glomerulare; SGr: strato granulare; SN: strato nervoso.

Lo strato glomerulare è caratterizzato, come dice il nome dalla presenza di glomeruli. Nelle sezioni di *S. canicula* essi appaiono generalmente tondeggianti o ovali e si riconoscono come zone compatte, eosinofile, e con pochi nuclei all'interno (Fig. 4). Le sezioni dei glomeruli presentano dimensioni molto diverse che in parte dipendono dal piano di taglio ma che, come vedremo in seguito, rispecchiano anche dimensioni diverse dell'intero glomerulo.

L'aspetto dei glomeruli varia per la presenza di fibre nervose in entrata. In particolare, presentano un polo nervoso in cui, ad alcuni livelli di taglio, è possibile vedere i fasci di fibre nervose provenienti dall'epitelio olfattivo che,

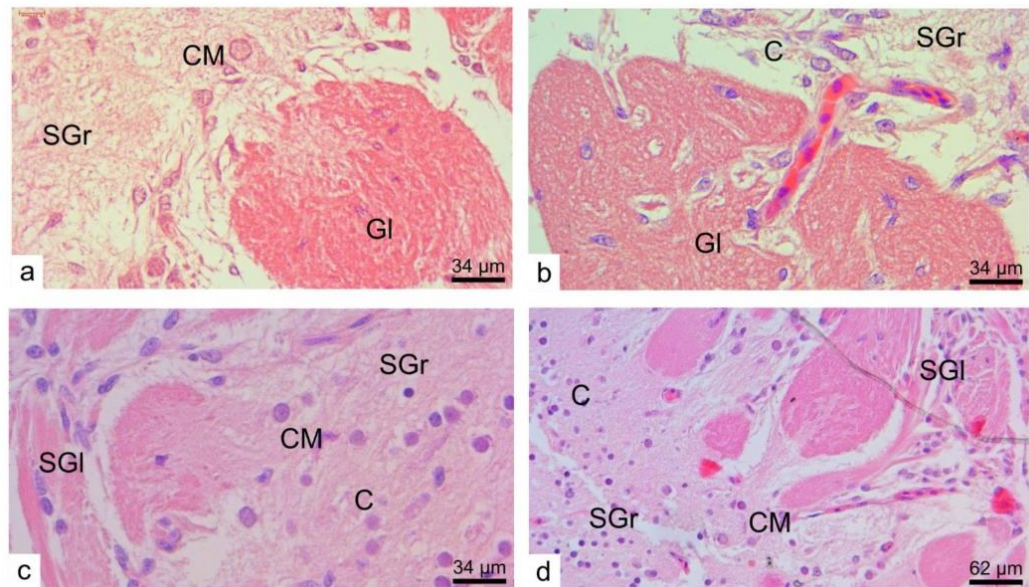
dallo strato nervoso, entrano nel glomerulo sotto forma di fibre eosinofile della stessa colorazione del glomerulo stesso (Fig. 4c, f). Sul polo opposto, che possiamo chiamare polo mitrale, ad alcuni livelli di taglio, è possibile osservare i dendriti delle cellule mitrali che entrano nel volume del glomerulo; questi dendriti in entrata si presentano molto meno colorati dall'eosina ed è possibile seguirne parzialmente il decorso all'interno del glomerulo (Fig. 4b-d).



**Figura 4:** Sezioni istologiche di OB di *S. canicula*, ematossilina-eosina. CC: capsula connettivale; PM: Polo mitrale del glomerulo; PN: Polo nervoso del glomerulo; SGr: strato granulare; SN: strato nervoso.

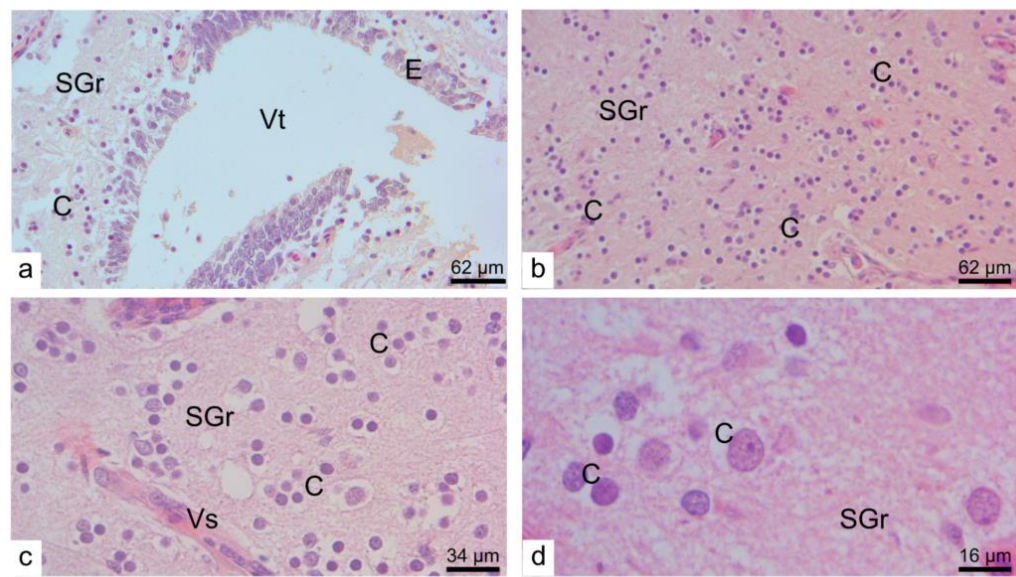
Inoltre, lo strato glomerulare è suddiviso in due porzioni facilmente distinguibili e che rappresenterebbero la suddivisione in due emi-bulbi che macroscopicamente non era visibile. Queste due regioni glomerulari possono essere indicate come mediale e laterale, questo in base al taglio che abbiamo eseguito, ovvero, dorso-ventrale, alla presenza della rosetta olfattiva e avendo usato sempre l'OB sinistro di tutti gli esemplari.

Le cellule mitrali (fig. 5) sono grossi neuroni bipolari che formano uno strato discontinuo nel bulbo in *S. canicula*. Possono essere riconosciute dalle dimensioni maggiori rispetto agli altri neuroni, dal citoplasma poco colorato e dalla vicinanza con i glomeruli.



**Figura 5:** Sezioni istologiche di OB di *S. canicula*, ematossilina-eosina. C: cellula dello strato granulare; CM: cellule mitrali; Gl: glomerulo; SGI: strato glomerulare; SGr: strato granulare.

Lo strato granulare ha un aspetto abbastanza omogeneo essendo costituito da un materiale fondamentale debolmente eosinofilo (dato dall'insieme dei prolungamenti delle cellule nervose e gliale) e da nuclei che individuano dei gruppetti formati da 1 a circa 20 cellule (Fig. 6). Poiché l'OB presenta un ramo del ventricolo telencefalico, detto rinocele, in alcune sezioni questo è visibile come una cavità circondata dall'ependima (Fig. 6a). I nuclei visibili nell'intero strato granulare non sono tutti uguali in quanto appartengono alle cellule granulari (neuroni tipici di questo strato) e a diversi tipi di cellule gliali (Fig. 6d).



**Figura 6:** Sezioni istologiche di OB di *S. canicula*, ematossilina-eosina. C: cellula dello strato granulare; E: ependima formato da cellule ependimali; SGr: strato granulare; Vs: vaso sanguigno; Vt: ventricolo.

L'OB dell'esemplare Scycan 18.7 nelle sezioni istologiche appariva parzialmente rovinato, probabilmente a causa di residui della capsula cartilaginea che non sono stati rimossi per non danneggiare le strutture ma che di fatto hanno compromesso il taglio. Questo è avvenuto anche perché si trattava di un esemplare considerevolmente più piccolo rispetto agli altri e pertanto la dissezione, avvenuta allo stereomicroscopio, è stata difficoltosa.

Il parziale danneggiamento delle sezioni istologiche di Scycan 18.7 non ha impedito l'osservazione della citoarchitettura generale, che appariva simile a quella degli altri due, ma ha determinato il non utilizzo di tale OB per le indagini quantitative che seguono.

### **Analisi quantitative**

Il volume complessivo degli OB e le percentuali di volume occupati dagli strati nervoso, glomerulare e granulare, calcolati come indicato nei materiali e metodi, sono presentati in Tabella II. Oltre a questi dati, relativi al presente studio, nella tabella sono anche riportati altri dati quantitativi relativi agli OB e alle rosette olfattive controlaterali degli stessi esemplari (Scycan 18.2 e 19.4) ottenuti in tesi precedenti. La simmetria dei bulbi olfattivi è stata verificata in diversi studi (es. Belluscio e Katz, 2001, Yan et al., 2008) e pertanto anche in questo lavoro è stata

data per scontata. Anche se la forma dei glomeruli non è perfettamente sferica, si è stimato il range del diametro dei glomeruli stessi nelle varie sezioni e questo andava da circa 40 fino a 360  $\mu\text{m}$ .

Tab. II – Dati relativi agli OB e alle rosette olfattive degli esemplari analizzati in questo studio.

Identificativo	VB	SGI	SGr	SN	PB*	CB*	NB*	SE*
Scycan 18.2	12.87	19.5	46	34.2	48	1.2*10 <sup>6</sup>	9.4*10 <sup>5</sup>	2.4*10 <sup>3</sup>
Scycan 19.4	17.21	18.2	41.6	40	60	4.1*10 <sup>6</sup>	2.7*10 <sup>6</sup>	5.8*10 <sup>3</sup>

CB: numero di cellule dell'OB; NB: numero di neuroni dell'OB; PB: peso dell'OB in mg; SE: superficie dell'epitelio olfattivo nella rosetta ( $\text{mm}^2$ ); SN: strato nervoso dell'OB (in percentuale); SGI: strato glomerulare (in percentuale); SGr: strato granulare (in percentuale); VB: volume dell'OB ( $\text{mm}^3$ ). I dati che sono evidenziati con un asterisco corrispondono a due lavori; la prima riga corrisponde a (Aicardi, 2019), mentre la seconda riga a (Aicardi, 2023).

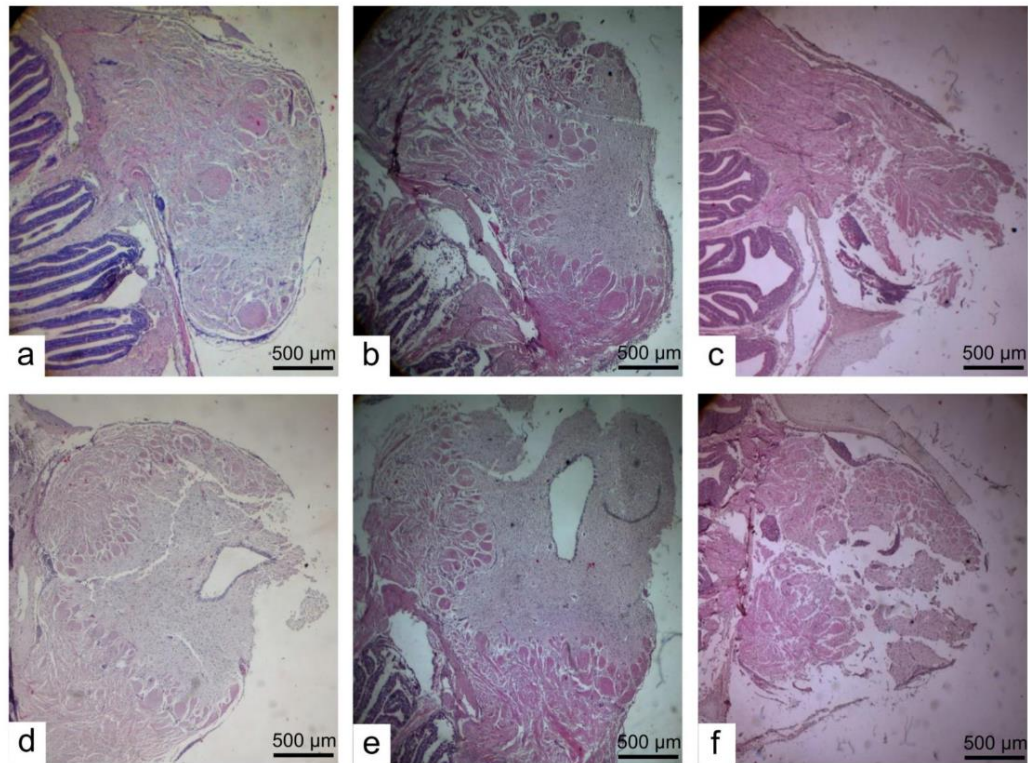
Partendo dalle fotografie istologiche a piccolo ingrandimento, come descritto nei materiali e metodi, è stata effettuata la conta dei glomeruli negli OB di Scycan 18.2 (415 glomeruli circa) e di Scycan 19.4 (420 glomeruli circa), mentre per quanto riguarda Scycan 18.7 non è stato possibile effettuare la conta dei vari glomeruli per i motivi che sono indicati precedentemente.

Dal momento che lo strato glomerulare, come detto precedentemente, è diviso in parte mediale e parte laterale, è stato possibile osservare un diverso numero di glomeruli nelle due sezioni con una percentuale della sezione mediale nettamente più alta di quella laterale. Nella sezione mediale abbiamo riscontrato il 62% dei glomeruli e nella sezione laterale una percentuale del 38%.

### **Confronto tra i bulbi di due esemplari**

Gli OB di Scycan 18.2 e 19.4, sezionati secondo lo stesso piano di taglio e osservati a piccolo ingrandimento sono stati utilizzati per il confronto. In entrambi gli esemplari la forma e disposizione degli strati è la stessa anche in relazione alle fibre afferenti e al rinocele. In particolare, per lo strato glomerulare non è stato possibile riconoscere in un esemplare e nell'altro ogni singolo glomerulo, anche considerando che il numero stesso dei glomeruli contati non è identico. Tuttavia, si nota come la disposizione dei glomeruli nello strato glomerulare sia simile, formando in ogni sezione due "ali" separate che possono

essere indicate come ala mediale e ala laterale. Tra le due ali è presente una zona dove lo strato granulare arriva praticamente a contatto con i confini dell'OB (fig. 7).



**Figura 7:** Sezioni istologiche di OB di *S. canicula*, ematossilina-eosina. Messi a confronto i tre esemplari *S. canicula*: 18.2 (immagine a-d), 19.4 (immagine b-e) e 18.7 (immagine c-f).

Osservando al confronto i gruppi più grandi di glomeruli è stato osservato una somiglianza della distribuzione che può essere seguita lungo tutte le sezioni (Fig. 7). In particolare, sono stati identificati come glomeruli omologhi nei due esemplari *S. canicula* 18.2 e 19.4 (Fig. 7). I più grandi e pertanto quelli più riconoscibili erano 3.

## Misura dei glomeruli

In questo caso invece siamo andati ad osservare nei due OB analizzati i glomeruli che in entrambi presentavano dimensioni elevate, selezionandone tre che abbiamo già visto nei materiali e metodi, con i dati riportati nella tabella III. Con questi dati è stato eseguito un confronto tra il glomerulo e l'OB, e un confronto tra il glomerulo e la regione glomerulare il tutto analizzato in percentuale.

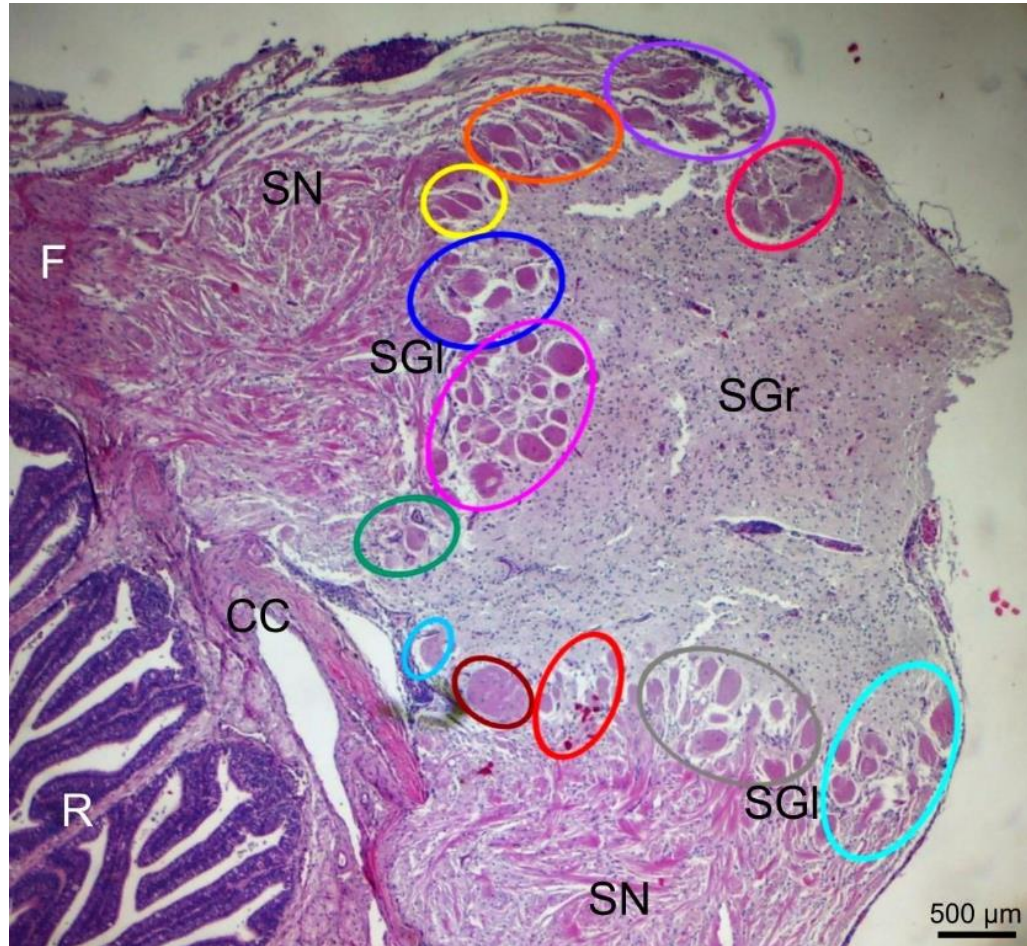
Tab. III – Dati relativi ai glomeruli presenti negli OB degli esemplari analizzati in questo studio.

Esemplare	N° Glom.	Vol.	Glom. /Bulbo	Glom. /reg. Glom.
Scycan 18.2	384	0,021	0,16	0,83
	308	0,025	0,19	0,99
	371	0,015	0,12	0,59
Scycan 19.4	321 (A)	0,017	0,10	0,55
	321 (B)	0,019	0,11	0,60
	387	0,013	0,07	0,42
	308	0,012	0,07	0,38

N° Glom.: corrisponde al numero del glomerulo che abbiamo analizzato; Vol: volume dei glomeruli (mm<sup>3</sup>); Glom. /Bulbo: confronto tra il volume di Glomerulo e Bulbo (in percentuale); Glom. /reg. Glom.: confronto tra il volume del Glomerulo e della regione glomerulare (in percentuale).

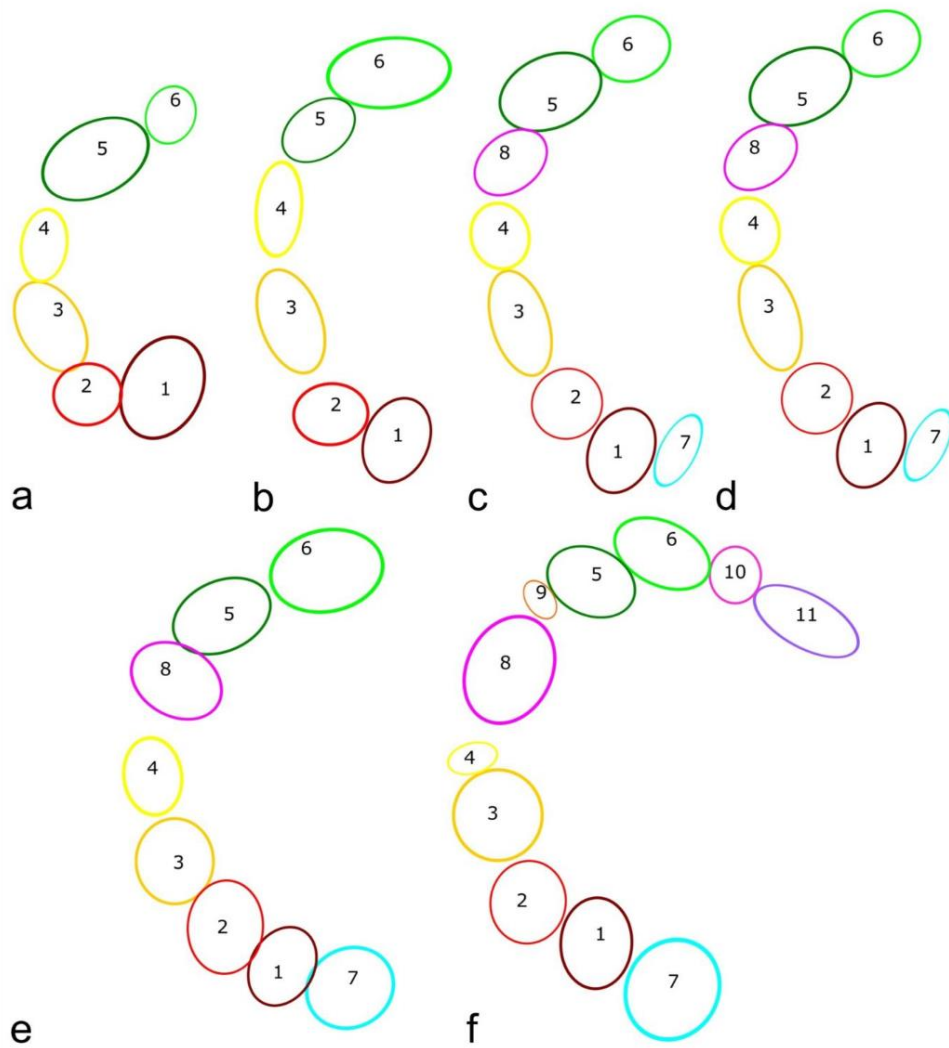
## Conta dei cluster

I glomeruli nell'OB di *S. canicula* si presentano raggruppati, a volte i glomeruli di un gruppo sono separati da materiale debolmente eosinofilo (neuropilo), a volte, sono separati da una porzione incolore (Fig. 8).

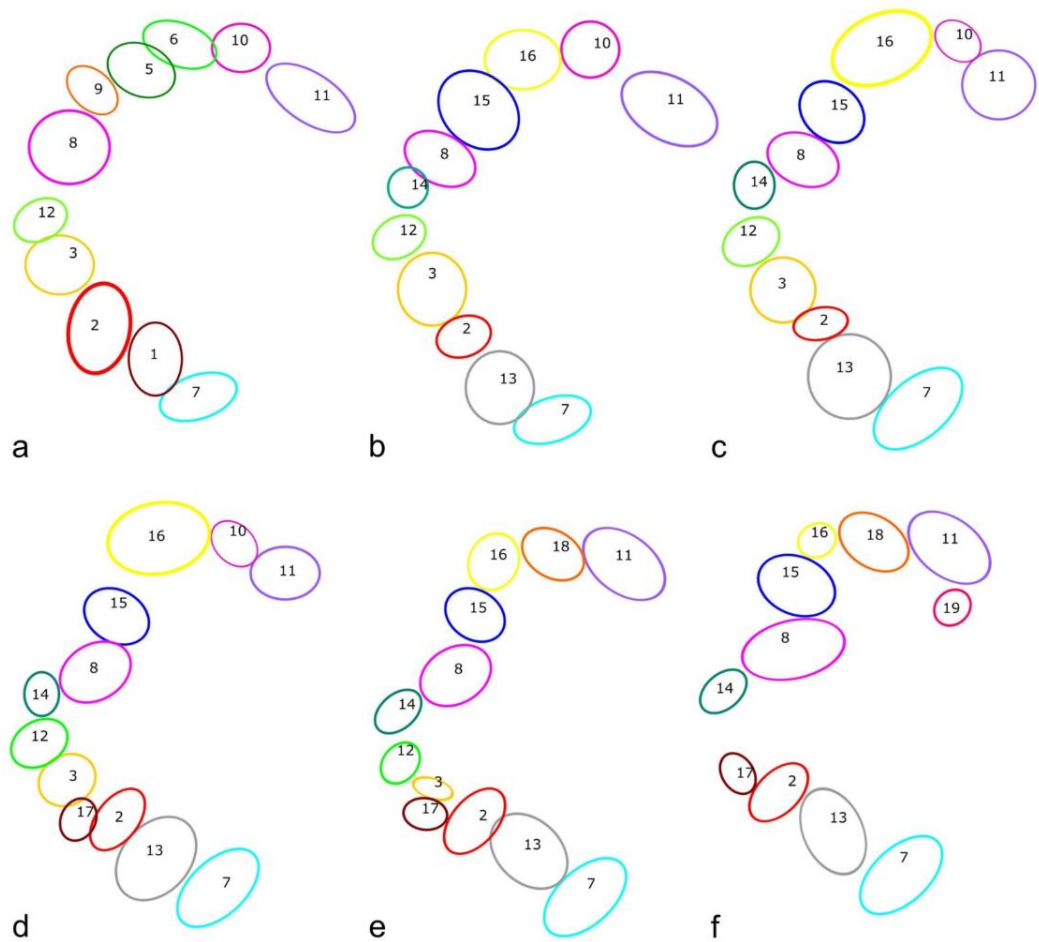


**Figura 8:** Sezione istologica di OB di *S. canicula*, ematossilina-eosina. CC: capsula connettivale; F: fibre; R: rosetta; SGI: strato glomerulare; SGr: strato granulare; SN: strato nervoso.

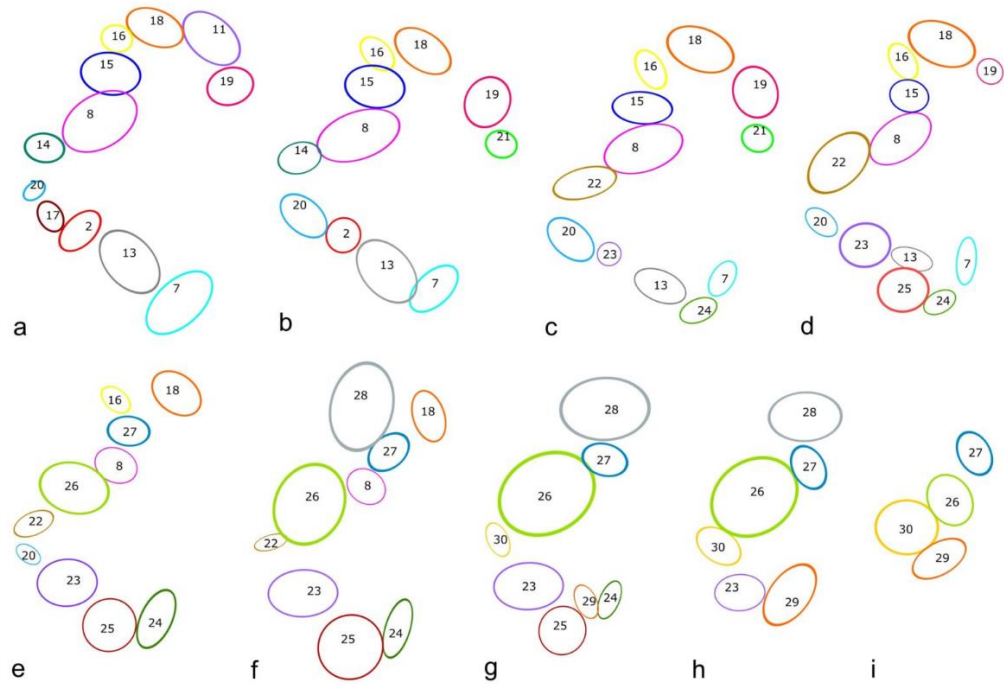
In questo secondo caso, è possibile che si stia osservando un artefatto e che i processi istologici abbiano leggermente separato i lobi di un singolo glomerulo. Se così fosse il numero di glomeruli contati precedentemente corrisponderebbe alle varie masse visibili, ma non necessariamente ai glomeruli intesi come unità funzionale. In alternativa, le singole masse separate sono da considerarsi realmente glomeruli, ma non si può ignorare il fatto che siano raggruppati e che quindi potrebbero comunque rappresentare delle unità funzionali. I gruppi di glomeruli particolarmente vicini e separati principalmente da spazi chiari (cluster) nell'esemplare Scycan 18.2 sono stati contati e mappati come riportato nei materiali e metodi. I 30 cluster individuati sono mappati in Figure 9-10-11.



**Figura 9:** Cluster che si possono osservare nelle diverse sezioni (da 0 a 750  $\mu\text{m}$  dalla superficie dorsale dell'OB), immagine a: corrisponde al vetrino 10, 125  $\mu\text{m}$ ; immagine b: corrisponde al vetrino 15, 250  $\mu\text{m}$ ; immagine c: corrisponde al vetrino 20, 375  $\mu\text{m}$ ; immagine d: corrisponde al vetrino 25, 500  $\mu\text{m}$ ; immagine e: corrisponde al vetrino 30, 625  $\mu\text{m}$  e in fine l'immagine f: corrisponde al vetrino 35, 750  $\mu\text{m}$ .

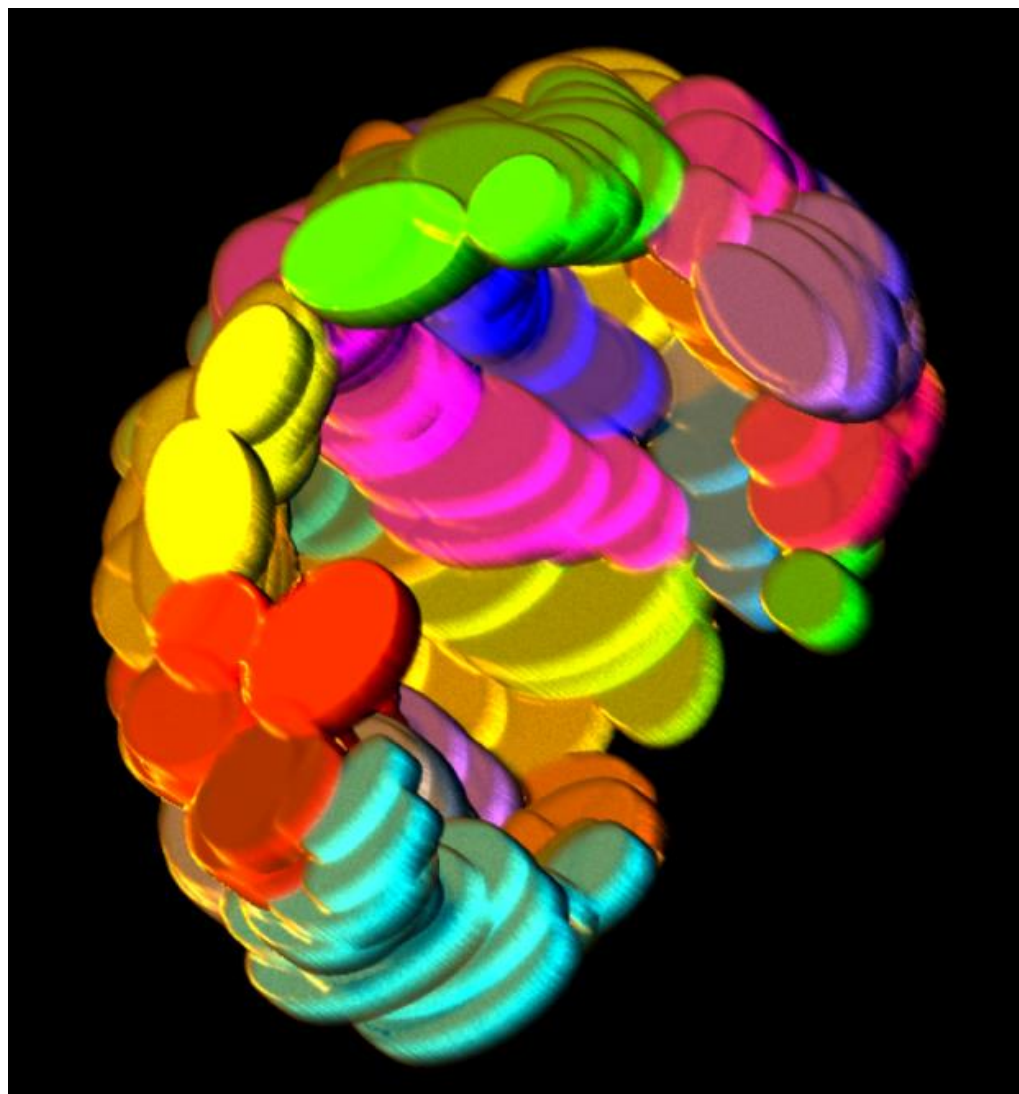


**Figura 10:** Cluster che si possono osservare nelle diverse sezioni (da 751 a 1500  $\mu\text{m}$  dalla superficie dorsale dell'OB), immagine a: corrisponde al vetrino 40, 875  $\mu\text{m}$ ; immagine b: corrisponde al vetrino 45, 1000  $\mu\text{m}$ ; immagine c: corrisponde al vetrino 50, 1125  $\mu\text{m}$ ; immagine d: corrisponde al vetrino 55, 1250  $\mu\text{m}$ ; immagine e: corrisponde al vetrino 60, 1375  $\mu\text{m}$  e in fine l'immagine f: corrisponde al vetrino 65, 1500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11:** Cluster che si possono osservare nelle diverse sezioni (da 1501 a 2250  $\mu\text{m}$  dalla superficie dorsale dell'OB), immagine a: corrisponde al vetrino 67, 1550  $\mu\text{m}$ ; immagine b: corrisponde al vetrino 70, 1625  $\mu\text{m}$ ; immagine c: corrisponde al vetrino 75, 1750  $\mu\text{m}$ ; immagine d: corrisponde al vetrino 77, 1800  $\mu\text{m}$ ; immagine e: corrisponde al vetrino 79, 1850  $\mu\text{m}$ ; immagine f: corrisponde al vetrino 81, 1900  $\mu\text{m}$ ; immagine g: corrisponde al vetrino 85, 2000  $\mu\text{m}$ ; immagine h: corrisponde al vetrino 91, 2150  $\mu\text{m}$  e con l'immagine i: corrisponde il vetrino 95, 2250  $\mu\text{m}$ .

La ricostruzione 3D dei cluster ha permesso di apprezzarne la distribuzione nel volume del bulbo 18.2 rendendo evidente la disposizione dei vari cluster (fig. 12).



**Figura 12:** ricostruzione in 3D dei cluster dell'OB *S. canicula* 18.2 sui 3 assi X, Y, Z.

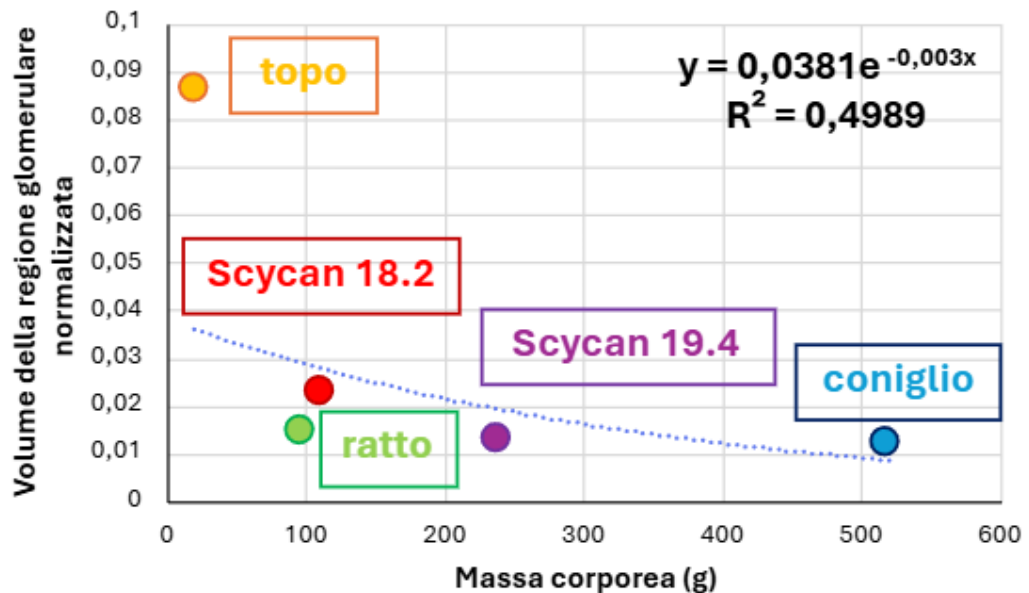
## DISCUSSIONE

Il lavoro svolto ci ha permesso di determinare in primis la struttura del bulbo ovvero la sua composizione interna, permettendoci di individuare grazie alle immagini a piccolo ingrandimento lo strato nervoso che può riconoscere grazie alla presenza dei fasci, nervosi intrecciati, lo strato glomerulare su cui ci si è maggiormente focalizzati, e quello granulare, costituito dalla presenza di tantissime cellule. Oltre a questi strati, ben evidenti in sezione istologica anche a piccolo ingrandimento, è stato riscontrato un ulteriore strato molto più sottile rispetto ai precedenti, cioè lo strato delle cellule mitrali, questo ci ha permesso di osservare come queste cellule si collegassero a degli specifici glomeruli, anche se una mappatura di innervazione dei glomeruli da parte delle cellule mitrali non è stata possibile. Questa suddivisione in strati osservata in *S. canicula* è in accordo con quanto visto in letteratura per questa specie (Franceschini e Ciani, 1994) e in generale si tratta di una stratificazione comune nell'intero subphylum dei vertebrati (Baier e Korsching, 1994; Royet et al., 1998; Nezlin e Schild, 2000; Frontini et al., 2003; Kazuyuki e Kazumi, 2014; Moriya-Ito et al., 2015).

In particolare, nello strato glomerulare abbiamo osservato la presenza dei glomeruli di diversa forma e dimensione, per quanto presentino una forma tondeggiante o ovale. Ogni glomerulo presenta due poli, quello di entrata delle fibre olfattive e quello di entrata dei dendriti delle cellule mitrali. Al meglio delle nostre conoscenze questa è la prima descrizione così dettagliata relativa all'organizzazione morfologica dei glomeruli in questa specie e forse nell'intera classe dei condroitti. La descrizione istologica dei glomeruli non sembra comunque cambiare molto nell'ambito dei vertebrati, ad esempio nell'uomo, indipendentemente dalla dimensione, la forma e la morfologia dei glomeruli sono molto simili a quelle viste in questo lavoro (Samaulhaq et al 2008).

Abbiamo calcolato che il volume dello strato glomerulare negli adulti di *S. canicula* è di circa il 20% del volume totale dell'OB. Questa percentuale è molto maggiore rispetto a quella misurata in alcuni mammiferi macrosomatici come il ratto (circa 5%) e coniglio (circa 7%) (Royet, 1998) ma è relativamente vicina a quella del topo (circa 14%) (Royet, 1988). In termini assoluti il volume dello strato glomerulare nei nostri esemplari di *S. canicula* (2,5 e 3,1 mm<sup>3</sup>) si situa nello stesso range dei tre mammiferi in questione (ratto 1,55, topo 1,74 e coniglio 5,98

mm<sup>3</sup>). Normalizzando questi volumi assoluti per la dimensione corporea dell'animale espressa in peso si ottiene che vertebrati più grandi hanno un volume glomerulare in proporzione minore e *S. canicula* non si discosta dai valori dei tre mammiferi considerati in lavori come (Eiben, & Bomhard, 1999), (Mallam, et al. 2018) e (Yang, et al (2014) (Fig. 13).



**Figura 13:** Grafico di confronto tra il volume della regione glomerulare e la massa corporea per gli esemplari di topo, ratto, coniglio e i due esemplari di *S. canicula* di questo studio.

Le dimensioni medie o il range dimensionale dei singoli glomeruli, espresse come misure lineari, sono disponibili in letteratura per alcune specie di vertebrati, ma risultano assenti per i condroitti. In particolare, studi precedenti hanno documentato tali dati in organismi come la lampreda, in cui è stato riportato un range dimensionale compreso tra 45 e 90 µm (Frontini et al., 2003). Per quanto riguarda lo zebrafish, Baier e Korsching (1994) hanno indicato un intervallo di dimensioni dei glomeruli pari a 25–140 µm. In *Xenopus*, Nezlin e Schild (2000) hanno invece osservato glomeruli con un diametro compreso tra 10 e 40 µm, evidenziando dimensioni significativamente inferiori rispetto alle specie precedentemente citate.

La letteratura riporta anche dati analoghi a quelli del nostro studio in mammiferi. Ad esempio, nel coniglio le dimensioni medie dei glomeruli risultano pari a circa 120 µm (Royet et al., 1998), mentre nel ratto si attestano su una media di 77 µm (Royet et al., 1998).

Confrontando questi dati con i risultati ottenuti nel presente studio su *S. canicula*, abbiamo rilevato un range dimensionale compreso tra 40 e 360  $\mu\text{m}$ . Queste dimensioni collocano i glomeruli di *S. canicula* in una fascia medio-grande: i glomeruli di dimensioni minori risultano almeno il doppio, in termini di diametro, rispetto ai più piccoli finora descritti nei vertebrati (ad es. in *Xenopus*), mentre quelli di dimensioni maggiori, secondo le evidenze attualmente disponibili, sembrano rappresentare i valori più elevati finora registrati. Sarebbe stato di particolare interesse poter confrontare anche i volumi dei singoli glomeruli, tuttavia, tale parametro non risulta documentato nella letteratura attuale.

Per quanto riguarda la stima del numero di glomeruli presenti nell'OB di *S. canicula*, nei due esemplari analizzati abbiamo rilevato una quantità media compresa tra 400 e 420 glomeruli. Tuttavia, questa stima risulta approssimativa, poiché è stato complesso determinare con precisione, nelle diverse sezioni istologiche esaminate, l'inizio e la fine di ciascun glomerulo.

Un'ulteriore difficoltà nella quantificazione è derivata dalla variazione topografica dello strato glomerulare all'interno dell'OB: progredendo lungo le sezioni seriali, abbiamo osservato che tale strato non si mantiene in una posizione costante, ma tende a spostarsi gradualmente verso la regione centrale dell'OB. Questo fenomeno è stato accompagnato da una progressiva riduzione dello strato granulare, che nelle porzioni terminali dell'OB scompare del tutto.

Contestualmente, si è evidenziato un aumento relativo dello strato nervoso. Come già evidenziato da Meisami (1990), la stima del numero totale di glomeruli nel OB può risultare complessa a causa della difficoltà di distinguere con precisione l'inizio e la fine dei glomeruli nelle sezioni istologiche, oltre alla variabilità topografica dello strato glomerulare lungo l'asse antero-posteriore dell'OB. Il suo lavoro si basava principalmente sull'OB dei mammiferi più precisamente del ratto, dove è stato utilizzato un esemplare di 25 giorni e dove il numero di glomeruli riscontrato è di circa 2400. Possiamo osservare mettendo a confronto questi due dati che il numero di glomeruli è nettamente diverso.

Il numero totale di glomeruli in un OB è stato valutato in relativamente poche specie di vertebrati. Per quello che riguarda i mammiferi, oltre al ratto indicato sopra, si sono stimati circa 1800 glomeruli nell'OB di topo, attorno a 1000 glomeruli in diverse specie di pipistrelli, circa 1900 nel coniglio (Royet et al., 1988). Per quello che riguarda l'uomo i dati sono sorprendenti in quanto è stata

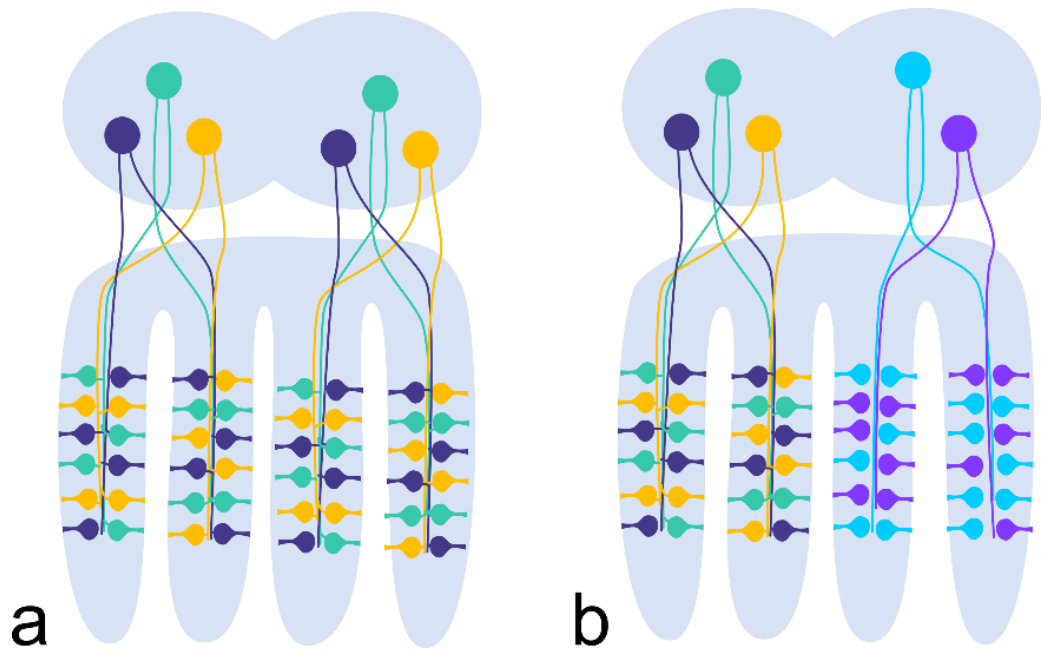
riscontrata una grande variazione a livello individuale e comunque il numero massimo di glomeruli riscontrati si avvicina a 10000 (Maresh et al. 2008).

Nello zebrafish i glomeruli sono stati valutati in due diversi lavori che hanno ottenuto un numero leggermente diverso: circa 80 (Baier e Korsching, 1994) e circa 120 (Braubach e Croll, 2021).

Tab. IV: Glomeruli e repertorio di geni olfattivi in diversi vertebrati

	N° glomeruli	N° geni recettori olfattivi (OR+TAAR+V1R+V2R)	Referenze
<i>Danio rerio</i>	80-120	$133 + 112 + 6 + 54 = 305$	Baier e Korsching, 1994; Braubach e Croll, 2021; Saraiva et al., 2015
<i>Homo sapiens</i>	5000-10000	$390 + 6 + 5 + 0 = 401$	Maresh et al., 2008; Krautwurst, 2008
<i>Rattus norvegicus</i>	2400	$1493 + 17 + 106 + 59 = 1675$	Meisami, 1990; Quignon et al 2005; Grus e Zhang 2008
<i>Mus musculus</i>	1800	$1000 + 16 + 187 + 70 = 1273$	Royet et al., 1988; Krautwurst, 2008
Vari pipistrelli	1000	-	Royet et al., 1988
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1900	-	Royet et al., 1988
<i>Scyliorhinus canicula</i>	410	$9$ (di cui espressi $0$ ) + $5$ (di cui espressi $1$ ) + $4$ (di cui espressi $1$ ) + $31$ (probabilmente espressi) = $49$ (33)	Syed et al., 2023; Questo studio

Si ritiene che il numero di glomeruli nell'OB dei vertebrati sia legato al numero di recettori olfattivi espressi nell'epitelio olfattivo. Questo perché gli assoni provenienti da neuroni olfattivi che esprimono un certo recettore confluiscono tutti ad uno (o pochi) glomeruli, in quella che viene definita organizzazione chemotopica (o a mappa olfattiva) dell'OB (Mombaerts, 2004). Questo ha portato a ritenere che i glomeruli potessero quindi essere un numero multiplo del numero di geni olfattivi (il doppio, il triplo, etc.). Il conto dei glomeruli nell'uomo indica che potrebbero esserci, nella nostra specie, addirittura tra 12 e 25 glomeruli per ogni recettore olfattivo. La spiegazione per questa variazione nel numero di multipli al momento non è nota. Guardando i dati tutti insieme, compresi quelli riportati nella presente tesi, potrebbe anche sembrare che la massa dell'animale stesso giochi un qualche ruolo, ma solo ulteriori studi quantitativi su specie più diversificate dal punto di vista delle dimensioni corporee potrà dare indicazioni su questo punto. Sappiamo che l'organizzazione chemotopica nei condroitti, si mescola ad una possibile organizzazione somatotopica, che prevede la presenza di più sottobulbi ripetuti (Meredith et al., 2013) (Fig. 14).



**Figura 14:** schema del possibile arrangiamento della mappa glomerulare in *S. canicula*. a) ipotesi della mappa somatotopica ripetuta nei due emi-bulbi. b) ipotesi della mappa somatotopica diversa nei due emi-bulbi.

Nello *S. canicula* i sottobulbi (appena accennati) sono eventualmente solo due, appunto definiti emi-bulbi (mediale e laterale) e pertanto si potrebbe assistere ad una duplicazione di territori glomerulari. In realtà il numero dei glomeruli contati nei due emi-bulbi non è uguale; infatti, l'emi-bulbo mediale contiene il 62% dei glomeruli, e pertanto l'idea di una totale duplicazione della mappa glomerulare sembra poco probabile. Sembra piuttosto più probabile una organizzazione come in Fig. 14b, dove ognuno dei due emi-bulbi non sia il duplicato dell'altro.

Le difficoltà nel riconoscimento dei singoli glomeruli riscontrate anche in letteratura, hanno portato a ritenere che per valutare con meno incertezza la mappa glomerulare si potessero individuare dei cluster di glomeruli che potessero essere più semplici da riconoscere tra una sezione e l'altra e pertanto da seguire per tutta la loro estensione. L'approccio con analisi dei cluster è stato utilizzato anche in altre specie, quali lo zebrafish (Baier e Korsching, 1994), la lampreda (Frontini et al., 2003) e lo *Xenopus* (Weiss et al., 2020). Anche i cluster che abbiamo individuato, come i glomeruli, sono disomogenei nelle dimensioni e, più dei glomeruli, sono disomogenei anche nella forma.

Il grande numero di glomeruli in *S. canicula* ha reso molto complicata la ricerca di una stereotipia della mappa glomerulare, per la difficoltà di riconoscere i glomeruli in modo individuale. Ci siamo focalizzati sui più grandi e riconoscibili

osservando che tre di questi sono stati riscontrati con dimensione relativa e posizione simile in due esemplari diversi. Questo ci indica che, come visto ad esempio in zebrafish (Baier e Korsching, 1994), anche nell'OB di *S. canicula* potrebbe esserci una parziale stereotipia dei glomeruli. Il fatto che i glomeruli più grandi siano tre depone a favore dell'asimmetria dei due emi-bulbi.

Le informazioni molecolari presenti sul sistema olfattivo dei condroitti e dello stesso *S. canicula* indicano delle peculiarità. Benché agli squali vengano attribuite generalmente ottime capacità olfattive, questo gruppo ha il repertorio genico di recettori olfattivi che è il più piccolo tra quelli conosciuti (Tab. IV).

Se consideriamo, oltre al numero di geni, anche l'espressione di questi nel sistema olfattivo vediamo che in *S. canicula* sono espressi al massimo 33 diversi geni.

Il numero di geni può essere confrontato con il numero di glomeruli ottenendo quello che si chiama fattore di convergenza, che indica a quanti diversi glomeruli dovrebbero confluire gli assoni di neuroni olfattivi che esprimano un certo recettore.

Nel topo e nel ratto tale fattore è di circa 1,4 (cioè, gli assoni di neuroni che esprimono un certo recettore confluiranno a 1 o 2 glomeruli), nell'uomo invece circa 16 (Maresh et al., 2008) o, secondo altri calcoli, da 12 a 25 (vedi Tab. IV). Nello zebrafish i geni olfattivi sono 305 (Saraiva et al., 2015) mentre i glomeruli, come detto precedentemente, sono probabilmente tra 80 (Baier e Korsching, 1994), e pertanto il valore di convergenza sarebbe 0,26, e 120 (Braubach e Croll, 2021), e in questo caso il valore sarebbe 0,39. In entrambi i casi il valore è minore di 1 e pertanto ogni glomerulo dovrebbe gestire le informazioni provenienti da neuroni che esprimono più recettori olfattivi.

Considerando il numero di glomeruli attorno ai 410 avremmo in *S. canicula* una convergenza di circa 12, più vicina a quella mammiferi e in particolare dell'uomo, che non a quella di un altro pesce.

## CONCLUSIONI

Questo lavoro è il primo tentativo di descrizione quantitativa dell'OB, e in particolare dello strato glomerulare, di un condroitto. L'esigenza di questo studio nasceva in parte dalla necessità di colmare un vuoto di conoscenza relativa a questa regione encefalica dei condroitti, ma anche da pubblicazioni recenti che hanno dimostrato come questa classe di vertebrati sia molto particolare per quello che concerne il repertorio di geni olfattivi.

I risultati qui riportati sono stati discussi principalmente confrontandoli con i dati relativi a pochi altri vertebrati, perché studi di questo tipo sono ancora piuttosto rari, probabilmente a causa delle grosse difficoltà metodologiche che ho riscontrato anche io e che diventano maggiori al crescere delle dimensioni dell'animale.

Nella specie *S. canicula* lo strato glomerulare è, in proporzione al volume complessivo dell'OB, il più grande tra quelli conosciuti. I glomeruli hanno dimensioni variabili ma i più grandi, sono più grandi tra quelli descritti per altri vertebrati. Questo potrebbe essere messo in relazione alla proporzionalmente ampia superficie olfattiva nei condroitti.

Il numero di glomeruli si situa tra quello dello zebrafish e quelli dei mammiferi per cui questo dato è conosciuto, ma è altissimo se si considera il numero di geni olfattivi presenti in questa specie.

Come riscontrato anche in zebrafish e topo, la mappa glomerulare è parzialmente conservata tra individui diversi.

I dati ottenuti da questo lavoro e dalla letteratura relativi ai valori di convergenza dei recettori olfattivi ai glomeruli, sono abbastanza sorprendenti e mostrano che la teoria di un recettore/1 glomerulo è stata probabilmente pensata dopo aver descritto quantitativamente il sistema olfattivo di mammiferi modello quali topo e ratto. I dati su altri mammiferi come ad esempio l'uomo, e su altri vertebrati, come quelli che sono riportati in questo lavoro, indicano abbastanza chiaramente che la relazione tra repertorio genico e glomeruli è molto più complessa. Le grosse differenze riscontrate potrebbero essere alla base di meccanismi di codifica e di elaborazione degli odori molto diverse nelle diverse specie di vertebrato.

# BIBLIOGRAFIA

Aicardi, S. Analisi del bulbo olfattivo di due specie di Galeomorphii mediante la tecnica di frazionamento isotropico (2019). Tesi di Laurea Magistrale in Biologia ed Ecologia Marina.

Aicardi, S. Comparative anatomy of the elasmobranchs olfactory system. Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie del Mare. (2023)

Belluscio, L., & Katz, L. C. Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *Journal of Neuroscience*, (2001) 21(6), 2113-2122.

Braubach, O., & Croll, R. P. The glomerular network of the zebrafish olfactory bulb. *Cell and Tissue Research*, (2021). 383(1), 255-271.

Carrera, I., Ferreiro-Galve, S., Sueiro, C., Anadón, R., and Rodríguez-Moldes, I. Tangentially migrating GABAergic cells of sub-pallial origin invade massively the pallium in developing sharks. *Brain Res. Bull.* (2008) 75: 405–409.

Coolen M, Menuet A, Chassoux D, Compagnucci C, Henry S, Lévèque L, ... & Mazan S. The dogfish *Scyliorhinus canicula*: a reference in jawed vertebrates. *Cold Spring Harbor Protocols*, (2008) pdb-emo111

Cossio-Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas Vitoria, R., Hochmuller Fogaça, R. T., & Arruda, M. D. Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. *Nutricion Hospitalaria*, (2013) 28(6), 2151-2156.

Cox, J.P., Hydrodynamic aspects of fish olfaction. *Journal of the Royal Society Interface*, (2008), 5(23), pp.575-593.

Cox, M.A., Garwood, R.J., Behnsen, J., Hunt, J.N., Dalby, L.J., Martin, G.S., Maclaine, J.S., Wang, Z. and Cox, J.P., Olfactory flow in the sea catfish, *Ariopsis felis* (L.): Origin, regulation, and resampling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, (2021), 256, p.110933.

Dearden, Richard P., Rohan Mansuit, Antoine Cuckovic, Anthony Herrel, Dominique Didier, Paul Tafforeau, and Alan Pradel. "The morphology and evolution of chondrichthyan cranial muscles: A digital dissection of the elephantfish *Callorhynchus milii* and the catshark *Scyliorhinus canicula*." *Journal of Anatomy* 238, no. 5 (2021): 1082-1105.

Dryer L, and Graziadei PPC A. pilot study on morphological compartmentalization and heterogeneity in the elasmobranch olfactory bulb. *Anat Embryol* (1993) 188:41-51.

Eiben, R., & Bomhard, EM. Andamento della mortalità, del peso corporeo e dell'incidenza tumorale nei ratti Wistar in 20 anni. *Experimental and Toxicologic Pathology*, (1999) 51 (6), 523-536.

Ellis, JR; Shackley, SE. The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, UK. *Journal of Fish Biology*, (1997), 51.2: 361-372.

Ferrando S, Bottaro M, Gallus L, Girosi L, Vacchi M, Tagliafierro G. Observations of crypt neuron-like cells in the olfactory epithelium of a cartilaginous fish. (2006), *Neurosci Lett* 403: 280–282.

Ferrando S, Bottaro M, Gallus L, Girosi L, Vacchi M, Tagliafierro G. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase immunoreactivity in the olfactory epithelium of small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* (L.): possible presence of ion exchanging cells? (2006), *J Fish Biol* 69 (Suppl B): 278–282.

Ferrando, S., Gambardella, C., Ravera, S., Bottero, S., Ferrando, T., Gallus, L., Manno, V., Salati, A.P., Ramoino, P. and Tagliaferro, G., Immunolocalization of G-protein alpha subunits in the olfactory system of the cartilaginous fish *Scyliorhinus canicula*. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, (2010), 292(11), pp.1771-1779.

Ferrando, S., Gallus, L., Gambardella, C., Ghigliotti, L., Ravera, S., Vallarino, M., Vacchi, M. and Tagliaferro, G., Cell proliferation and apoptosis in the olfactory epithelium of the shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of chemical neuroanatomy*, (2010), 40(4), pp.293-300.

Ferrando, S., Gallus, L., Gambardella, C., Amaroli, A., Cutolo, A., Masini, M.A., Vallarino, M. and Vacchi, M., Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactivity in the olfactory system of a cartilaginous fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, (2012), 43(2), pp.133-140.

Ferrando, Sara, Lorenzo Gallus, Laura Ghigliotti, Andrea Amaroli, Ghulam Abbas, and Marino Vacchi. "Clarification of the terminology of the olfactory lamellae in Chondrichthyes." *The Anatomical Record* 300, no. 11 (2017): 2039-2045.

Franceschini V, and Ciani F. Lectin biniding to olfactory system in a shark, *Scyliorhinus canicula*. *Folia Histochem Cytobiol* (1993) 31(3):133-137.

Fuller, C. L., Yettaw, H. K., & Byrd, C. A. Mitral cells in the olfactory bulb of adult zebrafish (*Danio rerio*): morphology and distribution. *Journal of Comparative Neurology*, (2006) 499(2), 218-230.

Genome Assembly sScyCan1.1 Dec 17, 2020

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_902713615.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_902713615.1/)

Grus, W. E., & Zhang, J. Distinct evolutionary patterns between chemoreceptors of two vertebrate olfactory systems and the differential tuning hypothesis. *Molecular biology and evolution*, (2008) 25(8), 1593-1601.

Liberles S. D., Buck L. B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* (2006) 442, 645–650.

Jia C., Halpern M. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins ( $G_{i\alpha 2}$  and  $G_{o\alpha}$ ) and segregated projection to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* (1996) 719, 117–128

Kosaka, K., & Kosaka, T. Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anatomical science international* (2005). 80(2), 80-90.

Krautwurst, D. Human olfactory receptor families and their odorants. *Chemistry & Biodiversity*, (2008) 5(6), 842-852.

Mallam, I., Nwagu, B. I., Kabir, M., Alao, R. O., & Alu, M. A. Phenotypic Correlation of Body Weight and Linear Body Measurement in New Zealand white and Chinchilla Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Nigerian Journal of Animal Production*, (2018) 16-18.

Malnic B. Hirono J. Sato T. Buck L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* (1999) 96, 713–723.

Maresh, A., Rodriguez Gil, D., Whitman, M. C., & Greer, C. A. Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb—implications for odor processing. *PloS one*, (2008) 3(7), e2640.

Meisami, E. A new morphometric method to estimate the total number of glomeruli in the olfactory bulb. *Chemical senses*, (1990) 15(4), 407-418.

Meredith TL, Kajiura SM, and Hansen A. The Somatotopic Organization of the Olfactory Bulb in Elasmobranchs. *J Morphol* (2013) 274:447-455.

Mombaerts, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, (2004). 5(4), 263-278.

Murakami, S., Ohki-Hamazaki, H. and Uchiyama, Y., Olfactory placode generates a diverse population of neurons expressing GnRH, somatostatin mRNA, neuropeptide Y, or calbindin in the chick forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, (2022), 530(17), pp.2977-2993.

Nazareth, L., Lineburg, K. E., Chuah, M. I., Tello Velasquez, J., Chehrehasa, F., St John, J. A., & Ekberg, J. A. Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*, (2015), 523(3), 479-494.

Nieuwenhuys R Anatomia comparata dei centri e dei tratti olfattivi. In: Progressi nella ricerca sul cervello. Zotterman Y (ed) Elsevier (Amsterdam) (1967) 23: 1-64

Nicklin, Ella F., Karly E. Cohen, Rory L. Cooper, Gianna Mitchell, and Gareth J. Fraser. "Evolution, development, and regeneration of tooth-like epithelial appendages in sharks." *Developmental biology* 516 (2024): 221-236.

Patthey, C., Schlosser, G., and Shimeld, S.M., The evolutionary history of vertebrate cranial placodes – I: cell type evolution. *Developmental biology*, (2014), 389(1), pp.82-97.

Poncelet, G. and Shimeld, S.M., The evolutionary origins of the vertebrate olfactory system. *Open biology*, (2020), 10(12), p.200330.

Pose-Méndez, Sol, Eva Candal, Sylvie Mazan, and Isabel Rodríguez-Moldes. Morphogenesis of the cerebellum and cerebellum-related structures in the shark *Scyliorhinus canicula*: insights on the ground pattern of the cerebellar ontogeny. *Brain Structure and Function* 221, no. 3 (2016): 1691-1717.

Quignon, P., Giraud, M., Rimbault, M., Lavigne, P., Tacher, S., Morin, E., ... & Galibert, F. The dog and rat olfactory receptor repertoires. *Genome biology*, (2005) 6(10), R83.

RODRÍGUEZ-CABELLO, Cristina; SÁNCHEZ, Francisco; OLASO, I. Distribution patterns and sexual segregations of *Scyliorhinus canicula* (L.) in the Cantabrian Sea. *Journal of Fish Biology*, (2007), 70.5: 1568-1586.

Rodríguez-Moldes, Isabel, and Santiago Pereira-Guldrís. "Embryonic development of the inner ear of the catshark *Scyliorhinus canicula*." *Brain, Behavior and Evolution* (2025).

Royet, J. P., Souchier, C., Jourdan, F., & Ploye, H. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *Journal of Comparative Neurology*, (1988), 270(4), 559-568.

Royet, J. P., Distel, H., Hudson, R., & Gervais, R. A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain research* (1998), 788(1-2), 35-42.

Sama-ul-haq, TM, e Lone, KP. Differenze legate all'età e al genere nei glomeruli del bulbo olfattivo negli esseri umani. *Biomedica*, (2008) 24, 12-17.

Saraiva, L. R., Ahuja, G., Ivandic, I., Syed, A. S., Marioni, J. C., Korsching, S. I., & Logan, D. W. Molecular and neuronal homology between the olfactory systems of zebrafish and mouse. *Scientific reports* (2015). 5(1), 11487.

Schneider CA, Rasband WS, and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* (2012), 9:671-675.

Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N. and Hewitt Coleman, J., Stem, and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *Journal of Comparative Neurology*, (2017), 525(4), pp.1034-1054.

Sterzi G Il Sistema Nervoso Centrale dei Vertebrati. Draghi, (1909) (Padova) 812-825

Syed, A. S., Sharma, K., Policarpo, M., Ferrando, S., Casane, D., & Korsching, S. I. Ancient and nonuniform loss of olfactory receptor expression renders the shark nose a de facto vomeronasal organ. *Molecular Biology and Evolution* (2023). 40(4), msad076.

Venkatesh, B., Lee, A.P., Ravi, V., Maurya, A.K., Lian, M.M., Swann, J.B., Ohta, Y., Flajnik, M.F., Sutoh, Y., Kasahara, M. and Hoon, S. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature* (2014) 505(7482), pp.174-179.

Weber, R.K. and Werner, J.A., Function of the Turbinates: Nasal Cycle. In *Nasal Physiology and Pathophysiology of Nasal Disorders*, (2013), (pp. 273-280). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Wilga CA and Ferry LA. Functional anatomy and biomechanics of feeding in elasmobranchs. *Fish Physiol.* (2015), 34:153-187.

Yan, Z., Tan, J., Qin, C., Lu, Y., Ding, C. and Luo, M., 2008. Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron*, 58(4), pp.613-624.

Yang, Y., Smith Jr, D. L., Keating, K. D., Allison, D. B., & Nagy, T. R. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity*, (2014) 22(10), 2147-2155.

Yopak, KE, Lisney, TJ and Collin, SP. Not all sharks are “swimming noses”: variation in olfactory bulb size in cartilaginous fishes. *Brain Structure and Function*, (2015) 220(2) 1127-1143.

# RINGRAZIAMENTI

Bene, siamo giunti alla fine di questo capitolo... vi voglio bene a tutti.

Un ringraziamento speciale va innanzitutto alla mia mamma e al mio papà, che mi hanno guidato e incoraggiato in ogni passo di questo percorso, soprattutto nei momenti in cui pensavo di non farcela. La vostra presenza costante e i vostri consigli mi hanno dato la forza di affrontare ogni difficoltà. Eravate sempre lì, pronti a spronarmi, a credere in me quando io stesso dubitavo, e a festeggiare con me ogni piccolo traguardo. Se oggi sono qui, a completare questo importante capitolo della mia vita, è grazie a voi, e spero un giorno di riuscire a ricambiare almeno in parte tutto l'amore e i sacrifici che avete fatto per me.

Un ringraziamento va anche a mio fratello, che nel suo piccolo mi ha dato supporto durante questo percorso. Non posso dimenticare poi tutta la mia famiglia: a mio nonno, che nonostante le difficoltà è sempre riuscito a starmi accanto, a mia zia, a mio zio e ai miei cugini, che, anche se lontani, non hanno mai fatto mancare il loro affetto e la loro presenza. Grazie a tutti voi per essere stati i miei punti di riferimento, soprattutto nei momenti più difficili.

Un ringraziamento sincero va anche ai miei amici: da quando vi ho conosciuto siete sempre stati al mio fianco, condividendo con me momenti di gioia e leggerezza, ma anche sostenendomi nelle difficoltà. La vostra presenza è stata per me un punto di equilibrio, che ha alleggerito le preoccupazioni con una risata, una battuta o semplicemente con la vostra compagnia.

Ogni uscita, ogni chiacchierata e ogni ricordo costruito insieme hanno contribuito a rendere questo percorso più sereno e ricco di significato. Sapere di poter contare su di voi, non solo come compagni di avventure ma come una vera e propria seconda famiglia, è stato per me un dono prezioso.

Infine, un ringraziamento speciale va a te, Ila. Sei stata la mia forza e il mio sostegno più grande, la persona che ha saputo starmi accanto nei momenti più difficili, quelli che solo tu hai visto davvero. Sapevi sempre come sostenermi e cosa dire per risollevarmi. Quando ero giù di morale e le mie energie erano così scarse da spingermi quasi a cedere, tu eri lì: pronta a tendermi la mano, ad avvolgermi in un abbraccio capace di cancellare paure e incertezze e a donarmi la serenità di cui avevo più bisogno. Con la tua dolcezza e la tua energia mi hai insegnato che anche nei momenti più bui si può trovare la forza di andare avanti, purché si abbia accanto la persona giusta.

Se oggi riesco a guardare con fiducia agli ostacoli della vita, è anche grazie a te, alla tua presenza costante, al tuo amore incondizionato e alla pazienza con cui mi hai sempre sostenuto. Questo ringraziamento è soprattutto per te, perché senza di te non avrei avuto la stessa determinazione e la stessa forza interiore. Ti amo immensamente.

Concludo con un grande grazie e un forte **vi voglio bene** a tutti voi.