



Università di Genova

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

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

Corso di Laurea in Biologia ed Ecologia Marina

Anatomia quantitativa dell'encefalo in quattro specie di teleostei

Relatrice

Prof.ssa Sara Ferrando

Correlatrice

Prof.ssa Simona Candiani

Candidata

Beatrice Risso

Anno Accademico 2020/2021

A mio cugino Stefano,
eccelso Insegnante di sostegno e amante della Cultura e dell'Arte

Sommario

1. Riassunto	1
2. Introduzione	2
<i>Il sistema nervoso dei Vertebrati</i>	<i>2</i>
Il neurone	2
Corpo cellulare.....	3
Il citoscheletro.....	4
Il nucleo	4
La membrana cellulare.....	5
I dendriti.....	5
L'assone	5
La guaina mielinica.....	6
Le cellule gliali	6
Gli astrociti	6
Gli oligodendrociti	6
Le cellule di Schwann.....	7
La microglia.....	7
<i>L'encefalo dei Teleostei.....</i>	<i>7</i>
Bulbi olfattivi.....	11
Telencefalo	11
Mesencefalo.....	12
Cervelletto.....	13
Ipotalamo	14
<i>Le specie analizzate</i>	<i>14</i>
<i>Antimora rostrata</i> (Günther, 1878).....	14
<i>Dissostichus eleginoides</i> (Smitt, 1898).....	15
<i>Pleuragramma antarctica</i> (Boulenger, 1902).....	16
<i>Trachurus mediterraneus</i> (Steindachner, 1868).....	18
3. Scopo del lavoro	20
4. Materiali e metodi.....	22
<i>Campionamento e fissazione</i>	<i>22</i>
<i>Campioni anatomici prelevati</i>	<i>22</i>
<i>Lunghezza e massa</i>	<i>23</i>
<i>Analisi regioni encefaliche</i>	<i>24</i>
Massa.....	24
Volumi.....	24
Frazionamento isotropico.....	25
Conta cellule	25
Conta neuroni.....	26

<i>Dati</i>	27
<i>Analisi statistiche</i>	28
Analisi univariata della varianza (ANOVA).....	28
Test di Kruskal-Wallis.....	28
Correlazione fra variabili.....	29
Regressioni.....	29
Analisi delle componenti principali (PCA).....	29
<i>Analisi bioinformatiche</i>	29
5. Risultati	32
<i>Relazione massa corporea – lunghezza corporea</i>	32
<i>Relazione massa encefalica – massa corporea</i>	32
<i>Bulbi olfattivi</i>	33
Cellule totali.....	33
Densità cellulare.....	34
Massa relativa.....	35
Volume [mm ³].....	36
Relazione massa e cellule totali.....	36
Relazione densità cellulare e massa.....	37
Relazione massa bulbi olfattivi e massa encefalica.....	37
<i>Cervelletto</i>	38
Cellule totali.....	38
Densità cellulare.....	39
Massa relativa.....	40
Volume [mm ³].....	41
Relazione massa e cellule totali.....	42
Relazione densità cellulare e massa.....	43
Relazione massa cervelletto e massa encefalica.....	43
Relazione massa e volume.....	44
<i>Ipotalamo</i>	44
Cellule totali.....	45
Densità cellulare.....	46
Massa relativa.....	46
Volume [mm ³].....	47
Relazione massa e cellule totali.....	48
Relazione densità cellulare e massa.....	49
Relazione massa ipotalamo e massa encefalica.....	49
Relazione massa e volume.....	50
<i>Mesencefalo</i>	50
Cellule totali.....	51
Densità cellulare.....	52
Massa relativa.....	52
Volume [mm ³].....	53

Relazione massa e cellule totali	54
Relazione densità cellulare e massa	54
Relazione massa mesencefalo e massa encefalica.....	55
Relazione massa e volume	55
<i>Telencefalo</i>	56
Cellule totali.....	56
Densità cellulare	57
Massa relativa	58
Volume [mm ³]	59
Relazione massa e cellule totali	60
Relazione densità cellulare e massa	60
Relazione massa telencefalo e massa encefalica	61
Relazione massa e volume	61
<i>Analisi delle componenti principali (PCA)</i>	62
<i>Analisi sequenze RBFOX3</i>	63
6. Discussioni	65
<i>Relazione massa corporea – lunghezza corporea</i>	65
<i>Relazione massa encefalica – massa corporea</i>	65
<i>Bulbi olfattivi</i>	67
<i>Cervelletto</i>	68
<i>Ipotalamo</i>	72
<i>Mesencefalo</i>	74
<i>Telencefalo</i>	76
<i>PCA</i>	79
<i>RBFOX3</i>	79
7. Conclusioni	80
8. Bibliografia.....	82

1. Riassunto

In letteratura, la dimensione dell'encefalo e quella delle sue regioni sono state utilizzate nella prospettiva di un loro utilizzo come proxy per tratti ecologico-comportamentali. Nonostante ciò, la dimensione, misurata come massa o volume, è solo uno dei tanti parametri quantitativi utilizzati per effettuare paragoni tra le specie. Un altro parametro, non prevedibile, è il numero di cellule, che dipende solo in parte dalla taglia. Dal momento che le funzioni del sistema nervoso sono rese possibili grazie alla presenza di circuiti cellulari, non è possibile trascurare il dato nel momento in cui si effettua una descrizione quantitativa dell'anatomia dell'encefalo. In letteratura sono state effettuate analisi sul numero cellulare per diverse specie di mammiferi e uccelli e solo su quattro specie di rettili. Ad oggi, solo una specie di pesce è stata analizzata.

Lo scopo di questa tesi è quello di descrivere quantitativamente l'encefalo di quattro specie di teleostei: un pesce di profondità, *Antimora rostrata* (Günther, 1878); un notothenioide sub-antartico, *Dissostichus eleginoides* (Smitt, 1898); un notothenioide antartico, *Pleuragramma antarctica* (Boulenger, 1902) e un pesce temperato di acque superficiali, *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1758). Per ciascuna specie tre encefali sono stati analizzati e suddivisi in regioni, per poi essere sottoposti al frazionamento isotropico.

P. antarctica ha un encefalo più piccolo rispetto a quanto atteso e anche il numero di cellule in ciascuna regione è esiguo. Sarebbe interessante poter relazionare queste osservazioni con il pedomorfismo che è stato descritto per questa specie. L'unica specie che vive in acque temperate, *T. mediterraneus*, mostra elevati valori di densità in tutte le regioni encefaliche (eccezione fatta per l'ipotalamo, dove le differenze tra specie non sono statisticamente significative, e per i bulbi olfattivi) indipendentemente dal range batimetrico e dal livello trofico. Si ipotizza che questo trend sia dovuto a un metabolismo maggiore nei pesci temperati. È interessante notare che, in letteratura, il numero di cellule nelle regioni encefaliche più dispendiose dei mammiferi, corteccia cerebrale e cervelletto, è influenzato dalle performance metaboliche in diverse specie appartenenti all'infraordine Cetacea. Nei pesci, mesencefalo e cervelletto rappresentano le regioni energeticamente più dispendiose e il trend osservato nelle specie analizzate supporterebbe questa ipotesi. Ciononostante, sarà necessario analizzare più specie per confermarla.

2. Introduzione

Il sistema nervoso dei Vertebrati

Il sistema nervoso può essere suddiviso in sistema nervoso centrale (SNC) e sistema nervoso periferico (SNP), sebbene i due siano in stretta continuità anatomica (D'Amato & Di Porzio, 2011).

Il SNC è costituito dall'encefalo, contenuto all'interno del cranio e protetto dalle meningi, e dal midollo spinale, protetto dagli archi neurali della colonna vertebrale (D'Amato & Di Porzio, 2011).

L'encefalo può essere diviso in diverse regioni, secondo un criterio di tipo ontogenetico: telencefalo, diencefalo, mesencefalo e rombencefalo (D'Amato & Di Porzio, 2011). Encefalo e midollo spinale possono essere anche indicati come “nevrasse” dove il midollo spinale e il tronco encefalico costituiscono la porzione assiale mentre il resto dell'encefalo costituisca la porzione soprassiale (D'Amato & Di Porzio, 2011).

Il SNP è costituito da nervi, gangli nervosi periferici e fasci di fibre nervose che si dipartono dal nevrasse per andare a innervare strutture anatomiche periferiche quali muscoli, articolazioni, ghiandole, vasi sanguigni e cute (D'Amato & Di Porzio, 2011). I nervi possono essere suddivisi in nervi spinali e nervi cranici (D'Amato & Di Porzio, 2011).

Il sistema nervoso è costituito da cellule specializzate che sono state suddivise in due categorie:

- Neuroni (o cellule nervose);
- Cellule gliali (o neuroglia o glia) che sono le cellule di supporto dei neuroni (Purves et al., 2001).

Neuroni e cellule gliali sono accomunati dall'aver gli organelli cellulari tipici di tutte le cellule: reticolo endoplasmatico, apparato Golgi, mitocondri, nucleo e diverse strutture vescicolari (Purves et al., 2001). In questi tipi cellulari si assiste a una aggregazione degli organelli in determinate porzioni cellulari; per esempio, i mitocondri nei neuroni si vengono a ritrovare maggiormente concentrati a livello sinaptico, mentre reticolo endoplasmatico e apparato di Golgi sono assenti nell'assone (Purves et al., 2001). Inoltre, le proteine costituenti il citoscheletro (e.g.: tubulina, miosina e actina) sono caratterizzate dall'aver un'organizzazione peculiare nei neuroni in modo che venga garantita la stabilità e funzione dei processi neuronali nonché della trasmissione sinaptica (Purves et al., 2001).

Il neurone

Il neurone è il principale costituente del sistema nervoso e grazie alle sue caratteristiche di eccitabilità e conducibilità conferisce al sistema nervoso le sue proprietà specifiche (Zaccheo & Pestarino, 2013).

La definizione di neurone come unità principale costituente il sistema nervoso deriva dalla “teoria del neurone” sostenuta da Santiago Ramon y Cajal che sosteneva, appunto, che i neuroni possono essere

considerati come unità indipendenti e che la trasmissione dell'impulso nervoso si verifica in assenza di fusione tra cellule, concetto derivante dalla “teoria reticularista” sostenuta da Camillo Golgi che rappresentava il sistema nervoso come una sorta di sincizio (Zaccheo & Pestarino, 2013). Oggigiorno è noto che la trasmissione dell'impulso elettrico tra neuroni è garantita da contatti definiti sinapsi (Zaccheo & Pestarino, 2013).

I neuroni hanno forma e volume estremamente variabili e risultano costituiti da (Zaccheo & Pestarino, 2013):

- Corpo cellulare;
- Prolungamenti che si dipartono dal pirenoforo:
 - Dendriti: comunemente indicati come la regione a cui giungono gli input;
 - Assone (o neurite): comunemente indicato come la zona da cui si origina l'output.

In base al numero di prolungamenti è possibile distinguere i neuroni in (Zaccheo & Pestarino, 2013):

- Unipolari;
- Bipolari;
- Pseudounipolari;
- Multipolari;
- Anassonici.

I neuroni possono essere classificati, in base alla funzione da loro svolta, in (Zaccheo & Pestarino, 2013):

- Sensitivi;
- Effettori (o motori);
- Interneuroni.

Corpo cellulare

Il corpo cellulare si distingue come uno slargamento nella struttura del neurone e ha un diametro che varia da 5 a 100 μm (Nieuwenhuys et al., 2014). All'interno del corpo cellulare si vengono a ritrovare (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Il nucleo: contiene il materiale genetico;
- La sostanza tigroide di Nissl: corrisponde al reticolo endoplasmatico ruvido (RER), costellato di ribosomi e polisomi adibiti alla sintesi proteica ma sono presenti anche ribosomi liberi nel citoplasma;
- Il reticolo endoplasmatico liscio (REL): si viene a ritrovare in prossimità del RER;

- L'apparato Golgi: appare come una struttura costituita da vescicole impilate e questa sua particolare conformazione lo rende facilmente distinguibile dal REL;
- I lisosomi: vacuoli contenenti fosfatasi acide ed enzimi idrolitici adibiti alla degradazione di materiale danneggiato;
- I mitocondri: misurano circa 0.1 μm in diametro e possono raggiungere una lunghezza massima di 20 μm e sono adibiti alla sintesi di ATP.

Il citoscheletro

Il citoscheletro è costituito da polimeri che si originano dalla ripetizione di monomeri portando alla formazione di microtubuli, neurofilamenti e microfilamenti (Nieuwenhuys et al., 2014).

I microtubuli sono costituiti da 13 protofilamenti derivanti dalla polimerizzazione di dimeri di tubulina (Zaccheo & Pestarino, 2013); i 13 protofilamenti si organizzano poi a formare la struttura tubulare tipica del microtubulo e possono raggiungere una lunghezza massima di 100 μm (Nieuwenhuys et al., 2014).

I neurofilamenti (o neurofibrille) sono la componente principale dell'assone e misurano 10 nm in diametro e sono costituiti da filamenti intermedi che si attorcigliano l'uno con l'altro (Nieuwenhuys et al., 2014).

I microfilamenti sono costituiti da actina che si organizza a formare strutture bielicoidali portando alla formazione di filamenti di 3-5 nm in diametro. I microfilamenti possono essere in connessione con la membrana plasmatica mediante proteine associate e connesse all'actina altrimenti possono prendere contatto con la matrice extracellulare mediante proteine transmembrana (le integrine) (Nieuwenhuys et al., 2014).

Il nucleo

Il nucleo si viene a localizzare al centro del corpo cellulare e contiene, al suo interno, un nucleolo cospicuo in dimensioni e di forma sferica (Nieuwenhuys et al., 2014). Il nucleo è delimitato dall'involucro nucleare, costituito da una doppia membrana, una interna e una esterna (Zaccheo & Pestarino, 2013). Il nucleo è in connessione con il resto dell'ambiente cellulare dal momento che sono presenti i pori nucleari, che mettono inoltre in connessione membrana interna ed esterna del nucleo (Zaccheo & Pestarino, 2013). I pori sono costituiti dal complesso del poro, una struttura multiproteica (Zaccheo & Pestarino, 2013), con un diametro di circa 90 nm (Nieuwenhuys et al., 2014) ma data la presenza delle proteine costituenti il complesso il diametro effettivo risulta alla fine essere di 15 nm circa (Nieuwenhuys et al., 2014). All'interno del nucleo risiede il materiale genetico della cellula, il DNA.

La membrana cellulare

La membrana circonda e definisce la forma cellulare ed è rappresentata da un doppio strato lipidico dello spessore di circa 4-5 nm, i cui costituenti sono fosfolipidi, colesterolo e glicolipidi (Nieuwenhuys et al., 2014). Sono inoltre presenti proteine con diverse funzioni, tra queste troviamo i canali ionici a voltaggio dipendenti fondamentali nel conferire le proprietà elettriche tipiche dei neuroni (Nieuwenhuys et al., 2014).

I dendriti

I dendriti sono espansioni del protoplasma adibiti alla ricezione di stimoli da parte di altre cellule o dall'ambiente esterno (Nieuwenhuys et al., 2014). Variano per numero, forma ed estensione e al loro interno si vengono a ritrovare reticolo endoplasmatico, ribosomi, mitocondri, vescicole del reticolo endoplasmatico liscio, microvescicole, lisosomi, neurotubuli (abbondanti) e neurofilamenti (non molto abbondanti) (Nieuwenhuys et al., 2014; Zaccheo & Pestarino, 2013). Una caratteristica peculiare dei dendriti, non presente negli assoni, sono le spine, strutture filiformi presenti nella porzione terminale, dalla lunghezza di 1-2 μm , che rappresentano il punto di contatto della maggior parte delle sinapsi chimiche mentre le sinapsi inibitorie stabiliscono contatti direttamente con i tronchi e le ramificazioni dendritiche (Nieuwenhuys et al., 2014). Le spine sono ricche al loro interno di actina (Nieuwenhuys et al., 2014).

L'assone

L'assone origina da un prolungamento conico del corpo cellulare ma sono noti casi in cui l'assone origina in prossimità dei dendriti (Nieuwenhuys et al., 2014). All'interno dell'assone si vengono a ritrovare neurotubuli, neurofilamenti, mitocondri allungati e profili tubulari del reticolo endoplasmatico liscio (Zaccheo & Pestarino, 2013). Spesso gli assoni, a livello della porzione terminale, presentano una struttura ramificata chiamata "telodendro" che termina con i bottoni sinaptici (Nieuwenhuys et al., 2014). I bottoni sinaptici contengono al loro interno le vescicole con i neurotrasmettitori ma gli assoni, oltre a formare bottoni sinaptici, possono partecipare alla formazione di giunzioni strette mettendo quindi in comunicazione il citoplasma della cellula pre- e post-sinaptica (Nieuwenhuys et al., 2014). In base alla struttura dell'assone è possibile distinguere due tipi di neuroni (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Cellule del Golgi di tipo I: hanno un assone particolarmente lungo che si allontana di molto dalla cellula che lo ha originato e l'assone è generalmente mielinizzato;
- Cellule del Golgi di tipo II: posseggono un assone molto breve che si ramifica in una regione definita dall'albero dendritico e generalmente non è mielinizzato.

La guaina mielinica

Gli assoni possono avere una guaina mielinica (Nieuwenhuys et al., 2014). A livello del SNC la guaina viene a essere prodotta dagli oligodendrociti mentre nel SNP dalle cellule di Schwann (Nieuwenhuys et al., 2014; Zaccheo & Pestarino, 2013). Un assone mielinizzato viene a essere avvolto da più oligodendrociti o cellule di Schwann e la mielina si interrompe periodicamente in corrispondenza dei nodi di Ranvier (Zaccheo & Pestarino, 2013). La principale funzione della mielina è quella di aumentare la velocità di conduzione da 10 a 100 volte (Nieuwenhuys et al., 2014; Zaccheo & Pestarino, 2013).

Le cellule gliali

Oltre ai neuroni, nel sistema nervoso si vengono a ritrovare le cellule gliali che svolgono funzione trofica e di supporto nei confronti dei neuroni e sono in stretta connessione con i vasi sanguigni (Zaccheo & Pestarino, 2013). Le cellule gliali sono rappresentate da: astrociti, oligodendrociti, cellule di Schwann e microglia (Zaccheo & Pestarino, 2013).

Gli astrociti

Gli astrociti, così chiamati per la loro forma a stella visibile al microscopio ottico, sono distinguibili in astrociti protoplasmatici e fibrosi ma sono entrambi accumulati dall'espressione della proteina gliofibrillare acida (GFAP) che ne consente l'identificazione immunostochimica (Nieuwenhuys et al., 2014; Zaccheo & Pestarino, 2013). Gli astrociti protoplasmatici sono abbondanti nella sostanza grigia e, a differenza degli astrociti fibrosi ricchi in fibrille e abbondanti nella sostanza bianca, sono poveri in fibrille al loro interno (Nieuwenhuys et al., 2014). Sono adibiti allo svolgimento di diverse funzioni: formazione della guaina limitante gliale del SN, formazione della barriera ematoencefalica, re-uptake di neurotrasmettitori, rimozione dell'eccesso di ioni potassio (K^+), formano la cicatrice gliale in caso di lesioni o patologie neurodegenerative, guidano la migrazione cellulare nello sviluppo e formazione della sinapsi tripartita in caso di instaurazione di contatto sinaptico (Zaccheo & Pestarino, 2013).

Gli oligodendrociti

Gli oligodendrociti sono implicati nel formare la guaina mielinica intorno agli assoni dei neuroni localizzati a livello del SNC, per questo motivo si vengono a ritrovare a livello della sostanza bianca; nonostante ciò, è possibile ritrovarli anche a livello della sostanza grigia dal momento che anche qui è possibile ritrovarvi mielina (Nieuwenhuys et al., 2014). Esprimono diverse molecole specifiche, tra cui la proteina basica della mielina (MBP) (Zaccheo & Pestarino, 2013). Un singolo oligodendrocita avvolge un solo segmento internodale ma un singolo oligodendrocita può essere implicato nell'avvolgere più assoni di neuroni diversi (Zaccheo & Pestarino, 2013).

Le cellule di Schwann

Le cellule di Schwann sono adibite a circondare di mielina un assone a livello del SNP (Zaccheo & Pestarino, 2013).

La microglia

Le cellule della microglia svolgono funzione fagocitaria e derivano, molto probabilmente, da macrofagi prodotti durante l'emopoiesi primitiva del sacco vitellino (Zaccheo & Pestarino, 2013).

L'encefalo dei Teleostei

I Teleostei appartengono, insieme a Holostei (comprendenti amidi e lepisosteidi) e Chondrostei (comprendenti poliodonti e storioni) alla sottoclasse Actinopterygii, la più diversa sottoclasse di pesci viventi (Mitchell et al., 1991). I Teleostei contano tra le 20.000 e le 25.000 specie (Mitchell et al., 1991; Nieuwenhuys et al., 2014). Dal momento che i primi Teleostei sono esistiti ben prima dell'avvento dei Tetrapodi, questi sono andati incontro a un notevole differenziamento portando, al giorno d'oggi, ad avere specie adattate a diverse nicchie presenti sia in acqua dolce sia in acqua salata (Nieuwenhuys et al., 2014). Questo lungo percorso evolutivo che ha interessato le specie di Teleostei ha portato le varie specie a presentare differenze a livello del sistema nervoso centrale attribuibili sia al processo evolutivo sia all'adattamento alle nicchie (Nieuwenhuys et al., 2014).

Analogamente a quanto avviene in tutti gli altri vertebrati, la funzione principale del sistema nervoso dei Teleostei è quella di coordinare le interazioni tra organismo e ambiente esterno (Nieuwenhuys et al., 2014). Le interazioni con l'ambiente sono rese possibili grazie alla presenza di organi di senso e al sistema muscolare, che mediante l'utilizzo di nervi cranici e periferici permettono di far giungere informazioni, sotto forma di impulsi elettrici, al sistema nervoso centrale (Nieuwenhuys et al., 2014).

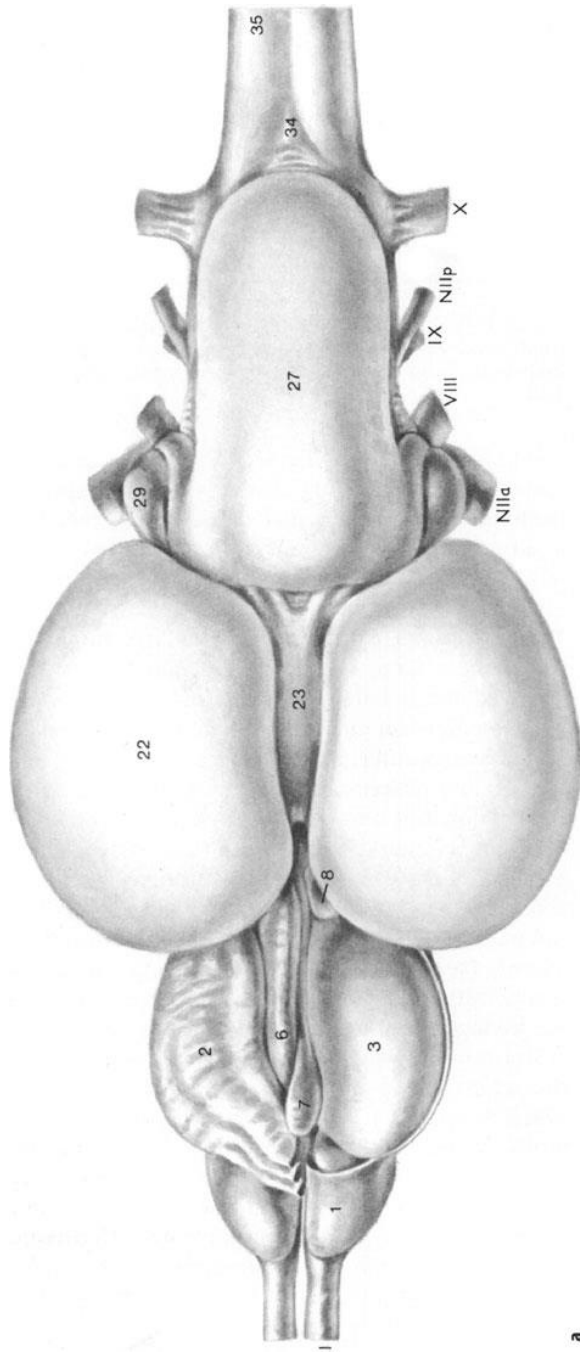
Movimenti attivi e comportamentali sono resi possibili grazie alla presenza dell'apparato muscolo-scheletrico, mentre le informazioni sull'ambiente vengono captate dagli organi di senso olfattivi, gustativi, visivi, vestibolari e somatosensitivi; inoltre, i pesci sono dotati di linea laterale, che fornisce informazioni circa pressione e correnti, e alcuni gruppi sono dotati di organi elettrosensitivi, che consentono di percepire campi elettrici (Nieuwenhuys et al., 2014).

Il cervello dei Teleostei è costituito da (Nieuwenhuys et al., 2014):

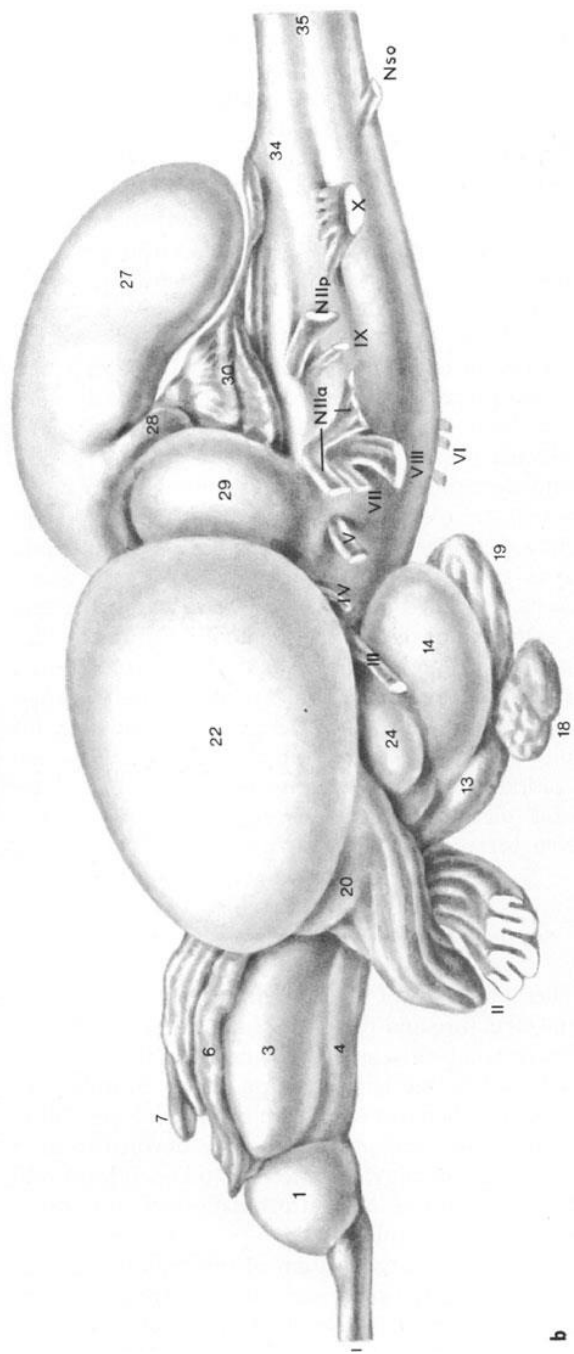
- Bulbi olfattivi;
- Telencefalo;
- Mesencefalo;
- Diencefalo;
- Cervelletto;
- Romboencefalo;

- Nervi cranici:
 - I. Nervo olfattivo;
 - II. Nervo ottico;
 - III. Nervo oculomotorio;
 - IV. Nervo trocleare;
 - V. Nervo trigemino;
 - VI. Nervo abducens;
 - VII. Nervo faciale;
 - VIII. Nervo ottavo;
 - NIIa. Nervo della linea laterale anteriore;
 - NIIp- Nervo della linea laterale posteriore;
 - IX. Nervo glossofaringeo;
 - X. Nervo vago;
 - Nso. Nervo spinale-occipitale.

In questo lavoro i nervi non sono stati analizzati e le porzioni encefaliche prima citate sono, nella realtà, molto più complesse da un punto di vista strutturale, si rimanda alla Figura 1 per un maggior dettaglio. Nel presente lavoro non è stato possibile suddividere in maniera meticolosa tutte le porzioni presenti in Figura 1 a causa di una ridotta dimensione degli encefali analizzati.



a



b

- Telencephalon:**
- 1 bulbus olfactorius
 - 2 tela telencephali
 - 3 telencephalon dorsale
 - 4 telencephalon ventrale
 - 5 commissura anterior.
- Diencephalon:**
- 6 saccus dorsalis
 - 7 epiphysis (pineal organ)
 - 8 ganglion habenulae
 - 9 thalamus dorsalis
 - 10 thalamus ventralis
 - 11 regio preoptica
 - 12 tuberculum posterius
 - 13 hypothalamus
 - 14 lobus inferior hypothalami
 - 15 recessus intermedius (infundibuli)
 - 16 recessus lateralis (infundibuli)
 - 17 recessus posterior (infundibuli)
 - 18 hypophysis (pituitary gland)
 - 19 saccus vasculosus.

- Mesencephalon:**
 20 preectum superficiale
 21 commissura posterior
 22 tectum mesencephali
 23 torus longitudinalis
 24 torus lateralis
 25 tegmentum mesencephali.
- Rhombencephalon:**
 26 valvula cerebelli
 27 corpus cerebelli
 28 lobus caudalis cerebelli
 29 eminentia granularis
 30 tela ventriculi quarti
 31 crista cerebellaris
 32 nucleus fasciculi solitarii
 (lobus vagi)
 33 tegmentum rhombencephali
- 34 area postrema.
 Medulla spinalis
 35 Medulla spinalis
- Nervi cranii:**
 I nervus olfactorius
 II nervus opticus
 III nervus oculomotorius
 IV nervus trochlearis
 V nervus trigeminus
 VI nervus abducens
 VII nervus facialis
 VIII nervus octavus
 NIIa nervus linea lateralis anterior
 NIIp nervus lineae lateralis posterior
 IX nervus glossopharyngeus
 X nervus vagus
 Nso nervi spino-occipitales

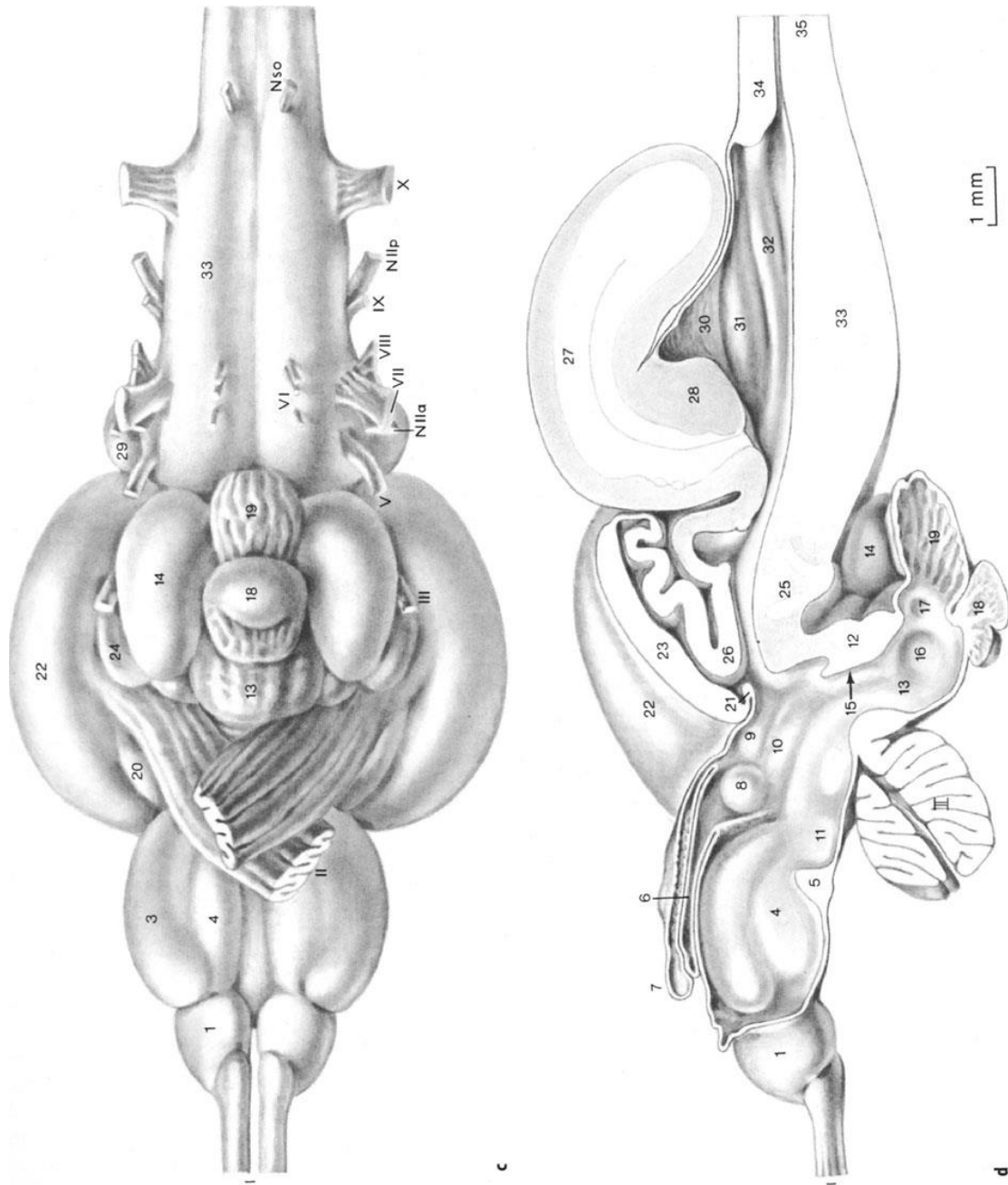


Figura 1: rappresentazione schematica dell'encefalo di *Salmo gairdneri* che rappresenta in maniera efficiente l'encefalo dei Teleostei. © Nieuwenhuys et al. (2014)

È importante sottolineare che *Salmo gairdneri* (Fig. 1) rappresenta mediamente come dovrebbe apparire l'encefalo di un Teleosteo ma ciascuna specie presenta delle peculiarità dovute alla diversità filogenetica e alla specializzazione funzionale (Nieuwenhuys et al., 2014).

Nei seguenti paragrafi verranno descritte le porzioni encefaliche che sono state analizzate negli encefali delle specie incluse in questo studio.

Bulbi olfattivi

I bulbi olfattivi ricevono, principalmente, afferenze primarie da parte dell'epitelio sensoriale olfattivo mediante il nervo olfattivo e, inoltre, dalle regioni telencefaliche (Nieuwenhuys et al., 2014). Nei Teleostei i bulbi olfattivi possono essere sessili o pedunculati. Nel caso dei bulbi olfattivi sessili (si veda Fig. 1), questi sono in diretto contatto con l'area ventrale del telencefalo e sono connessi all'epitelio olfattivo grazie alla presenza di un lungo nervo olfattivo. Per quanto concerne i bulbi olfattivi pedunculati, questi si vengono a ritrovare in prossimità dell'epitelio olfattivo e sono connessi al telencefalo mediante fibre olfattive secondarie (Nieuwenhuys et al., 2014).

I bulbi olfattivi dei Teleostei presentano i seguenti strati concentrici di cellule (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Strato esterno con le afferenze olfattive primarie;
- Strato glomerulare;
- Strato di cellule mitrali (o strato cellulare esterno);
- Strato interno (o massa di cellule) di cellule granulari.

I bulbi olfattivi sono di per certo implicati nei processi olfattivi con probabili risvolti nei processi di foraggiamento, nella localizzazione delle prede e nella fuga da possibili predatori (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Huber et al., 1997; Pollen et al., 2007).

Telencefalo

Il telencefalo è costituito da una parte ventrale e da una parte dorsale; secondo la classificazione di Nieuwenhuys et al. (2014), nel telencefalo rientrano anche i bulbi olfattivi ma in questo lavoro verranno trattati separatamente in quanto sono stati analizzati come parti a sé stanti.

L'area ventrale è localizzata in posizione rostrale rispetto alla zona preottica. Quest'area può essere a sua volta divisa in diverse porzioni (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Parte ventrale;
- Parte dorsale;
- Parte intermedia;
- Suddivisione sopracommissurale;
- Suddivisione postcommissurale;

- Parte laterale.

Tutte queste porzioni dell'area ventrale sono tutte implicate nell'elaborare gli input provenienti dai bulbi olfattivi (Nieuwenhuys et al., 2014). Le porzioni ventrale, dorsale, sopra commissurale, intermedia e laterale inviano proiezioni verso il bulbo olfattivo (Nieuwenhuys et al., 2014). Inoltre, la regione sopra commissurale sembra essere implicata nel regolare funzioni legate al sesso dell'organismo, riceve input dalle parti ventrale e dorsale, invia input verso i bulbi olfattivi e verso il tegmentum del mesencefalo e l'ipotalamo (Nieuwenhuys et al., 2014).

La porzione dorsale del telencefalo è predominante in termini di dimensioni e può essere suddivisa anch'essa in regioni (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Parte mediale;
- Parte laterale;
- Parte dorsale;
- Parte centrale.

Nonostante sia state identificate diverse connessioni tra telencefalo e altre porzioni encefaliche, la sua funzione nei Teleostei resta ancora ignota secondo Nieuwenhuys et al. (2014). Altri autori (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Huber et al., 1997; Park & Bell, 2010; Pollen et al., 2007) hanno portato alla luce alcune funzioni che sono di competenza del telencefalo: apprendimento, integrazione dei vari input sensoriali e spostamenti nell'ambiente; i medesimi autori suggeriscono che il telencefalo, a livello ecologico, possa favorire i processi di foraggiamento e comportamenti legati al foraggiamento medesimo e l'utilizzo dell'habitat. Stando a quanto affermato da Gonzalez-Voyer & Kolm (2010), il telencefalo dei ciclidi del Tanganika mostra dei pattern volumetrici specifici in relazione al sesso e in relazione al fatto che le specie siano monogame o poligame e quindi sembrerebbe avere un ruolo importante anche nei processi riproduttivi.

Mesencefalo

Il mesencefalo è costituito dal tegmentum, in posizione ventromediale, dal toro semicircolare, in posizione ventrolaterale, e il tectum (o tetto ottico) posizionato dorsalmente (Nieuwenhuys et al., 2014). Le strutture del tegmentum sono per lo più implicate nello svolgimento di funzione (pre)-motorie mentre il toro semicircolare e il tetto in funzioni sensoriali (Nieuwenhuys et al., 2014). Ciononostante, la suddivisione non è così rigida dal momento che anche il tetto è implicato nello svolgimento di alcune funzioni (pre)-motorie e nel tegmentum ci sono nuclei non implicati nello svolgimento di funzioni (pre)-motorie (Nieuwenhuys et al., 2014).

Il tegmentum, come già precedentemente descritto, è per lo più implicato nello svolgimento di funzioni (pre)-motorie e contiene la formazione reticolare, il nucleo del fascicolo longitudinale

mediale, il nucleo trocleare, il nucleo oculomotore, il nucleo precerebellare lateralis vaulvae e il nucleo interpeduncolare (Nieuwenhuys et al., 2014).

Il toro semicircolare, nei pesci Teleostei non elettrorecettivi, è implicato nel processare i segnali acustici e quelli provenienti dalla linea laterale (Nieuwenhuys et al., 2014).

Il tetto ottico ricopre i ventricoli del mesencefalo e viene generalmente chiamato così dal momento che è il target principale delle fibre retiniche (Nieuwenhuys et al., 2014). Nonostante il nome, il tetto non è solo implicato nel processare stimoli visivi ma è implicato anche nell'integrare informazioni visive con stimoli sensoriali di altro tipo, pertanto lo si può definire il centro di integrazione sensomotoria dei Teleostei (Nieuwenhuys et al., 2014). Da un punto di vista strutturale, il tetto ottico ha una struttura laminare e sono individuabili sette strati (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Stratum marginale;
- Stratum opticum;
- Stratum fibrosum et griseum superficiale;
- Stratum griseum centrale può essere suddiviso in:
 - a. Strato esterno;
 - b. Strato profondo;
- Stratum album centrale;
- Stratum periventricolare.

Visto quanto sopra scritto e quanto riportato in letteratura da altri autori (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Huber et al., 1997; Pollen et al., 2007) il mesencefalo svolge funzioni legate agli stimoli visivi e favorisce risposte legate all'orientamento nello spazio con risvolti ecologici probabili nei processi di foraggiamento, nei processi di detezione della preda e di evitamento dei predatori.

Cervelletto

Il cervelletto è la porzione più dorsale del rombencefalo e, nella maggior parte dei Teleostei, è una struttura particolarmente pronunciata e visibile sulla superficie dell'encefalo (Nieuwenhuys et al., 2014). Il cervelletto di Holostei e Teleostei è costituito da tre regioni principali (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Lobo caudale, con localizzazione vestibololaterale;
- Corpo, localizzato centralmente;
- Valvula cerebelli, localizzata rostralmente rispetto al corpo del cervelletto.

Il cervelletto dei Teleostei riceve numerose afferenze e da esso si dipartono numerose efferenze (Nieuwenhuys et al., 2014). Ciò nonostante, le sue funzioni note e principali concernono la coordinazione e l'apprendimento motorio e la propriocezione, quindi le sue probabili funzioni in

ambito ecologico riguardano l'utilizzo dell'habitat e i processi comportamentali e non legati al foraggiamento (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Huber et al., 1997; Pollen et al., 2007).

Ipotalamo

L'ipotalamo rappresenta la porzione più ventrale del diencefalo ed è in connessione con l'ipofisi mediante il peduncolo pituitario, che contiene le fibre nervose ipotalamiche e preottiche. L'ipotalamo dei teleostei può essere suddiviso in tre zone (Nieuwenhuys et al., 2014):

- Zona preentricolare;
- Regione tuberale, localizzata medialmente;
- Lobi inferiori.

Per quanto concerne le sue funzioni, è noto essere implicato nella regolazione neuroendocrina (date le sue connessioni con l'ipofisi), nei processi riproduttivi e nella regolazione comportamentale. A livello ecologico queste sue funzioni determinano il manifestarsi di particolari organizzazioni sociali degli organismi e al realizzarsi di peculiari comportamenti durante il periodo riproduttivo (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Pollen et al., 2007).

Le specie analizzate

***Antimora rostrata* (Günther, 1878)**

Antimora rostrata appartiene alla famiglia dei Moridae, ordine Gadiformes (si veda Fig. 2 per maggiori informazioni circa la sistematica, l'aspetto e la probabilità di ritrovamento alle diverse latitudini). È un pesce di profondità bentonico e, infatti, lo si ritrova per lo più a profondità maggiori di 1000 m (Wenner & Musick, 1977), ciò nonostante la maggior parte degli organismi vengono campionati tra i 1300 m e i 1500 m (Wenner & Musick, 1977), alcuni organismi sono stati rinvenuti, invece, a profondità molto più superficiali, intorno ai 230-500 m circa di profondità (Wenner & Musick, 1977). È stata individuato che organismi di dimensioni più piccole si ritrovano a profondità inferiori ai 1500 m, mentre organismi più grandi a profondità maggiori di 1500m (Magnússon, 2001; Wenner & Musick, 1977). È stato, inoltre, individuato un importante dimorfismo sessuale tra organismi maschili e femminili e le femmine risultano essere più grandi rispetto ai maschi, questo spiega la differente distribuzione di taglia degli organismi di *A. rostrata* rispetto al parametro profondità (Magnússon, 2001; Wenner & Musick, 1977). La temperatura media registrata a cui vive *A. rostrata* corrisponde a circa 4°C (Magnússon, 2001). Per quanto concerne la sua dieta, molto probabilmente è un predatore bentopelagico che si nutre principalmente di pesci, cefalopodi, decapodi, anfipodi, chetognati e policheti (Gordon & Duncan, 1985).

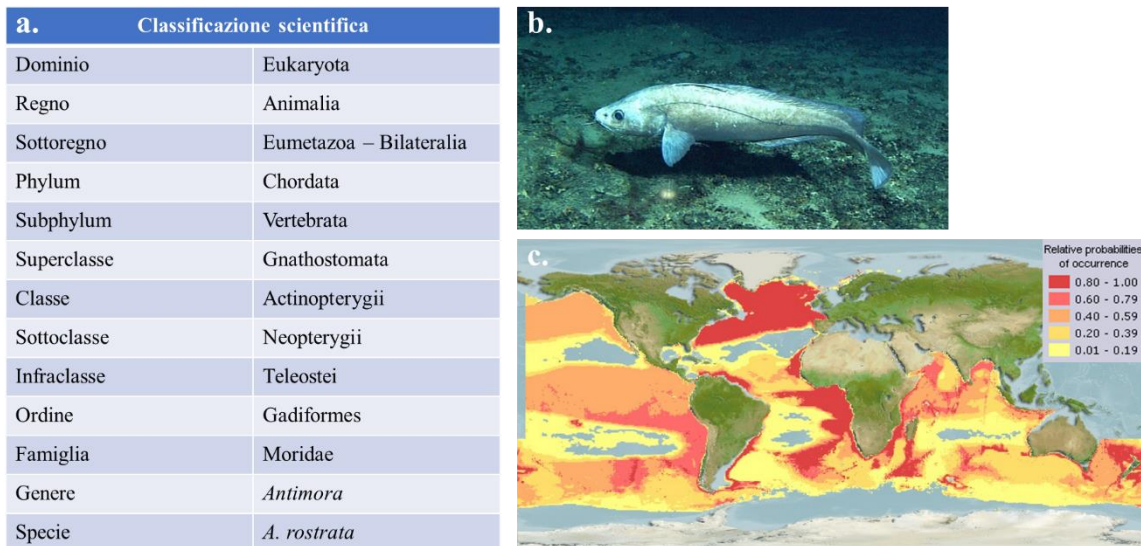


Figura 2: a. Classificazione scientifica per *A. rostrata*, b. esemplare di *A. rostrata* © Wikipedia; c. distribuzione latitudinale di *A. rostrata*, in legenda a destra sono riportati i valori di probabilità di ritrovamento della specie © FishBase.

***Dissostichus eleginoides* (Smitt, 1898)**

Dissostichus eleginoides è una specie bentopelagica, appartenente alla famiglia Nototheniidae e all'ordine Perciformes (Fig. 3). La si ritrova nella zona sub-antartica ma alcuni esemplari sono stati avvistati fino a 20°S di latitudine (Welsford et al., 2011); principalmente vengono a essere ritrovati in prossimità delle acque sudamericane, delle isole antartiche e anche in prossimità di Ob and Lena Banks (Brown, 2011). *D. eleginoides* ha colorazioni generalmente marroni, grigie o verdi, ha un corpo fusiforme, occhi di grandi dimensioni, una bocca sporgente e denti dalla forma analoga a quella dei canini umani e, come dice il nome del genere, è dotato di due linee laterali (Brown, 2011). Le pinne pettorali sono robuste e vengono utilizzate per favorire la propulsione durante il nuoto mentre la pinna caudale svolge, per lo più, la funzione di timone (Brown, 2011). Il corpo e la maggior parte della testa sono ricoperti da scaglie chitinoidi (Brown, 2011). La sua distribuzione batimetrica è compresa fra 50 m e 3850 m, generalmente tra i 70 e i 1500 m (Miller, 1993). Il *D. eleginoides* è un vorace predatore di apice durante lo stadio giovanile mentre da adulto si sposta in acque più profonde divenendo un predatore opportunisto e uno scavenger (Brown, 2011). È importante sottolineare che la dieta varia in funzione dell'età: dopo la schiusa la loro dieta è esclusivamente costituita da eufasiacei, allo stadio giovanile continuano a nutrirsi di eufasiacei e iniziando anche a nutrirsi di anfipodi; da sub-adulti e da adulti la loro dieta è costituita prevalentemente da pesci, tra cui i mictiofidi e il genere *Bathylagus* sp. (Brown, 2011). Per quanto concerne i predatori di *D. eleginoides*, non moltissimo è noto ma si sa che a essere più soggetti a predazione sono i giovanili, che vivono in acque più superficiali, rispetto agli adulti che vivono in acque più profonde (Brown, 2011). Predatori tipici di *D. eleginoides* di acque superficiali sono il pinguino Gentoo (*Pygoscelis papua*), il pinguino imperatore (*Aptenodytes forsteri*)

e l'otaria orsina antartica (*Arctocephalus gazella*). A profondità maggiori, i principali predatori sono rappresentati da: elefanti marini, lemargo del Pacifico (*Somniosus pacificus*), calamaro gigante dell'Antartide (*Mesonychoteuthis hamiltoni*), capodogli e orche assassine. Per quanto concerne la riproduzione, sono stati registrati eventi di spawning tra luglio e agosto ma uno spawning di minore entità può verificarsi anche tra aprile e maggio (Brown, 2011). Affinché i partner si incontrino per favorire la fecondazione delle cellule uovo, le femmine si spostano in direzione superficiale, i maschi verso la profondità, i luoghi di spawning sono compresi tra gli 800 e i 1200 m di profondità (Brown, 2011). Il fatto che le femmine nuotino in direzione della superficie è dovuto al fatto che queste sono più grandi dei maschi, infatti, come precedentemente accennato, più un organismo è grande e più si spinge in profondità (Brown, 2011). Le uova sono ricche in tuorlo e arrivano a misurare 4.4-4.5mm in diametro, sono uova pelagiche e le si ritrova al di sopra dei 500m, sebbene la maggior parte di esse vengano reperite nei primi 3 m di profondità (Brown, 2011). Non è noto quanto perduri lo stadio pelagico delle uova, ma si pensa che alla schiusa le larve misurino, circa, 14 mm (Brown, 2011; Kock, 1991).

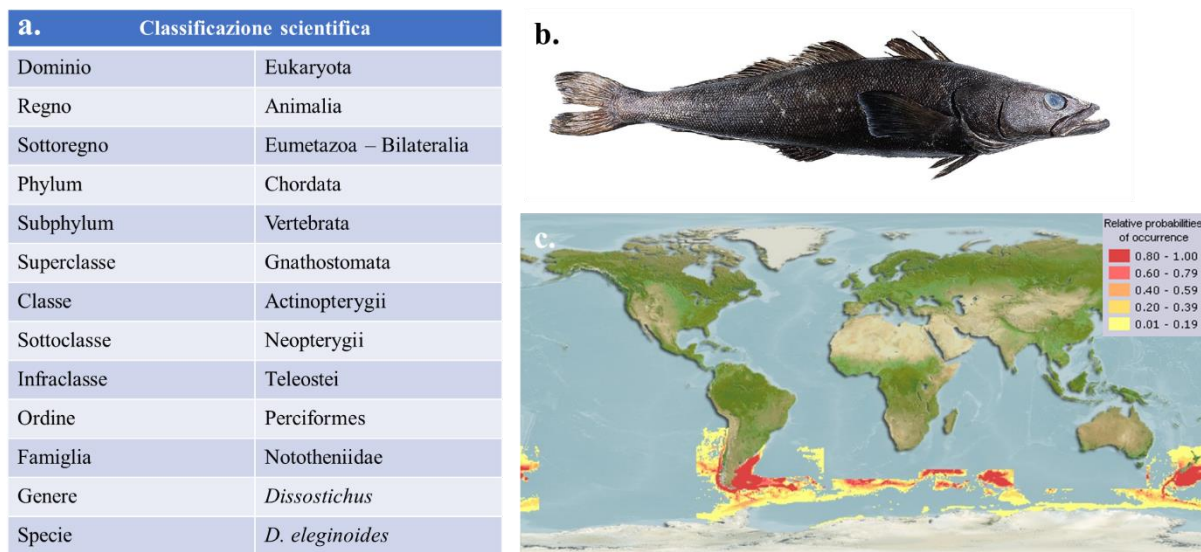


Figura 3: a. classificazione scientifica per *D. eleginoides*; b. esemplare di *D. eleginoides* © Wikipedia; c. distribuzione latitudinale di *D. eleginoides*, in legenda a destra sono riportati i valori di probabilità di ritrovamento della specie © FishBase.

***Pleuragramma antarctica* (Boulenger, 1902)**

Pleuragramma antarctica è un pesce pelagico antartico (Pinkerton, 2017) appartenente alla famiglia Nototheniidae, ordine Perciformes (Fig. 4). La particolarità di *P. antarctica* è che l'unica specie pelagica; dal momento che manca di vescica natatoria, possiede lipidi a bassa densità per favorire il galleggiamento ma non solo, possono fungere da riserva energetica durante periodi di scarsità di cibo (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997). Occupa il range batimetro compreso tra la superficie e i 728 m (Miller, 1993). Per quanto concerne la sua dieta, la maggior parte delle informazioni giungono

dall'analisi del contenuto stomacale dove sono stati rinvenuti diversi organismi: eufasiacei (*Euphasia superba* ed *E. crystallorophias*) copepodi (per lo più calanoidi), anfipodi, gasteropodi (pteropodi), ostacodi, misidiacei, cumacei, chetognati, policheti, sifonofori, meduse e salpe (Pinkerton, 2017). In alcuni casi risultano essere piscivori nutrendosi di conspecifici, cannicidi, myctiofidi e la specie *Notolepsis coasti* (Pinkerton, 2017). È stato osservato che vi è una differenza di organismi predati in funzione della taglia: anfipodi e misidiacei vengono predati da organismi di dimensioni maggiori a 178 mm, mentre eufasiacei e copepodi sono le prede predilette da organismi con dimensioni di 152-177 mm (Pinkerton, 2017). Gli organismi vengono considerati adulti quando raggiungono la lunghezza di 130-160 mm per le femmine, corrispondente al range d'età di 4-5 anni, e 120-180 mm di lunghezza per i maschi, corrispondente ai 4-7 anni (Pinkerton, 2017). Il primo evento di spawning avviene un anno dopo aver raggiunto la maturità sessuale (Pinkerton, 2017) e il periodo riproduttivo è sincronizzato con i periodi di massimo sviluppo dello zooplankton; lo spawning si verifica, infatti, ad agosto (periodo invernale) mentre la schiusa durante il periodo primaverile, a novembre (Wöhrmann et al., 1997). Inizialmente le larve si nutrono del tuorlo presente nell'uovo e, una volta terminata questa fonte di nutrimento, iniziano a nutrirsi di copepodi, che iniziano a riprodursi durante questo periodo (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997). La crescita larvale è particolarmente rapida e le post-larve utilizzano la maggior parte dell'energia proveniente dalla dieta per favorire la crescita somatica (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997). Un problema per gli organismi antartici, ma in generale delle alte latitudini, sono le basse temperature dell'ambiente che possono determinare il congelamento dei fluidi corporei, per evitare ciò gli organismi hanno evoluto le proteine anti-freezing che iniziano a essere prodotte in *P. antarctica* durante il periodo post-larvale (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997). Segue il periodo dei giovanili che tendono a spingersi verso latitudini inferiori, fino a raggiungere la penisola antartica, dove si nutrono di copepodi calanoidi e larve di eufasiacei in un range batimetrico compreso tra i 100 e i 400 m di profondità (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997). I giovanili raggiungono poi lo stadio di sub-adulti e, successivamente, di adulti il cui tempo di sviluppo è il più lento fra i pesci marini (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997). *P. antarctica* tende a essere una specie caratterizzata dall'attuare movimenti lenti, in modo da risparmiare energia (Wöhrmann, Hagen & Kunzmann, 1997).

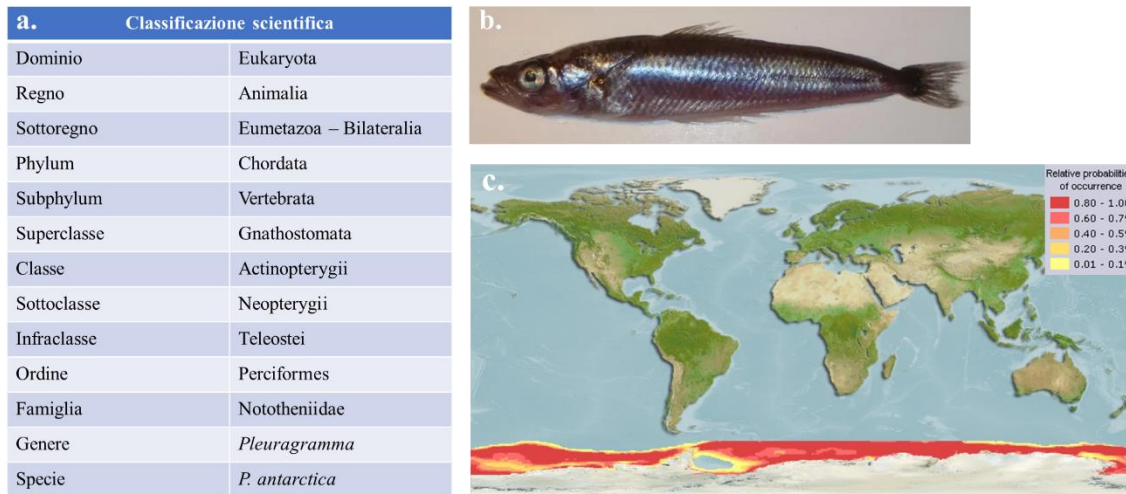


Figura 4: a. classificazione scientifica per *P. antarctica*; b. esemplare di *P. antarctica* © Wikipedia, c. distribuzione latitudinale di *P. antarctica*, in legenda a destra sono riportati i valori di probabilità di ritrovamento della specie © FishBase.

***Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868)**

Trachurus mediterraneus appartiene alla famiglia Carangidae, ordine Perciformes (Fig. 5). È una specie zooplanktivora (Bayhan, Sever & Kara, 2013; Yankova et al., 2010; Viette, Giuliani & Ferrero, 1997) ed è un organismo semi-pelagico che vive nel Mar Mediterraneo, Mar Nero e sulle coste orientali dell'Atlantico, dal Canale della Manica fino al Marocco (Viette, Giuliani & Ferrero, 1997). Occupa un range batimetrico compreso tra 40 m e 500 m (Ragonese et al., 2003) ma lo si può ritrovare anche a profondità più superficiali, intorno ai 5 m (FAO-FIGIS, 2005; Ragonese et al., 2003). Per quanto concerne la dieta, attraverso analisi del contenuto stomacale è stato osservato che si nutre per lo più di policheti, crostacei, molluschi, chetognati, pesci e larve di pesci (soprattutto sardine e acciughe); ciò nonostante, i molluschi non bivalvi rappresentano la componente maggiore della dieta (Bayhan, Sever & Kara, 2013; Ragonese et al., 2003). Raggiunge dimensioni massime di 40-60 cm e un'età massima compresa tra 10 e 12 anni (Ragonese et al., 2003). È stato dimostrato che esiste relazione lunghezza- peso che indica una crescita allometrica positiva, sia per organismi maschili sia per organismi femminili (Păun et al., 2019). Il periodo di spawning e reclutamento avviene tra estate e autunno (Ragonese et al., 2003).

a. Classificazione scientifica	
Dominio	Eukaryota
Regno	Animalia
Sottoregno	Eumetazoa – Bilateralia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclasse	Gnathostomata
Classe	Actinopterygii
Sottoclasse	Neopterygii
Infraclasse	Teleostei
Ordine	Perciformes
Famiglia	Carangidae
Genere	<i>Trachurus</i>
Specie	<i>T. mediterraneus</i>

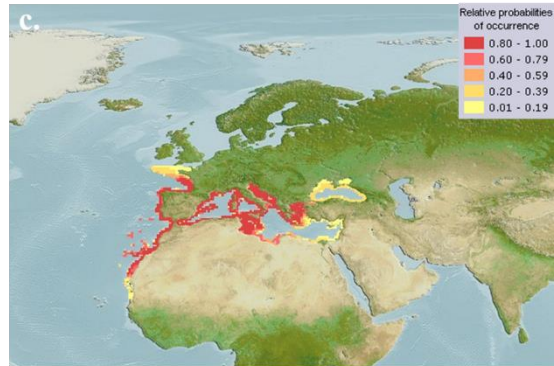


Figura 5: a. classificazione scientifica per *T. mediterraneus*; b. esemplare *T. mediterraneus* © Wikipedia, c. distribuzione latitudinale di *T. mediterraneus*, in legenda a destra sono riportati i valori di probabilità di ritrovamento della specie © FishBase.

3. Scopo del lavoro

Il sistema nervoso centrale svolge ruoli fondamentali per gli organismi, favorendo agli stessi la percezione dell'ambiente in cui si trovano e la realizzazione di risposte opportune in funzione del cambiamento di diversi parametri nell'ambiente stesso. Dato questo suo ruolo fondamentale, è di notevole interesse analizzare qualitativamente ma, soprattutto, quantitativamente il sistema nervoso, in particolar modo l'encefalo, degli organismi in modo da poter capire se vi siano relazioni tra la struttura del sistema nervoso e altre variabili quali l'ambiente, il sesso, la posizione nella rete trofica e nelle reti sociali. Tra i Vertebrati le morfologie e dimensioni encefaliche sono molto diverse e differenti sono anche i comportamenti attuati dai diversi rappresentanti del subphylum. Anche all'interno dell'infraclasse dei teleostei sono presenti differenze quali-quantitative tra specie differenti ma anche tra conspecifici, spesso attribuibili al sesso (Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010).

Scopo di questo lavoro è quello di analizzare quantitativamente l'encefalo di quattro specie di teleostei: *Antimora rostrata* (Günther, 1878), *Dissostichus eleginoides* (Smitt, 1898), *Pleuragramma antarctica* (Boulenger, 1902) e *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1758) per individuare differenze intraspecifiche.

L'intenzione iniziale era quella di applicare la tecnica del frazionamento isotropico (Herculano-Houzel & Lent, 2005). L'utilizzo di questa tecnica consente di poter calcolare il numero di cellule totali contenute in una determinata frazione di tessuto e di determinare il numero di neuroni presenti grazie alla detezione immunocitochimica del NeuN (Neuronal Nuclear Antigene, cioè la proteina RBFOX3), antigene presente in quasi tutte le cellule di tipo nervoso ma assente nelle cellule non nervose (Herculano-Houzel & Lent, 2005). Poiché l'anticorpo utilizzato in questo lavoro non ha funzionato su tutte le specie considerate, gran parte delle analisi di confronto sono state fatte considerando il numero delle cellule totali e la loro densità senza distinguere neuroni e cellule gliali. Per capire il motivo del variabile funzionamento dell'anticorpo, è stata intrapresa un'analisi delle sequenze relative alla proteina RBFOX3 nei teleostei di interesse confrontandola con la zona dell'epitopo riconosciuto dall'anticorpo.

Nel lavoro sono state quantificate, per tutte le specie, le dimensioni delle porzioni encefaliche in termini di massa e in termini volumetrici, la percentuale relativa delle varie porzioni encefaliche analizzate, il numero totale di cellule.

Il volume risulta essere un dato particolarmente interessante per comprendere come l'ambiente, la posizione nelle reti trofiche e l'organizzazione sociale vadano a modellare determinate regioni encefaliche (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Huber et al., 1997; Park & Bell, 2010; Pollen et al., 2007).

Indagare il numero di cellule è di fondamentale importanza all'interno del filone di ricerca che ha seguito l'invenzione del frazionamento isotropico dal momento che è stato proposto che è il numero totale di cellule e di neuroni a fungere da discriminante per affermare che un organismo ha capacità cognitive maggiori di un altro (Herculano-Houzel, 2009).

In letteratura, i lavori proposti dalla Herculano-Houzel affermano che solo il numero assoluto di cellule e neuroni può fungere da proxy per spiegare le capacità cognitive e che non sia la maggiore o minore massa encefalica a svolgere un ruolo discriminante. Tuttavia, altri lavori (e.g.: Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzale-Voyer & Kolm, 2010) dimostrano come ci sia una relazione tra abilità cognitive e determinate caratteristiche ecologiche dell'ambiente con i valori di massa e di volume delle aree encefaliche.

Per questo motivo il seguente lavoro ha voluto valutare sia i numeri di cellule sia i volumi e le masse assolute e relative.

4. Materiali e metodi

Campionamento e fissazione

I campioni sono stati raccolti in parte durante spedizioni scientifiche in Antartide (*A. rostrata*, *D. eleginoides* e *P. antarctica*) e in parte provengono da gare di pesca sportiva (*T. mediterraneus*).

P. antarctica e *T. mediterraneus* sono stati trattati con il seguente protocollo:

1. Fissazione overnight in PAF 4% (paraformaldeide + tampone fosfato salino [PBS]);
2. Due/tre lavaggi in PBS per sei ore;
3. Stoccaggio in etanolo 70% a temperatura ambiente.

A. rostrata e *D. eleginoides* sono stati trattati con il seguente protocollo:

1. Fissazione PAF 4% per 6 mesi (paraformaldeide + tampone fosfato [PBS]);
2. 6 lavaggi in PBS per 24 ore;
3. Conservazione in PEG (30% glicerolo, 30% etilen-glicole, 40% tampone fosfato [PB]).

Campioni anatomici prelevati

Per ogni specie sono stati analizzati tre individui presi a caso dalla totalità dei campioni in modo da evitare bias legati a variabili quali il sesso. Nonostante ciò, per *A. rostrata* tutti i campioni disponibili erano di sesso femminile.

Per quanto concerne *P. antarctica* e *T. mediterraneus*, si è proceduto all'estrazione degli encefali dalle teste degli animali forniti; per *A. rostrata* e *D. eleginoides* sono stati forniti direttamente gli encefali.

Per ogni specie sono state campionate le seguenti regioni: bulbi olfattivi, telencefalo, mesencefalo, ipotalamo e cervelletto fatta eccezione per *A. rostrata* dove i bulbi olfattivi non erano presenti nei campioni forniti, probabilmente dovuto al fatto che, analogamente ad altre specie dell'ordine Gadiformes, i bulbi olfattivi sono pedunculati e non sessili, quindi non in prossimità dell'encefalo, come nelle altre tre specie (Eastman & Lanoo, 2001; Lisney, Wagner & Collin, 2018).

Per un esemplare di *D. eleginoides* (Disele 19.2) i bulbi olfattivi non erano disponibili nel campione fornito, pertanto la sua massa, il suo volume e le sue cellule totali sono state ricavate utilizzando i seguenti dati:

- Massa dei bulbi olfattivi: sono stati mediati i valori di massa encefalica (dati dalla sommatoria delle regioni analizzate prima citate) e i valori di massa dei bulbi degli altri due esemplari di *D. eleginoides* analizzati ed è stata effettuata la seguente proporzione

$$massa\ encefalo_{media} : massa\ bulbo_{media} = massa\ encefalo_{Disele\ 19.2} : massa\ bulbo_{Disele\ 19.2}$$

- Volume dei bulbi olfattivi: stesso calcolo effettuato per la massa ma con i valori volumetrici e di massa per ricavare il volume dei bulbi olfattivi

$$Volume_{media} : massa_{bulbo_{media}} = Volume_{Disele\ 19.2} : massa_{bulbo_{Disele\ 19.2}}$$

- Cellule totali: stesso calcolo effettuato per la massa ma con i valori di cellule totali

$$Cellule\ totali_{media} : massa_{bulbo_{media}} = cellule\ totali_{Disele\ 19.2} : massa_{bulbo_{Disele\ 19.2}}$$

Per un esemplare di *T. mediterraneus* (Tramed 20.2) la massa del bulbo olfattivo è stata calcolata, per problemi strumentali nella sua misurazione, usando i valori medi di densità (g/mm^3) calcolati per l'esemplare in questione dall'analisi delle altre regioni analizzate. La massa è stata ricavata, quindi, usando la seguente relazione: $\rho = \frac{m}{V}$ quindi $m = \rho \times V$. Analogamente a quanto effettuato per Disele 19.2, sono stati calcolati i valori di cellule totali.

Per l'esemplare Tramed 20.1 il volume delle regioni encefaliche è stato dedotto per mancanza di foto adeguate dell'encefalo dell'esemplare per il calcolo dei volumi medesimi. Per tutte le regioni encefaliche è stato calcolato il valore di densità e massa medio per i due esemplari (Tramed 20.2 e Tramed 20.3) per cui è stato possibile effettuare il calcolo dei volumi in modo poi da ricavare il valore di volume usando la formula sopra riportata.

Lunghezza e massa

Per gli esemplari analizzati di *A. rostrata* e *D. eleginoides* sono stati forniti i valori di massa (kg) e lunghezza (cm) espressa sotto forma di total length. Per *T. mediterraneus* i dati di lunghezza mentre i dati di massa erano assenti; per *P. antarctica* non sono stati forniti i dati di lunghezza e massa.

Per *T. mediterraneus*, essendo presenti i dati di lunghezza, è stato possibile risalire alla massa usando la seguente relazione: $W = a L^b$ dove b indica la crescita isometrica, a la forma del corpo (Froese, Thorson & Reyes, 2014). I valori di a e b sono stati forniti da FishBase.

Per quanto concerne *P. antarctica* è stato possibile risalire ai valori di standard length (mm) utilizzando la tecnica proposta da Eastman & Lannoo (2011) che permette di ricavare i dati di SL partendo dalla lunghezza dell'encefalo (mm) facendo partire le misurazioni dal margine rostrale dei bulbi fino al margine caudale dell'obex, punto in cui il quarto ventricolo si restringe divenendo il canale ependimale. Usando i valori forniti nel lavoro di SL (rispettivamente 148 e 225 mm come valori minimo e massimo) e lunghezza dell'encefalo (rispettivamente 11.8 e 15.5 come valori minimo e massimo) di *P. antarctica*, è stata ricavata l'equazione della retta passante per i due punti:

$$y = 20.811x - 97.568$$

La seguente equazione è stata dunque utilizzata per ricavare i valori di SL per i nostri campioni. Dal momento che i dati di lunghezza degli altri esemplari sono espressi sotto forma di TL, è stata utilizzata la seguente equazione, calcolata per esemplari di *P. antarctica*, proposta da Humboldt (1984):

$$TL = 1.092 SL + 0.284$$

I valori di SL, e di conseguenza di TL, vanno espressi in centimetri.

Analisi regioni encefaliche

Massa

Per una accurata determinazione delle masse delle regioni encefaliche, dopo aver dissezionato l'encefalo, ciascuna regione è stata pesata tre volte e il valore di peso finale è stato determinato facendo la media dei tre valori registrati. Al fine di ridurre il contributo della soluzione fissante alla massa, le varie regioni sono state prima asciugate mediante l'utilizzo di carta assorbente.

Volumi

Per il calcolo dei volumi è stata utilizzata la seguente procedura, sfruttando il software ImageJ:

- Asciugare l'encefalo su carta assorbente;
- Fotografare l'encefalo con macchina fotografica munita di macro l'encefalo dorsalmente, ventralmente e lateralmente;
- Mediante l'uso della funzione *polygon selection* in ImageJ, si ricalca l'area di una regione encefalica utilizzando le foto laterali; si seleziona *analyse* per ricavare l'area della regione encefalica data da (Fig. 6a):

$$A_{regione} = A_{ellisse} = \pi \times a \times b$$

Dove: a= raggio lungo, b= raggio corto;

- Utilizzando le foto scattate dorsalmente (per bulbi olfattivi, cervelletto, mesencefalo e telencefalo) e ventralmente (per l'ipotalamo), si traccia una linea retta che vada dalla porzione più larga della regione alla linea immaginaria che divide a metà l'encefalo in modo da trovare il terzo semiasse dell'ellissoide (Fig. 6b);
- Calcolare il volume della regione encefalica con la seguente formula:

$$V_{regione} = V_{ellissoide} = \frac{4}{3} \times A_{regione} \times c$$

Nel caso di regioni dotate di un grosso ventricolo, come il mesencefalo e il cervelletto, si attua una correzione calcolando il volume della regione nel seguente modo (Fig. 6c):

$$V_{regione} = \frac{4}{3} \times (A_{totale} - A_{ventricolo}) \times c$$

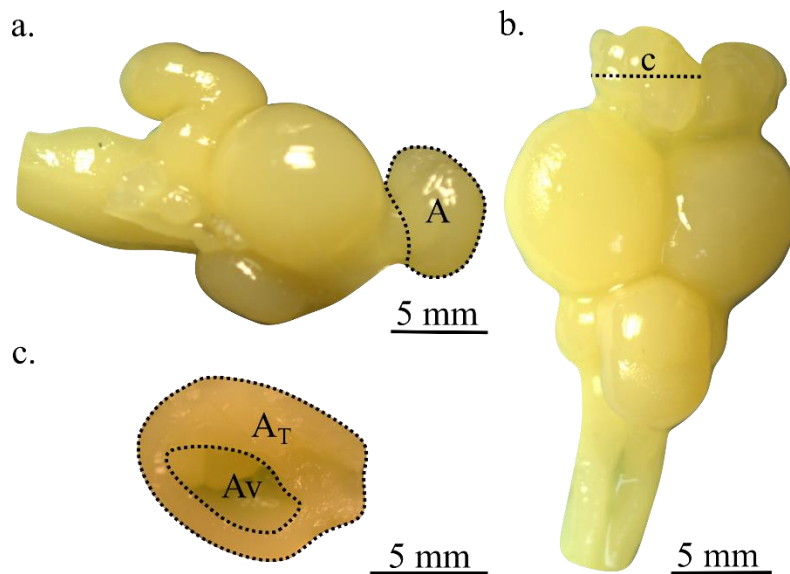


Figura 6: a. individuazione dell'area da calcolare mediante la funzione *polygon selection* partendo da una foto scattata lateralmente; b. individuazione del terzo semiasse dell'ellissoide mediante l'utilizzo di foto scattate ventralmente; c. calcolo dell'area dell'ellissoide per regioni encefaliche contenenti un ventricolo, in questo caso è necessario dividere a metà la regione in questione per effettuare il calcolo dell'area totale e del ventricolo della regione encefalica in questione (in foto: mesencefalo). Tutte le immagini rappresentano encefali di *D. eleginoides*.

Frazionamento isotropico

A differenza di tecniche stereologiche, che consentono di lavorare su porzioni discrete di tessuto aventi la medesima densità, il frazionamento isotropico consente di lavorare su diverse porzioni encefaliche contemporaneamente, indipendentemente dal volume e dalla loro anisotropia (Herculano-Houzel & Lent, 2005). La tecnica risente di alcuni bias metodologici dovuti soprattutto al processo di dissezione delle varie regioni encefaliche (soprattutto se di piccole dimensioni), al processo di conta di cellule e di neuroni (sono state riscontrate differenze tra diversi contatori) e a processi di variazione random nella colorazione dei campioni con l'anticorpo (Neves et al., 2019). Nonostante ciò, questa tecnica risulta essere comunque efficace.

È stato seguito il seguente protocollo per contare i nuclei e i neuroni nelle regioni encefaliche analizzate.

Conta cellule

1. Inserire la regione encefalica in un potter di vetro abbinato a un omogeneizzatore in acciaio;
2. Unire alla regione encefalica una soluzione di sodio citrato-TritonX (10 mL H₂O_{dist} + 118 mg Na₃C₆H₅O₇ + 100 µL TritonX) in un rapporto 1:10 rispetto alla massa da omogeneizzare;
3. Omogeneizzare per il tempo ideale identificato per ciascuna della specie analizzate:
 - a. *A. rostrata*: 4 minuti;
 - b. *D. eleginoides*: 8 minuti;
 - c. *P. antarctica*: 4 minuti;

- d. *T. mediterraneus*: 8 minuti (bulbi olfattivi: 4 minuti);
- Trasferire la soluzione potterizzata in un criotubo, sciacquando attentamente il potter con la soluzione sodio citrato-TritonX;
 - Centrifugare per 45 minuti a 6000 U/min (centrifuga Itettich Universal);
 - Rimuovere il sopranatante e rispondere il pellet di nuclei con PBS e 1% DAPI in un rapporto 1:100;
 - Prelevare circa 20µL di soluzione e inserirli in una camera di Bürker (effettuare tre repliche per ciascuna regione encefalica) e scattare foto al microscopio utilizzando luce trasmessa e fluorescenza UV (Fig. 7a, 7b);
 - Dopo aver scattato le foto, contare le cellule in ciascun quadratino (Fig. 7b) e calcolare la somma per ciascun quadrato, calcolare successivamente la media di ciascuna somma e calcolare, infine, la media totale. Moltiplicare il numero ottenuto per il fattore di diluizione e per 10000. Dal momento che per ogni regione encefalica è stato analizzato solo un lobo, calcolare il numero totale di cellule nella regione encefalica con la seguente relazione:

$$C_{tot_A}: massa_A = massa_{A+B}: C_{tot_{A+B}}$$

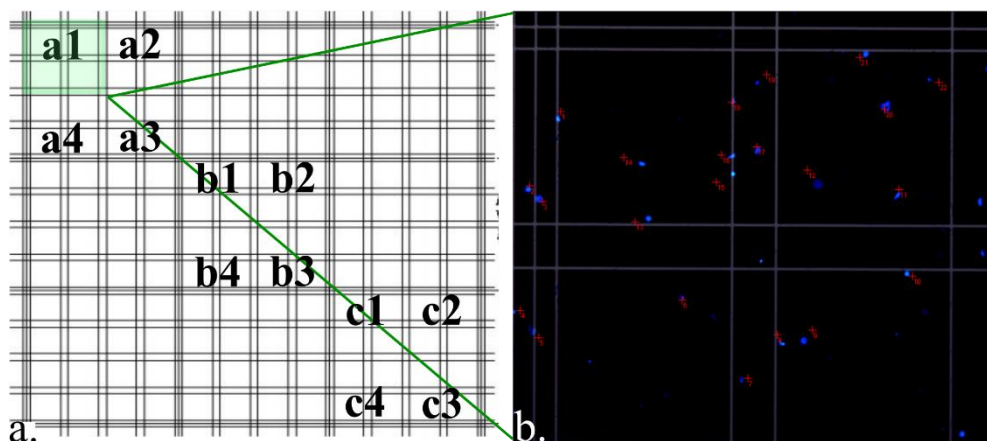


Figura 7: a. rappresentazione schematica della camera di Bürker e metodo di campionamento utilizzato per scattare le fotografie; b. foto di un quadratino della camera di Bürker scattata a luce trasmessa e luce UV, rappresentazione di come viene effettuata la conta dei nuclei mediante il software ImageJ.

Conta neuroni

- Prelevare 50µL della soluzione contenente i nuclei e aggiungere 50µL di PBS in una provettina da 1mL;
- Unire:
 - 1µL di anticorpo primario mouse anti-NeuN (Millipore Mab377) overnight oppure
 - 2µL di anticorpo primario rabbit anti-NeuN coniugato con Alexa Fluor® 488 (abcam ab190195) overnight;

3. Centrifugare per 3 minuti (mediante centrifuga Biofuge pico Heraeus) e prelevare il soprannatante, se si è proceduto con 2.a proseguire con punto 4, altrimenti passare a punto 5;
4. Unire 1 μ L di anticorpo secondario goat anti-mous IgG coniugato con Dylight® 488 e lasciare in incubazione per 90 minuti, ricentrifugare per 3 minuti e rimuovere il soprannatante;
5. Aggiungere 100 μ L di PBS e risospendere mediante l'utilizzo di un vortex;
6. Prelevare circa 25 μ L di soluzione, poggiare su un vetrino e coprire con vetrino copri oggetto;
7. Osservare al microscopio (Leica) a epifluorescenza a 20 \times ;
8. Scattare fotografie di doppi campi casuali, una con luce UV (DAPI) e una con luce blu (per il fluoroforo dell'anticorpo) e scattare almeno 60 foto (quindi 30 campi) (Fig. 8a-c);
9. Dopo aver acquisito le foto, calcolare il totale di nuclei positivi al DAPI e all'anticorpo e fare il rapporto tra nuclei positivi e nuclei totali per trovare la percentuale di neuroni.

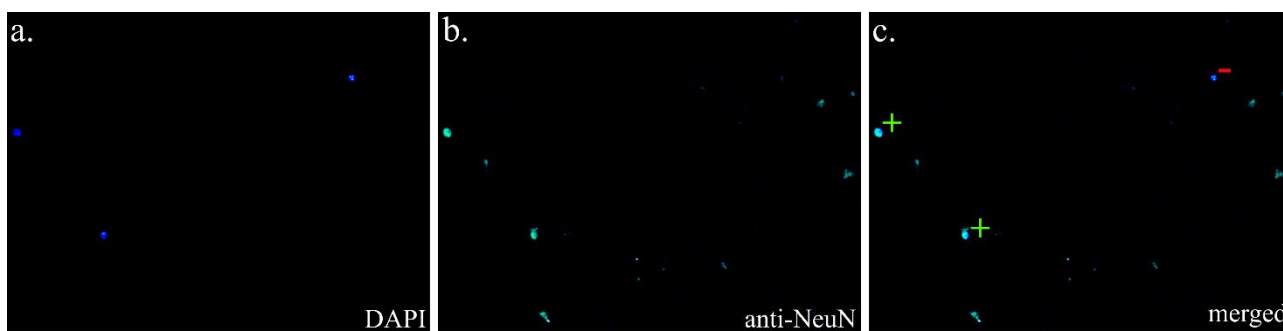


Figura 8: a. foto a epifluorescenza con luce UV per la visualizzazione del DAPI; b. foto a epifluorescenza con luce blu per la visualizzazione dei nuclei positivi all'anticorpo anti-NeuN; c. foto derivante dall'unione dei campi rappresentati in a e b per il calcolo dei nuclei totali e dei nuclei positivi, con il simbolo + vengono rappresentati i nuclei positivi all'anticorpo mentre con il simbolo - i nuclei negativi.

Dati

Dalle precedenti analisi descritte derivano i seguenti dati che sono stati utilizzati per effettuare analisi di tipo statistico e, se necessario, per ricavare dati mancanti:

- Massa [kg];
- Total lenght [cm];
- Massa dell'encefalo [mg], data dalla somma delle porzioni analizzate:
 - *A. rostrata*: cervelletto, ipotalamo, mesencefalo, telencefalo;
 - *D. eleginoides*: bulbi olfattivi, cervelletto, ipotalamo, mesencefalo, telencefalo;
 - *P. antarctica*: bulbi olfattivi, cervelletto, ipotalamo, mesencefalo, telencefalo;
 - *T. mediterraneus*: bulbi olfattivi, cervelletto, ipotalamo, mesencefalo, telencefalo;
- Massa della regione [mg];
- Massa percentuale della regione;

- Volume [mm^3];
- Densità [g/cm^3];
- Cellule totali (Ctot);
- Densità cellulare [Ctot/mg];
- Percentuale di neuroni;
- Neuroni totali (N);
- Densità neuronale [Ntot/mg];
- Cellule non neuronali (O);
- Densità delle cellule non neuronali (O/mg);
- Rapporto cellule non neuronali – neuroni (O/N).

Analisi statistiche

Si riportano di seguito le analisi statistiche che sono state condotte per analizzare i dati. Le analisi statistiche e i grafici derivanti dalle analisi (ANOVA, correlazioni, regressioni, PCA) sono stati realizzati con R Studio; i dati di media, mediana e deviazione standard campionaria riportati in tabella sono stati calcolati con Microsoft Excel.

Analisi univariata della varianza (ANOVA)

È un test parametrico che permette di effettuare confronti tra i valori medi di una variabile risposta in funzione di uno o più fattori; in questo lavoro sono state eseguite delle oneway-ANOVA quindi utilizzando un solo fattore predittivo. Al fine di poter condurre un'ANOVA è necessario che vengano rispettate due assunzioni:

- Normalità: la variabile risposta abbia una distribuzione normale (motivo per cui è stato necessario trasformare con logaritmo naturale o in base 10 le variabili);
- Omoschedasticità: i livelli all'interno di un fattore devono avere varianze simili tra loro.

In caso di presenza di differenze significative tra i livelli del fattore, è stato effettuato il test di Student–Newman–Keuls (SNK) per visualizzare quali livelli presentassero differenze significative tra di loro.

Test di Kruskal-Wallis

È l'analogo non parametrico dell'ANOVA ed è stato utilizzato nel momento in cui non poteva essere rispettate le assunzioni previste per l'ANOVA. Essendo un test non parametrico, non vengono confrontati i valori di media bensì i valori di mediana.

Correlazione fra variabili

Per verificare se due variabili presentassero una correlazione, è stato utilizzato il coefficiente di correlazione di Spearman (r_s) che è idoneo nel momento in cui si ha un numero di dati compreso fra 7 e 30 (12 nel nostro caso).

Regressioni

Le regressioni sono tecniche statistico-matematiche che permettono di stabilire una relazione causa effetto tra una variabile risposta e una o più variabili predittive. Le regressioni possono essere lineari e non lineare (e.g.: regressione di potenza). Nel caso delle regressioni lineari bivariate, la relazione causa-effetto tra le due variabili è descritta da una retta:

$$y = mx \pm q$$

Le regressioni sono descritte dal coefficiente di determinazione (R^2) che indica la bontà del modello quindi quanto le variabili predittive inserite nel modello siano in grado di spiegare la variazione della variabile risposta. È sempre importante, poi, associare al valore del coefficiente di determinazione un p-value per vedere la significatività statistica. Nel caso delle regressioni lineari è necessario che vengano rispettate le seguenti assunzioni:

- Indipendenza delle repliche;
- Normalità della distribuzione della variabile risposta e dei residui;
- Omogeneità delle varianze di ogni x (viene testata generalmente plottando i valori predetti in funzione dei residui o i residui in funzione della variabile predittiva);
- La x deve essere fissa.

Analisi delle componenti principali (PCA)

La PCA è una tecnica di analisi multivariata che permette di fare analisi su un dataset utilizzando due o più variabili risposta. In questo lavoro è stata utilizzata la PCA in quanto lavora su distanze euclidee, ottimale per il tipo di variabili risposta utilizzate dal momento che non sono ricchezze specifiche. Nel caso della distanza euclidea, la matrice di similarità/dissimilarità viene calcolata utilizzando una derivazione del teorema di Pitagora. È importante ricordare che per l'analisi PCA è necessario trasformare i dati, in questo lavoro sono stati modificati utilizzando la radice quadrata.

Analisi bioinformatiche

È stato necessario effettuare analisi di tipo bioinformatico sulla sequenza RBFOX3 (RNA binding protein fox-1 homolog 3) o NeuN (Neuronal Nuclear Antigen) dal momento che due specie di teleostei analizzati in questo lavoro, *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*, sono risultate negative all'anticorpo anti-NeuN. Nel caso dell'anticorpo della Millipore non è nota la regione dell'epitopo marcato dall'anticorpo, nel caso dell'anticorpo Abcam l'epitopo si trova tra il primo amminoacido,

metionina, e il centesimo amminoacido, cisteina, della RBFOX3 umana e viene anche riportato risultare funzionante sulla RBFOX3 di *Rattus norvegicus*. Le proteine usate nell'allineamento cominciano tutte con una metionina ma, nonostante ciò, alcune sequenze sono state tagliate a monte della metionina, riportata nell'allineamento come primo amminoacido, in quanto presentavano diversi amminoacidi in posizione N-terminale (es.: *R. norvegicus* presenta diversi amminoacidi all'N-terminale prima della metionina combaciante con quella umana).

Non sono disponibili nelle banche dati i genomi delle due specie risultati negative all'anticorpo anti-NeuN. Nel caso del genere *Dissostichus* è noto da letteratura che nemmeno il conspecifico *D. mawsoni* risulta positivo all'anticorpo anti-NeuN (Ferrando et al., 2019) quindi è stato utilizzato il suo genoma per predire la sequenza proteica del NeuN. Per quanto concerne il genere *Trachurus* anche in questo caso si è partiti dal genoma di un conspecifico: *T. trachurus*.

Le sequenze del NeuN per *D. mawsoni* e *T. trachurus* sono state predette utilizzando FGENESH+ con i seguenti parametri:

- *D. mawsoni*: utilizzo della sequenza genomica estratta dallo scaffold 41 (JAAKFY010000014.1), sequenza proteica di *Scyliorinus canicula* (XP_038632664.1) per la selezione dei parametri *Danio rerio*;
- *T. trachurus*: utilizzo della sequenza nucleotidica del cromosoma 8 (LR991642.1), sequenza proteica di *Poecilia reticulata* (XP_017161719.1) e per la selezione dei parametri *D. rerio*.

Si riportano di seguito le sequenze proteiche predette risultanti:

- *D. mawsoni*: 1 11 exon (s) 8282014 - 8360265 356 aa
MANSGLLLSGSGMLPHSLQCPPAFLYLPEGNQEATNPPEAMAQPYTPAQYPPPPQNGI
PAEFAAPHPLPTQDYSQSRVPEHAMTLYTPTQTHSEPAGTDNSTPAITATTTAPTDDV
TQIEGSQQLQLQHSDSSEKQQPKRLHVSNIFFRFRDPDLRQMFGQFGKILDVEIIFNERGS
KGFVTFETSTDADRAREKLNGTIVEGRKIEVNNATARVMTNKKVANPYTNGWKLN
PVVGAVYGPELYAVTGFPYPATGATVAYRGAHLRGRGRAVYNTFRTAPPPPIPAYGA
VVYQDGFYGAEIYGGYAA YRFAQPATTAAYS DSYGRVYATADPYHHTIGPAATYSVG
TMVSL
- *T. trachurus*: 1 12 exon (s) 9123010 - 9157582 398 aa
MYSRTQHLLVSEAAELFSPSPDSWSYCTIAAVVDDDDGRLLGPVQRTRDPNGSTFQLS
YQEGNQEATNPPEAMAQPYTPAQYPPPPQNGIPAEFAAPHPLPTQDYTGQSRVPEHAM
TLYTPTQTHSEPAGTDNSSPAITATTTAPTDDVTQTEGSQQLQLQHSDSSEKQQPKRLH
VSNIPFRFRDPDLRQMFGQFGKILDVEIIFNERGSKGFVTFETSTDADRAREKLNGTIV
EGRKIEVNNATARVMTNKKVANPYTNGWKLNPVVGAVYGPELYAVAGFPYPATGAT

VAYRGAHLRGRGRAVYNTFRTAPPPPIPAYGAVVYQDGFYGAEIYGGYAAAYRFAQPT
TTAYSDSYGRVYATADPYHHTIGPAATYSVGTMASLYRGGYSRFTP

Anche in questo caso, come per *R. norvegicus*, sono presenti diversi amminoacidi all’N-terminale prima della metionina combaciante con quella umana, questi amminoacidi sono stati rimossi dall’allineamento così come quelli di tutte le altre specie utilizzate nell’allineamento che sono state soggette e risultate positive ad anticorpi anti-NeuN. Riportiamo di seguito l’accession number delle sequenze utilizzate:

- NP 001076044.1 *Homo sapiens*
- XP 039082446.1 *Hyaena hyaena*
- XP 038941612.1 *Rattus norvegicus*
- XP 038479994.1 *Canis lupus familiaris*
- XP 036012733.1 *Mus musculus*
- XP 032097355.1 *Sapajus apella*
- XP 026339774.1 *Ursus arctos horribilis*
- XP 023099973.1 *Felis catus*
- XP 021096874.1 *Heterocephalus glaber*
- XP 021082699.1 *Mesocricetus auratus*
- XP 018883472.1 *Gorilla gorilla gorilla*
- XP 017828391.1 *Callithrix jacchus*
- XP 017195878.1 *Oryctolagus cuniculus*
- XP 015998759.1 *Rousettus aegyptiacus*
- XP 014975850.1 *Macaca mulatta*
- XP 012909802.1 *Mustela putorius furo*
- XP 010595211.1 *Loxodonta africana*
- XP 005001480.3 *Cavia porcellus*
- XP 038632664.1 *Scyliorhinus canicula*
- XP 017161719.1 *Poecilia reticulata*
- XP 021328441.1 *Danio rerio*
- XP 033895125.1 *Acipenser ruthenus*
- XP 041077360.1 *Polyodon spathula*
- XP 032835287.1 *Petromyzon marinus* (outgroup)

Le sequenze proteiche estratte sono state allineate mediante ClustalW in MEGA-X e il multiallineamento generato è stato esportato in formato grafico mediante l’utilizzo di BioEdit.

5. Risultati

I dati ottenuti sono stati utilizzati per effettuare dei confronti tra le varie specie e tra specie appartenenti a diversi ordini presenti in letteratura.

Per effettuare i confronti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistiche mediante l'utilizzo di R Studio. È spesso stato necessario trasformare alcune variabili con la funzione logaritmica in base 10 o con il logaritmo naturale in modo da rispettare le assunzioni previste da alcuni test statistici (e. g.: distribuzione normale della variabile risposta per i modelli ANOVA e per le regressioni lineari).

Relazione massa corporea – lunghezza corporea

I dati di massa corporea e lunghezza corporea sono stati messi in relazione utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman che ha evidenziato l'esistenza di una relazione positiva (r di Spearman= 0.9982441, p -value= 0). Mediante la realizzazione di uno scatter plot è stato possibile visualizzare un andamento esponenziale dei dati, descrivibile dalla curva riportata in grafico (Graf. 1).

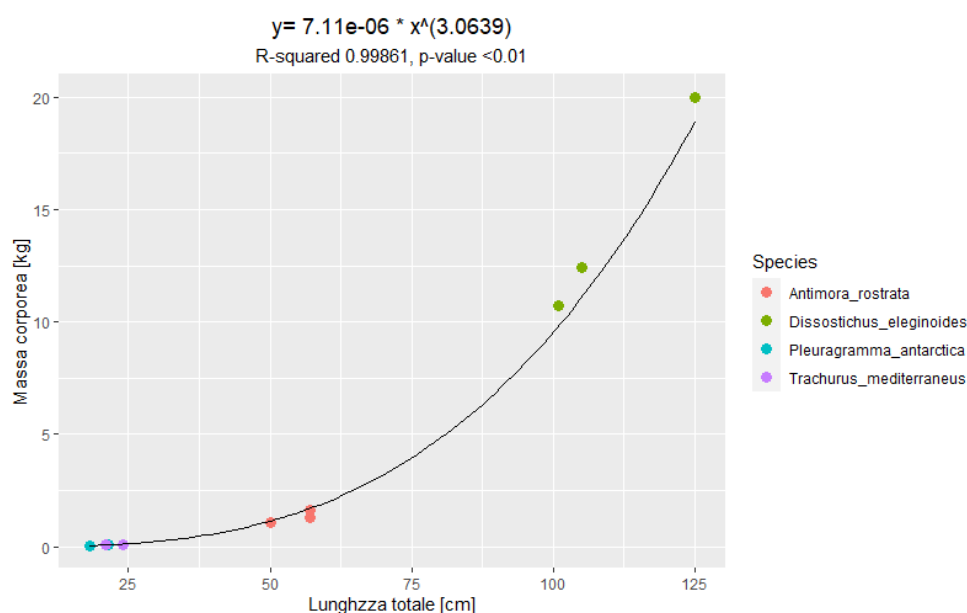


Grafico 1: regressione di potenza che meglio approssima l'andamento dei dati di massa corporea [kg] e lunghezza totale [cm]. L'equazione della regressione di potenza è stata ottenuta partendo dalla realizzazione di una regressione lineare con doppio logaritmo.

Relazione massa encefalica – massa corporea

I dati sono stati analizzati mediante il coefficiente di correlazione di Spearman che ha evidenziato la presenza di una relazione di tipo positivo tra le due variabili (r di Spearman= 0.7180396, p -value= 0.0085). È stato dunque realizzato un modello di regressione lineare con la seguente equazione generale:

$$\ln(\text{massa encefalo}) = m * \ln(\text{massa corporea}) + q$$

Si specifica che i dati di massa corporea sono stati convertiti da kg a mg in modo che entrambe le masse avessero la stessa unità di misura e che nella massa encefalica non sono stati compresi i bulbi olfattivi. La trasformazione con il logaritmo naturale della variabile risposta si è resa necessaria per ottenere una distribuzione normale della medesima. L'equazione della retta di regressione che interpola al meglio i dati è riportata nello scatter plot ($R^2= 0.7118$, $p\text{-value}= 0.0005616$) (Graf. 2).

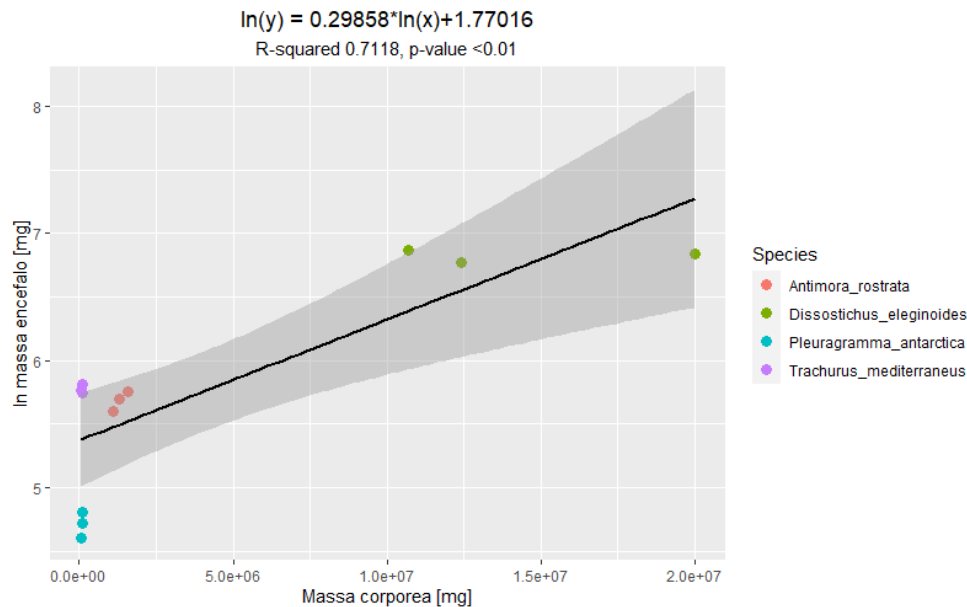


Grafico 2: scatter plot dei dati di massa encefalica [mg] e massa corporea [mg] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Bulbi olfattivi

Cellule totali

È stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis per mettere in evidenza differenze il numero di cellule totali tra le specie. Il test ha evidenziato la presenza di differenze significative ($p\text{-value}= 0.03899$) visualizzabili nei seguenti boxplot (Graf. 3).

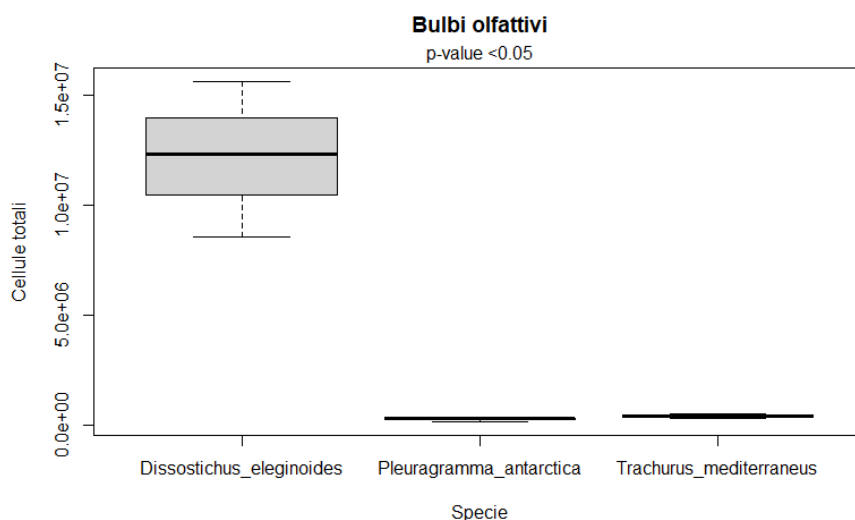


Grafico 3: boxplot dei valori di cellule totali presenti nei bulbi olfattivi, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Per rendere i valori di mediana riportati nel grafico, si allega una tabella con i rispettivi valori di media, deviazione standard e mediana del numero di cellule totali presenti nel bulbo olfattivo (Tab. 1).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>D. eleginoides</i>	1.22E+07	3.54E+06	1.24E+07
<i>P. antarctica</i>	2.60E+05	9.63E+04	2.83E+05
<i>T. mediterraneus</i>	3.96E+05	9.61E+04	4.00E+05

Tabella 1

Densità cellulare

I valori di densità cellulare sono stati trasformati con l'utilizzo del logaritmo in base 10 in modo da ottenere una distribuzione normale nella variabile risposta per poter effettuare una oneway-ANOVA. Entrambi i test preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk $p\text{-value} = 0.8935$; test di Bartlett $p\text{-value} = 0.5172$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{densità cellulare} + 1) \sim \text{specie}$. Il modello utilizzato ha evidenziato differenze non significative tra le specie ($p\text{-value} = 0.07499$) visualizzabili nel seguente grafico a barre (Graf. 4).

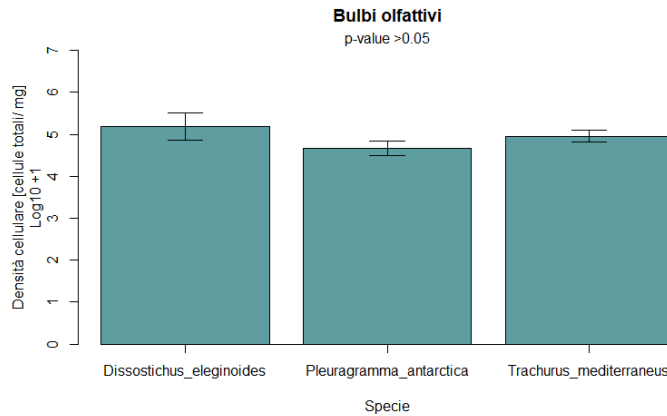


Grafico 4: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di densità cellulare nei bulbi olfattivi in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Si riporta qui di seguito una tabella con i valori medi e di deviazione standard della densità cellulare (Tab. 2).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>D. eleginoides</i>	1.84E+05	1.30E+05	7.54E+04
<i>P. antarctica</i>	4.88E+04	1.89E+04	4.71E+04
<i>T. mediterraneus</i>	9.34E+04	2.90E+04	8.95E+04

Tabella 2

Massa relativa

Mediante l'utilizzo del test di Kruskal-Wallis è stato possibile evidenziare la presenza di differenze significative tra le specie (p-value= 0.02732) visualizzabili nei seguenti boxplot (Graf. 5).

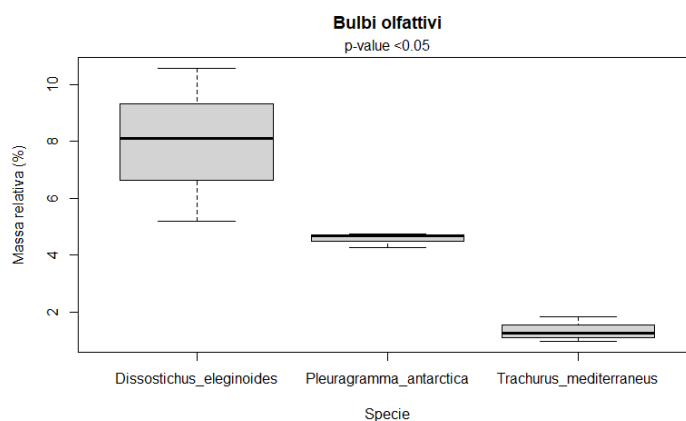


Grafico 5: boxplot dei valori di massa relativa dei bulbi olfattivi, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Si riporta qui di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard mediana della massa percentuale (Tab. 3).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>D. eleginoides</i>	7.95%	2.69%	5.19%
<i>P. antarctica</i>	4.57%	0.26%	4.69%
<i>T. mediterraneus</i>	1.36%	0.44%	1.25%

Tabella 3

Volume [mm³]

I dati relativi al volume sono stati analizzati con il test di kruskal-Wallis che ha evidenziato l'assenza di differenze significative tra le specie (p-value= 0.0594). Però, come visualizzabile nei seguenti boxplot, sembrano esserci differenze notevoli tra le specie, molto probabilmente la presenza di pochi dati ha portato all'ottenimento di un valore di p-value leggermente maggiore a 0.05 (Graf. 6).

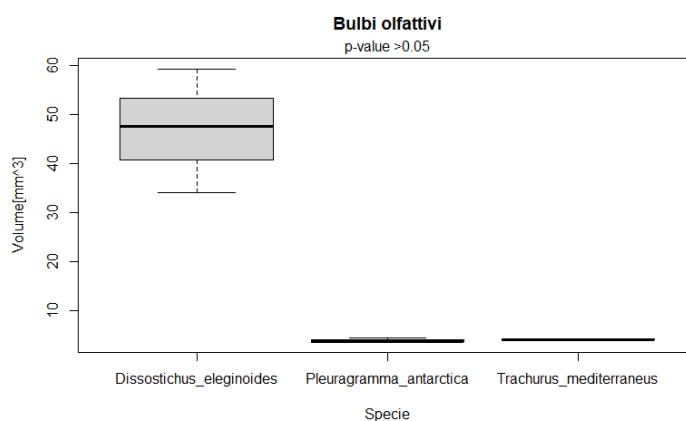


Grafico 6: boxplot dei valori di volume [mm³] de bulbi olfattivi, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Si riporta di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana (Tab. 4).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>D. eleginoides</i>	46.94	12.63	47.60
<i>P. antarctica</i>	3.99	0.43	3.74
<i>T. mediterraneus</i>	4.11	0.07	4.11

Tabella 4

Relazione massa e cellule totali

Mediante l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile visualizzare se vi fosse una relazione tra le due variabili, riprendendo analisi che vengono condotte in letteratura scientifica (e. g.: Herculano-Houzel et al., 2006; Herculano-Houzel et al., 2007). È risultata una correlazione mediamente positiva ($r= 0.6050634$), nonostante ciò, la correlazione non risultata statisticamente significativa (p-value= 0.0843); molto probabilmente l'alto valore di r è dovuto a uno scarso numero di dati per quanto concerne i bulbi olfattivi (Graf. 7).

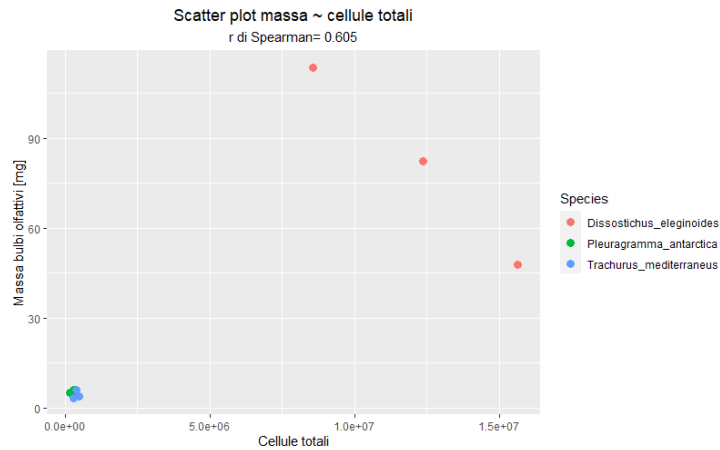


Grafico 7: scatter plot dei dati di masse dei bulbi olfattivi [mg] in funzione del numero di cellule totali.

Relazione densità cellulare e massa

Il coefficiente di correlazione di Spearman ha permesso di evidenziare l'assenza di relazione tra le due variabili ($r= 0.2016878$, $p\text{-value} >0.05$) (Graf. 8).

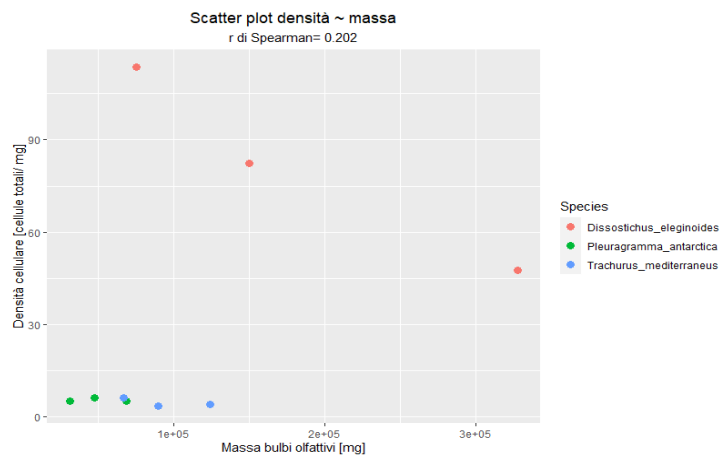


Grafico 8: scatter plot dei dati di densità cellulare in funzione della massa dei bulbi olfattivi [mg].

Relazione massa bulbi olfattivi e massa encefalica

Data la presenza di pochi dati non è stato possibile mettere in evidenza nessuna correlazione statisticamente significativa ($p\text{-value} >0.05$) e quindi non è stato possibile realizzare un modello di regressione che potesse descrivere l'andamento delle due variabili (Graf. 9).

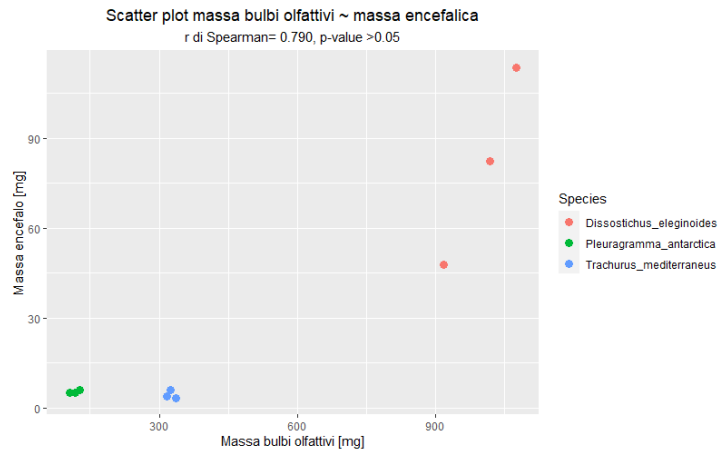


Grafico 9: scatter plot dei dati di massa encefalica [mg] in funzione della massa dei bulbi olfattivi [mg].

Cervelletto

Cellule totali

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, $p= 0.3716$; test di Bartlett, $p= 0.6847$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{cellule totali} + 1) \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un $p\text{-value} < 0.05$ ($p\text{-value: } 0.0001444$) quindi sono risultate differenze significative tra le specie per quanto concerne il numero di cellule totali. È stato necessario applicare la trasformazione logaritmica in base 10 per far sì che la variabile risposta assumesse distribuzione normale (Graf. 10).

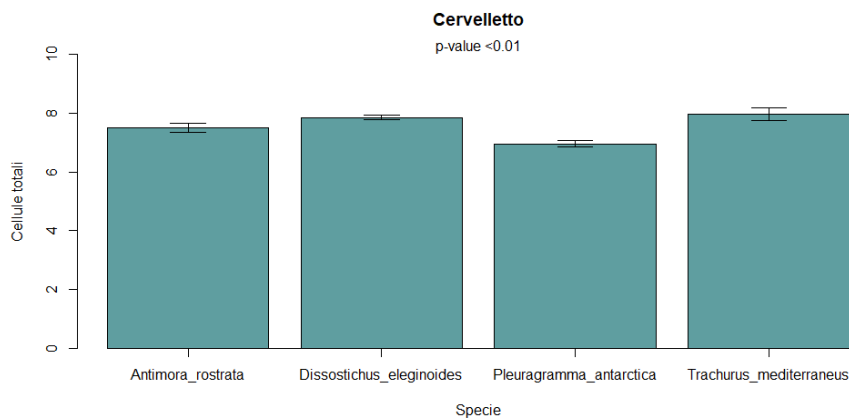


Grafico 10: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di cellule totali nel cervelletto in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

Student-Newman-Keuls test for: Specie

Standard error = 0.0861

Df = 8

	Pleuragramma_antarctica	Antimora_rostrata	Dissostichus_eleginoides	Trachurus_mediterraneus
Rank order:	1	2	3	4
Ranked means:	6.9588	7.4936	7.8571	7.9578

Comparisons:

1	4-1 ***			
2	3-1 ***	4-2 *		
3	2-1 **	3-2 *	4-3 ns	

Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'

Sono risultate differenze altamente significative tra *P. antarctica* e *D. eleginoides* e tra *P. antarctica* e *T. mediterraneus* e differenze significative tra *P. antarctica* e *A. rostrata*. Differenze abbastanza significative sono state riscontrate tra *A. rostrata* e *T. mediterraneus* e tra *A. rostrata* e *D. eleginoides*. Non ci sono differenze significative tra *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*.

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori medi, di deviazione standard e mediana del numero di cellule totali (Tab 5).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	3.26E+07	1.14E+07	3.22E+07
<i>D. eleginoides</i>	7.29E+07	1.41E+07	7.49E+07
<i>P. antarctica</i>	9.28E+06	2.15E+06	1.02E+07
<i>T. mediterraneus</i>	9.86E+07	5.20E+07	6.90E+07

Tabella 5

Densità cellulare

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, $p=0.09677$; test di Bartlett, $p=0.7929$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{cellule totali}/\text{mg} + 1) \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un $p\text{-value} < 0.05$ ($p\text{-value}: 0.0009924$) quindi sono risultate differenze significative tra le specie per quanto concerne la densità cellulare (Graf. 11).

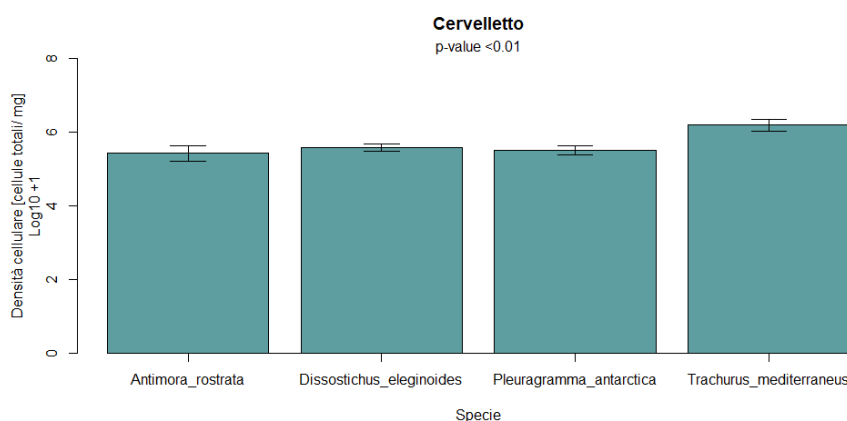


Grafico 11: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di densità cellulare nel cervelletto in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

```
Student-Newman-Keuls test for: Specie
Standard error = 0.0881
Df = 8
Rank order: 1 Antimora_rostrata 2 Pleuragramma_antarctica 3 Dissostichus_eleginoides 4 Trachurus_mediterraneus
Ranked means: 5.4256 5.5099 5.5738 6.194
Comparisons:
1 4-1 **
2 3-1 ns 4-2 **
3 2-1 ns 3-2 ns 4-3 **
---
Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'
```

Sono risultate differenze significative tra *A. rostrata* e *T. mediterraneus* e non significative tra *A. rostrata* e le altre due specie. Anche *P. antarctica* e *D. eleginoides* mostrano differenze significative nei confronti di *T. mediterraneus* che, dai nostri dati, emerge come la specie con la densità cellulare più elevata a livello del cervelletto.

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori medi, di deviazione standard e di mediana della densità cellulare (Tab. 6).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	2.87E+05	1.31E+05	2.72E+05
<i>D. eleginoides</i>	3.81E+05	7.93E+04	4.06E+05
<i>P. antarctica</i>	3.33E+05	1.02E+05	2.75E+05
<i>T. mediterraneus</i>	1.64E+06	6.12E+05	1.49E+06

Tabella 6

Massa relativa

La massa relativa del cervelletto rispetto alla massa totale dell'encefalo (comprensiva di: cervelletto, ipotalamo, tetto ottico, telencefalo e bulbi olfattivi, quando presenti) è stata sottoposta a un'analisi ANOVA per visualizzare le differenze tra le specie analizzate. I test preliminari di normalità e omoschedasticità della variabile risposta sono stati superati (test di Shapiro-Wilk p-value: 0.862; test di Bartlett p-value: 0.2951).

Il test ANOVA ha restituito un valore di p-value significativo (p-value: 0.01635) evidenziando la presenza di differenze tra le specie analizzate (Graf. 12).

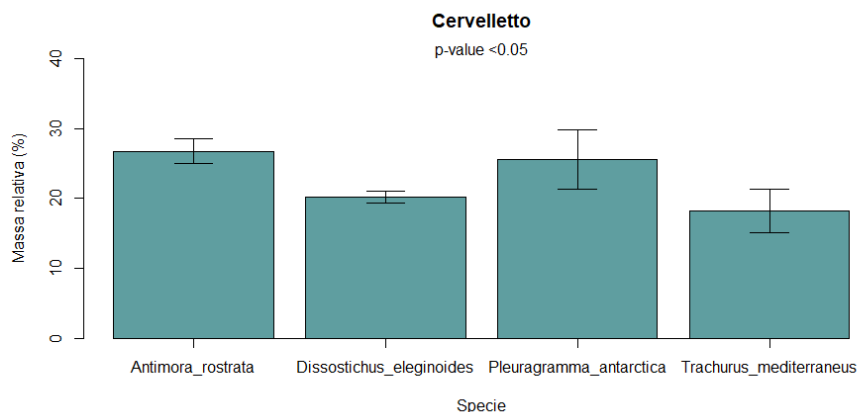


Grafico 12: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di massa relativa del cervelletto in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Effettuando il test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

Student-Newman-Keuls test for: Species

Standard error = 1.6327

Df = 8

	Trachurus_mediterraneus	Dissostichus_eleginoides	Pleuragramma_antarctica	Antimora_rostrata
Rank order:	1	2	3	4
Ranked means:	18.2138	20.2384	25.5498	26.7728

Comparisons:

1	4-1 *		
2	3-1 *	4-2 ns	
3	2-1 ns	3-2 ns	4-3 ns

Signif. codes: <math>< 0.001</math> '***' <math>< 0.01</math> '**' <math>< 0.05</math> '*' >0.05 'ns'

Sono risultate differenze abbastanza significative tra *T. mediterraneus* e *A. rostrata* e tra *T. mediterraneus* e *P. antarctica* ma non significative con *D. eleginoides*. *A. rostrata*, *D. eleginoides* e *P. antarctica* non presentano differenze significative tra loro.

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori medi, di deviazione standard e di mediana della massa percentuale (Tab. 7).

Specie	Massa percentuale	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	26.77%	1.83%	2.72E+05
<i>D. eleginoides</i>	20.24%	0.85%	4.06E+05
<i>P. antarctica</i>	25.55%	4.22%	2.75E+05
<i>T. mediterraneus</i>	18.21%	3.18%	1.49E+06

Tabella 7

Volume [mm³]

I dati di volume del cervelletto sono stati analizzati mediante l'utilizzo del test di Kruskal-Wallis. Il test ha restituito un valore di significatività statistica <math>< 0.05</math> (p-value= 0.02374) evidenziando

differenze tra i volumi del cervelletto delle quattro specie analizzate visualizzabili nel seguente boxplot (Graf. 13).

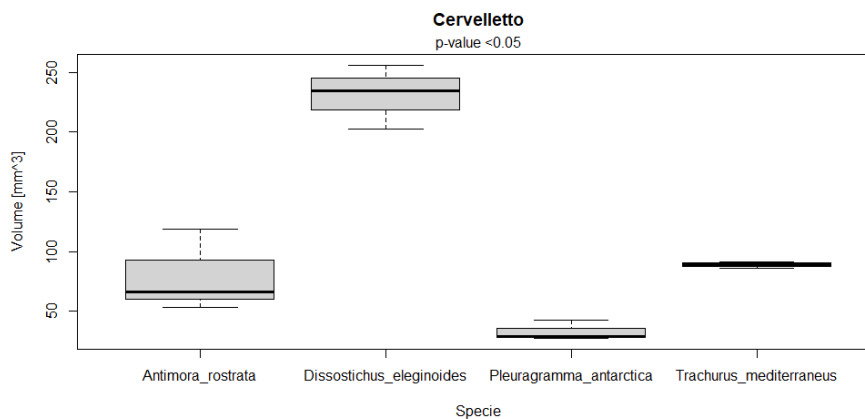


Grafico 13: boxplot dei valori di Volume [mm³] presenti nel cervelletto, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Come si vede nel grafico, vi sono differenze tra i valori di mediana dei volumi. *D. eleginoides* presenta il volume più elevato mentre *P. antarctica* quello minore fra tutte le specie. Si riporta di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana dei volumi (Tab. 8).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	79.36	34.64	66.31
<i>D. eleginoides</i>	230.81	26.606	234.09
<i>P. antarctica</i>	32.93	8.3108	28.72
<i>T. mediterraneus</i>	88.66	2.9315	88.99

Tabella 8

Relazione massa e cellule totali

È stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman tra masse e cellule totali per verificare se vi fosse una correlazione tra le due variabili. L'indice di correlazione di Spearman indica una relazione positiva tra le due variabili ($r = 0.5664336$), è possibile vedere come, in linea generale, all'aumento del numero di cellule totali aumenti la massa del cervelletto, l'unica specie che sembra non rispettare questa regola è *T. mediterraneus* (p-value= 0.0548, leggermente maggiore di 0.05, essendo però i dati poco numerosi si considera la correlazione significativa).

Data la presenza di una correlazione di tipo positivo, si è proceduto con la realizzazione di un modello di regressione per descrivere l'andamento dei dati. Il modello utilizzato è il seguente:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{cellule totali}) + q$$

È stato necessario trasformare la variabile risposta con il logaritmo naturale in modo da avere una distribuzione normale della variabile risposta stessa. La retta che interpola al meglio i dati riportata nello scatter plot seguente ($R^2 = 0.4785$, p-value= 0.0127) (Graf. 14).

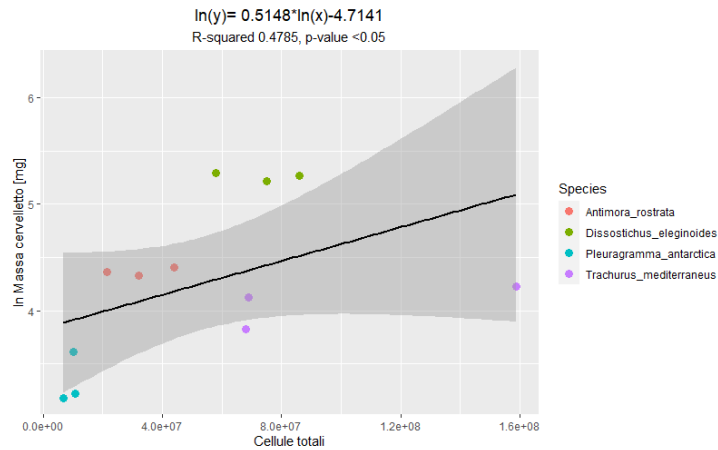


Grafico 14: scatter plot dei dati di massa del cervelletto [mg] in funzione del numero di cellule totali.

Relazione densità cellulare e massa

È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman per vedere se vi fosse una relazione tra le variabili di densità cellulare e massa del cervelletto. È risultata un'assenza di correlazione tra le due variabili con un coefficiente di Spearman prossimo allo zero ($r = -0.1818182$, $p\text{-value} > 0.05$) (Graf. 15).

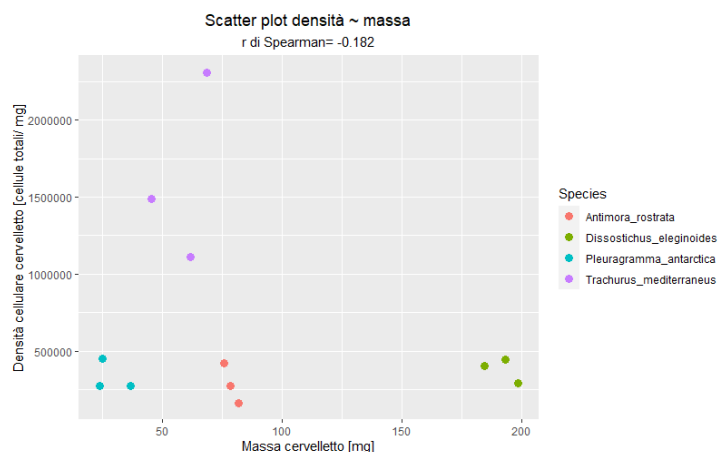


Grafico 15: scatter plot dei dati di densità cellulare nel cervelletto in funzione della massa del cervelletto [mg].

Relazione massa cervelletto e massa encefalica

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile evidenziare una correlazione positiva tra le due variabili (r di Spearman = 0.8251748, $p\text{-value} = 0.01$). si è dunque proceduto con la realizzazione di un modello di regressione lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa cervelletto}) = m * \ln(\text{massa encefalo}) + q$$

È stato necessario trasformare la variabile risposta con il logaritmo naturale in modo da avere una distribuzione normale della variabile risposta stessa. La retta che interpola al meglio i dati riportata nello scatterplot seguente ($R^2 = 0.9382$, $p\text{-value} = 2.29E-07$) (Graf. 16).

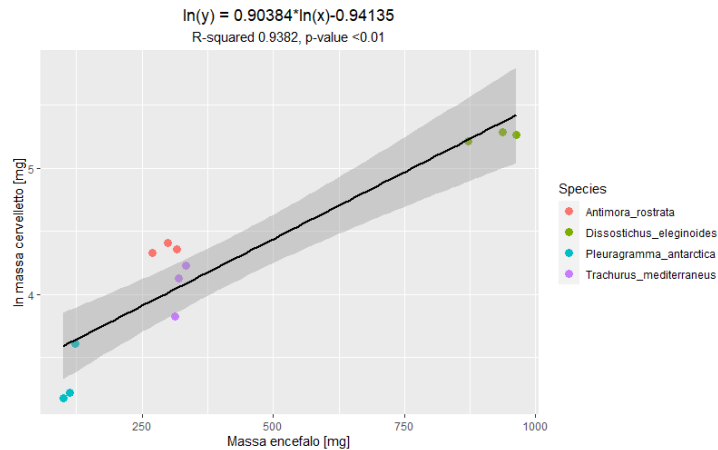


Grafico 16: scatter plot dei dati di massa del cervelletto [mg] e massa encefalica [mg] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Relazione massa e volume

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile appurare che esiste una correlazione positiva tra massa e volume del cervelletto (r di Spearman= 0.8321678, p-value 8E-04). Si è dunque deciso di procedere con la realizzazione di un modello lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{volume}) + q$$

Il modello ottenuto è riportato nel seguente grafico ($R^2= 0.8712$, p-value= 9.238E-06) (Graf. 17).

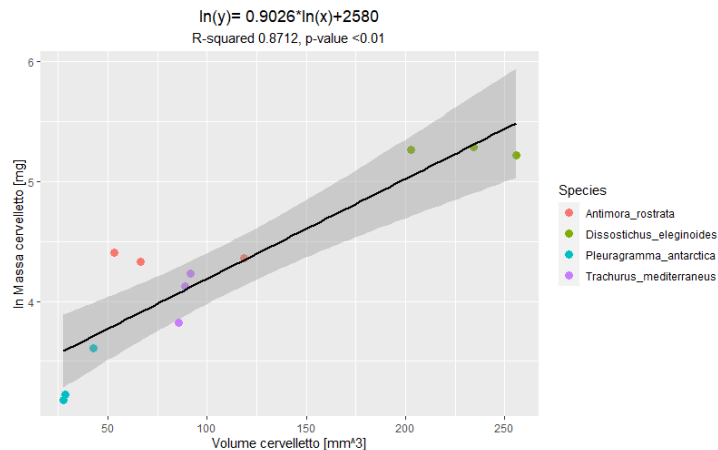


Grafico 17: scatter plot dei dati di massa del cervelletto [mg] e volume del cervelletto [mm³] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Ipotalamo

Si è proceduto mediante la realizzazione di un modello one-way ANOVA per verificare se vi fosse differenze significative nei valori medi di cellule totali e densità cellulare (espressa come cellule totali/ mg). I dati di entrambe le variabili hanno subito una trasformazione logaritmica in base 10 per superare i test di normalità e omoschedasticità.

Cellule totali

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, $p= 0.1011$; test di Bartlett, $p= 0.3408$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{cellule totali}+1) \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un $p\text{-value} < 0.05$ ($p\text{-value: } 1.299\text{E-}05$) quindi sono risultate differenze significative tra le specie per quanto concerne il numero di cellule totali (Graf. 18).

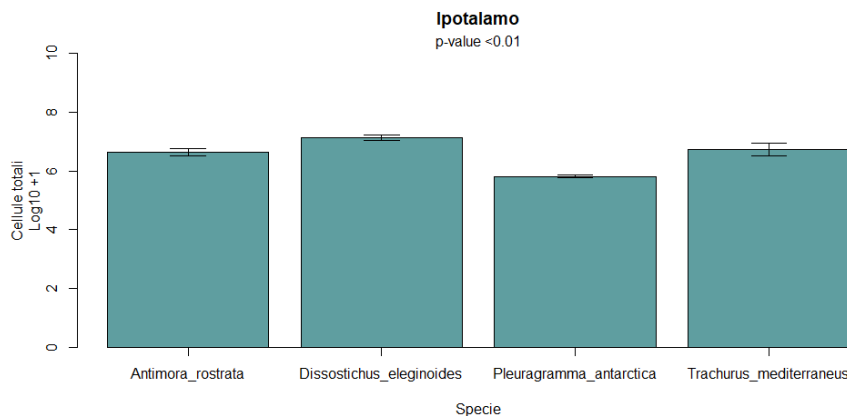


Grafico 18: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di cellule totali nell'ipotalamo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

```
Student-Newman-Keuls test for: Specie
Standard error = 0.0761
Df = 8
Rank order: 1 Pleuragramma_antartica 2 Antimora_rostrata 3 Trachurus_mediterraneus 4 Dissostichus_eleginoides
Ranked means: 5.8044 6.6432 6.7199 7.1183
Comparisons:
1 4-1 ***
2 3-1 *** 4-2 **
3 2-1 *** 3-2 ns 4-3 **
---
Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'
```

Sono risultate differenze altamente significative tra *P. antartica* e le altre tre specie analizzate. Differenze abbastanza significative sono state riscontrate tra *A. rostrata* e *D. eleginoides* e tra *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*. Non ci sono differenze significative tra *T. mediterraneus* e *A. rostrata*.

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori di media, deviazione standard e mediana del numero di cellule totali (Tab. 9).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	4.50E+06	1.14E+06	4.95E+06
<i>D. eleginoides</i>	1.33E+07	2.90E+06	1.19E+07

<i>P. antarctica</i>	6.40E+05	6.86E+04	6.70E+05
<i>T. mediterraneus</i>	5.70E+06	2.93E+06	4.52E+06

Tabella 9

Densità cellulare

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, $p= 0.2084$; test di Bartlett, $p= 0.6833$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{cellule totali}/\text{mg}) \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un $p\text{-value} > 0.05$ ($p\text{-value}: 0.1292$) quindi non ci sono differenze tra le specie per quanto concerne la densità cellulare a livello ipotalamico (Graf. 19).

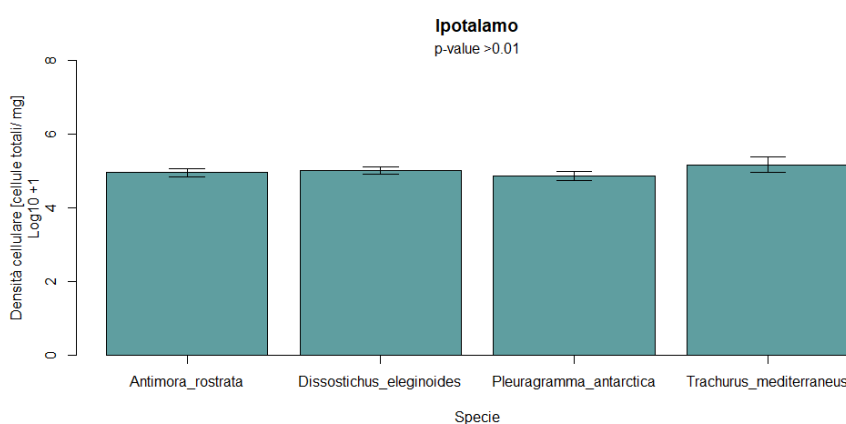


Grafico 19: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di densità cellulare nell'ipotalamo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori di media, deviazione standard e mediana della densità cellulare (Tab. 10).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	9.16E+04	2.18E+04	9.06E+04
<i>D. eleginoides</i>	1.04E+05	2.29E+04	9.45E+04
<i>P. antarctica</i>	7.38E+04	2.19E+04	6.70E+04
<i>T. mediterraneus</i>	1.60E+05	8.51E+04	1.11E+05

Tabella 10

Massa relativa

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk: $p\text{-value}= 0.6613$; test di Bartlett: $p\text{-value}= 0.8202$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{massa percentuale} \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un $p\text{-value} < 0.05$ ($p\text{-value}: 9.888\text{E}-05$) quindi ci sono differenze molto significative tra le specie (Graf. 20).

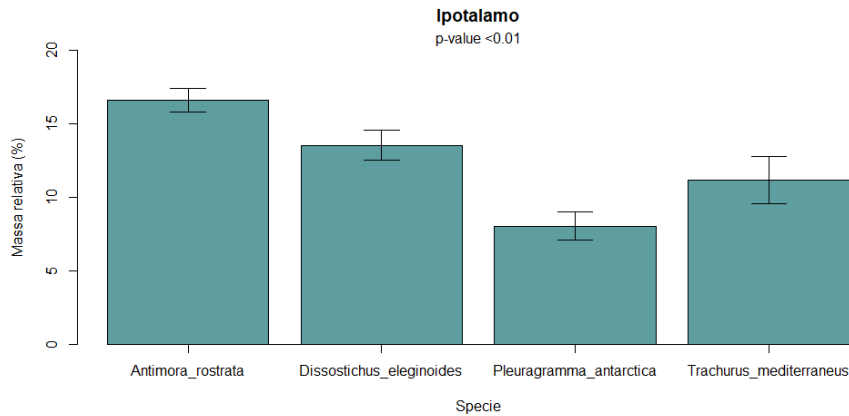


Grafico 20: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di massa relativa dell'ipotalamo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro. Sono risultate differenze altamente significative tra *P. antarctica* e *A. rostrata* e tra *P. antarctica* e *D. eleginoides* e significative con *T. mediterraneus*. Differenze altamente significative sono presenti anche tra *T. mediterraneus* e *A. rostrata* e abbastanza significative tra *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*. Differenze significative si riscontrano anche tra *A. rostrata* e *D. eleginoides*.

Student-Newman-Keuls test for: Species

Standard error = 0.6579

Df = 8

	Pleuragramma_antarctica	Trachurus_mediterraneus	Dissostichus_eleginoides	Antimora_rostrata
Rank order:	1	2	3	4
Ranked means:	8.0433	11.18	13.5367	16.6333
Comparisons:				
1	4-1 ***			
2	3-1 ***	4-2 ***		
3	2-1 **	3-2 *	4-3 *	

Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori medi, di deviazione standard e mediana della massa relativa (Tab. 11).

Specie	Massa percentuale	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	16.63%	0.81%	16.93%
<i>D. eleginoides</i>	13.54%	1.01%	12.79%
<i>P. antarctica</i>	8.04%	0.97%	7.81%
<i>T. mediterraneus</i>	11.18%	1.60%	10.40%

Tabella 11

Volume [mm³]

I dati volumetrici sono stati analizzati mediante il test di Kruskal-Wallis. Sono risultate differenze significative tra le specie (p-value: 0.02374) visualizzabile nel seguente boxplot (Graf. 21).

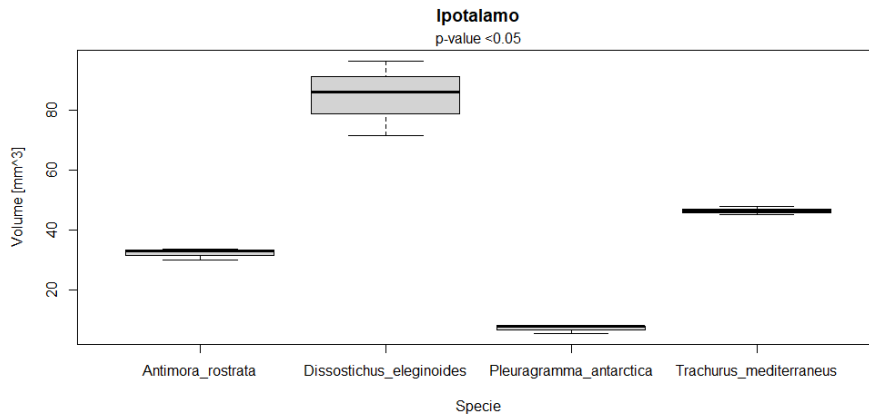


Grafico 21: boxplot dei valori di volume [mm³] dell'ipotalamo, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

D. eleginoides presenta il volume maggiore tra le quattro specie analizzate mentre *P. antarctica* quello minore. Per apprezzare meglio le differenze, si riporta di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana dei volumi (Tab. 12).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	32.10	2.01	32.80
<i>D. eleginoides</i>	84.54	12.54	86.04
<i>P. antarctica</i>	7.00	1.35	7.77
<i>T. mediterraneus</i>	46.29	1.41	46.19

Tabella 12

Relazione massa e cellule totali

L'indice di correlazione di Spearman ($r = 0.8511397$) indica la presenza di una forte correlazione positiva tra le cellule totali e la massa dell'ipotalamo (p-value: 4E-04).

Data la presenza di questa forte correlazione, è stato effettuato il seguente modello di regressione lineare:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{cellule totali}) + q$$

È stato necessario effettuare la trasformazione logaritmica della variabile risposta in modo che questa assumesse una distribuzione normale. La retta che interpola al meglio i dati è riportata nel seguente scatterplot ($R^2 = 0.9009$, p-value: 2.458E-06) (Graf. 22).

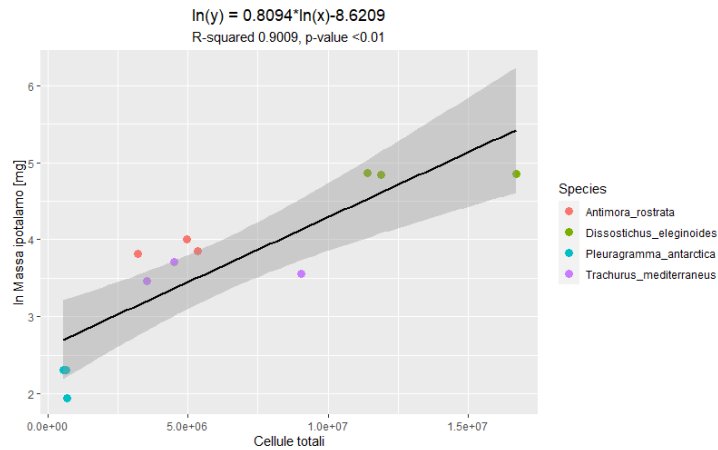


Grafico 22: scatter plot dei dati di massa dell'ipotalamo [mg] in funzione del numero di cellule totali.

Relazione densità cellulare e massa

È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman per vedere se vi fosse una relazione tra le variabili di densità cellulare e massa dell'ipotalamo. È risultata un'assenza di correlazione tra le due variabili con un coefficiente di Spearman prossimo allo zero ($r = 0.1929825$, $p\text{-value} > 0.05$) (Graf. 23).

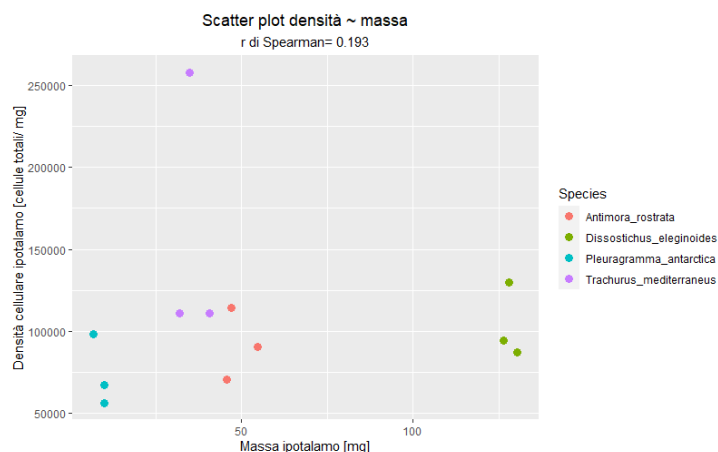


Grafico 23: scatter plot dei dati di densità cellulare nell'ipotalamo in funzione della massa dell'ipotalamo [mg].

Relazione massa ipotalamo e massa encefalica

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile evidenziare una correlazione positiva tra le due variabili (r di Spearman = 0.7880923, $p\text{-value} = 0.0023$). si è dunque proceduto con la realizzazione di un modello di regressione lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa ipotalamo}) = m * \ln(\text{massa encefalo}) + q$$

È stato necessario trasformare la variabile risposta con il logaritmo naturale in modo da avere una distribuzione normale della variabile risposta stessa. La retta che interpola al meglio i dati riportata nello scatterplot seguente ($R^2 = 0.9497$, $p\text{-value} = 8.083E-07$) (Graf. 24).

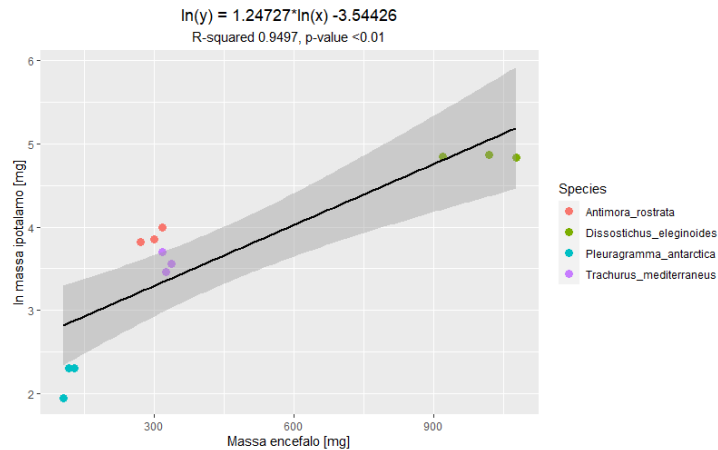


Grafico 24: scatter plot dei dati di massa dell'ipotalamo [mg] e massa encefalica [mg] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Relazione massa e volume

Il coefficiente di correlazione di Spearman ha permesso l'individuazione di una relazione tra le due variabili nell'ipotalamo ($r = 0.7754386$, $p\text{-value} = 0.003$). Si è dunque deciso di procedere con la realizzazione di un modello lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{volume}) + q$$

Il modello ottenuto è riportato nel seguente grafico ($R^2 = 0.9071$, $p\text{-value} = 1.775E-06$) (Graf. 25).

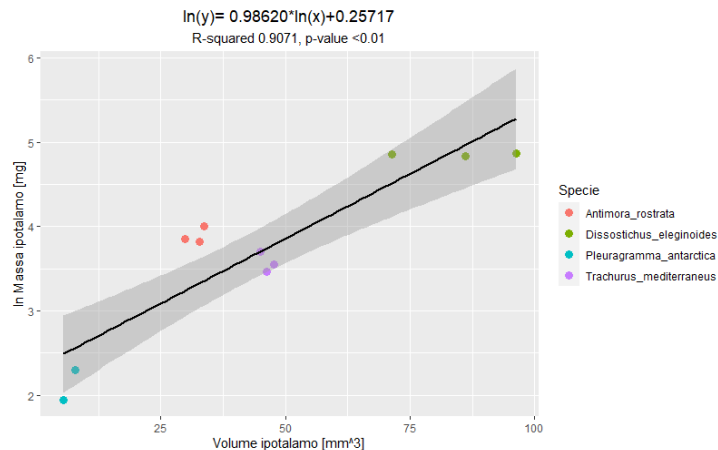


Grafico 25: scatter plot dei dati di massa dell'ipotalamo [mg] e volume dell'ipotalamo [mm³] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Mesencefalo

Si è proceduto mediante la realizzazione di un modello one-way ANOVA per verificare se vi fosse differenze significative nei valori medi di cellule totali e densità cellulare (espressa come cellule totali/ mg). I dati di entrambe le variabili hanno subito una trasformazione logaritmica in base 10 per superare i test di normalità e omoschedasticità; nonostante ciò, non è stato possibile eseguire

un'ANOVA per quanto riguarda la densità cellulare in quanto non è stato superato il test di Shapiro-Wilk (p-value < 0.05).

Cellule totali

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, p= 0.09116 test di Bartlett, p= 0.11789).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{cellule totali}) \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un p-value < 0.05 (p-value: 2.28E-06) quindi sono risultate differenze significative tra le specie per quanto concerne il numero di cellule totali (Graf. 26).

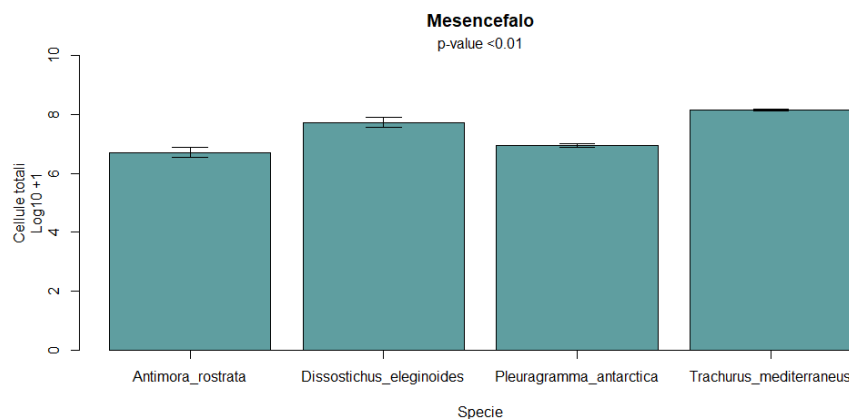


Grafico 26: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di cellule totali nel mesencefalo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

Student-Newman-Keuls test for: Specie

Standard error = 0.0735

Df = 8

	Antimora_rostrata	Pleuragramma_antarctica	Dissostichus_eleginoides	Trachurus_mediterraneus
Rank order:	1	2	3	4
Ranked means:	6.7128	6.9538	7.7276	8.1535

Comparisons:

1	4-1 ***			
2	3-1 ***	4-2 ***		
3	2-1 *	3-2 ***	4-3 **	

Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'

Sono risultate differenze molto significative tra *A. rostrata*, *D. eleginoides* e *T. mediterraneus* e abbastanza significative con *P. antarctica*. Differenze molto significative sono state riscontrate tra *P. antarctica*, *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*; ci sono differenze significative tra *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*.

Si riporta di seguito una tabella riassuntiva con i valori medi e di deviazione standard e mediana del numero di cellule totali (Tab. 13).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	5.46E+06	2.27E+06	4.76E+06
<i>D. eleginoides</i>	5.62E+07	2.11E+07	5.53E+07
<i>P. antarctica</i>	9.05E+06	1.30E+06	9.16E+06
<i>T. mediterraneus</i>	1.43E+08	1.03E+07	1.43E+08

Tabella 13

Densità cellulare

I dati di densità cellulare del mesencefalo sono stati sottoposti al test di Kruskal-Wallis che ha evidenziato la presenza di differenze significative tra le specie (p-value: 0.0329) visualizzabili nei seguenti boxplot (Graf. 27).

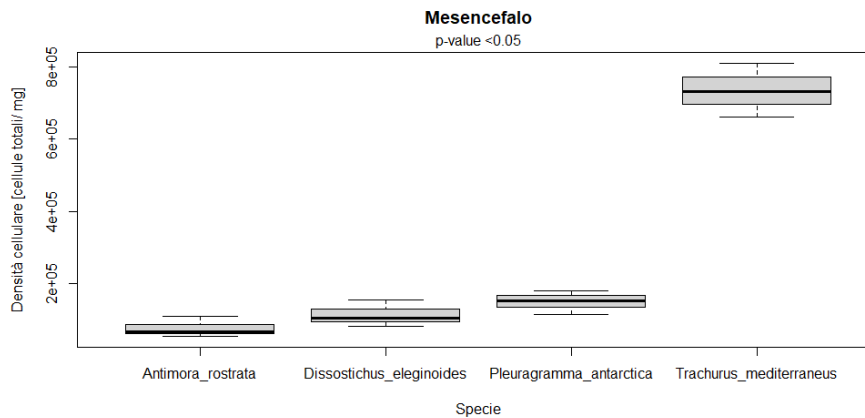


Grafico 27: boxplot dei valori di densità cellulare presenti nel mesencefalo, la linea nera rappresenta i valori di mediana. È possibile vedere come *A. rostrata*, *D. eleginoides* e *P. antarctica* presenti valori simili di densità cellulare e molto inferiori rispetto a *T. mediterraneus*. Si riporta di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana per evidenziare meglio le differenze di densità cellulare (Tab. 14).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	7.71E+04	2.87E+04	6.65E+04
<i>D. eleginoides</i>	1.14E+05	3.70E+04	1.05E+05
<i>P. antarctica</i>	1.49E+05	3.29E+04	1.53E+05
<i>T. mediterraneus</i>	7.33E+05	7.44E+04	7.32E+05

Tabella 14

Massa relativa

I dati di massa percentuale del mesencefalo sono stati sottoposti al test di Kruskal-Wallis che ha evidenziato la presenza di differenze significative tra le specie (p-value= 0.0274) visualizzabili graficamente nei seguenti boxplot (Graf. 28).

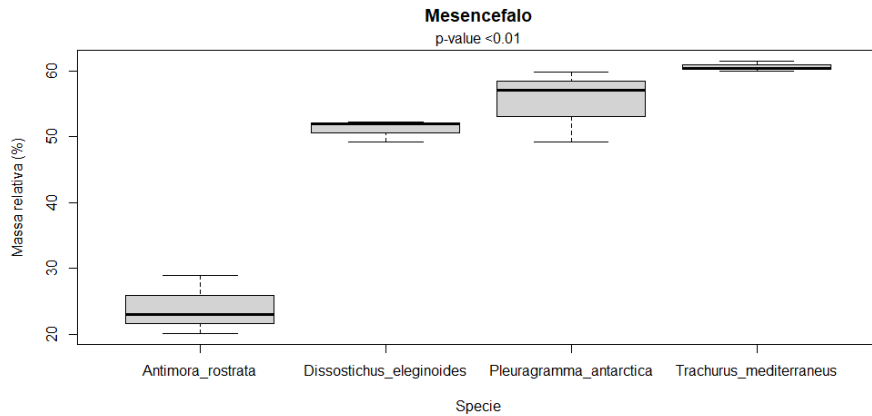


Grafico 28: boxplot dei valori di massa relativa del mesencefalo, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Di seguito viene riportata una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana della massa relativa del mesencefalo (Tab 15).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	24.02%	4.45%	23.03%
<i>D. eleginoides</i>	48.40%	3.03%	51.90%
<i>P. antarctica</i>	52.81%	5.35%	57.00%
<i>T. mediterraneus</i>	59.77%	0.48%	60.34%

Tabella 15

Volume [mm³]

I dati volumetrici sono stati sottoposti al test di Kruskal-Wallis che ha evidenziato la presenza di differenze significative tra le specie (p-value= 0.02162), visualizzabili attraverso i seguenti boxplot (Graf. 29).

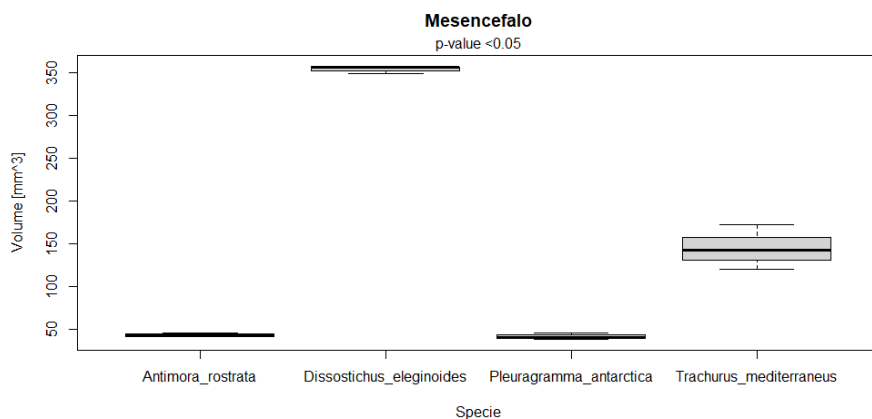


Grafico 29: boxplot dei valori di volume [mm³] del mesencefalo, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Si riporta di seguito una tabella con i valori di mediana dei volumi del mesencefalo tra le specie (Tab. 16).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	43.44	2.46	42.93
<i>D. eleginoides</i>	354.18	4.53	356.16
<i>P. antarctica</i>	41.84	3.50	40.93
<i>T. mediterraneus</i>	145.18	26.51	142.51

Tabella 16

Relazione massa e cellule totali

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman ($r= 0.6433566$, $p\text{-value}= 0.024$) è stato possibile individuare una correlazione positiva tra massa del mesencefalo e cellule totali.

È stata, dunque, eseguita una regressione lineare per mettere in relazione le due variabili, del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{cellule totali}) + q$$

Anche in questo caso è stato necessario trasformare la variabile risposta con il logaritmo naturale in modo che la stessa assumesse una distribuzione normale. Nel grafico scatter viene mostrata la retta che interpola al meglio i dati ($R^2= 0.5811$, $p\text{-value}= 0.003943$) (Graf. 30).

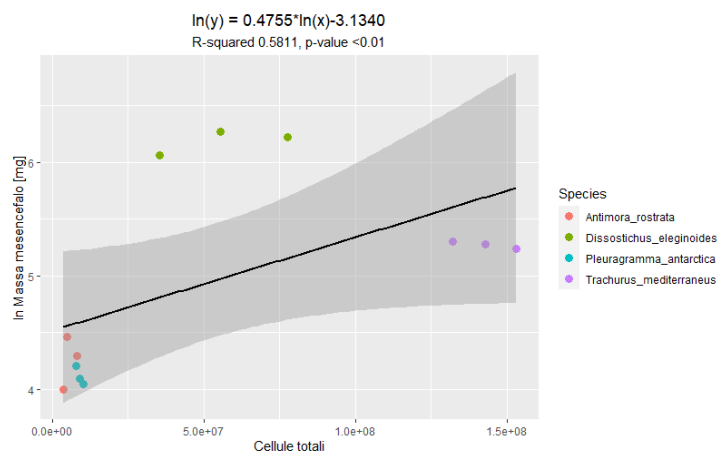


Grafico 30: scatter plot dei dati di massa del mesencefalo [mg] in funzione del numero di cellule totali con sovrapposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Relazione densità cellulare e massa

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di Spearman è stato possibile evidenziare che non esiste alcuna correlazione tra le due variabili ($r= 0.1188811$, $p\text{-value} > 0.05$) (Graf. 31).

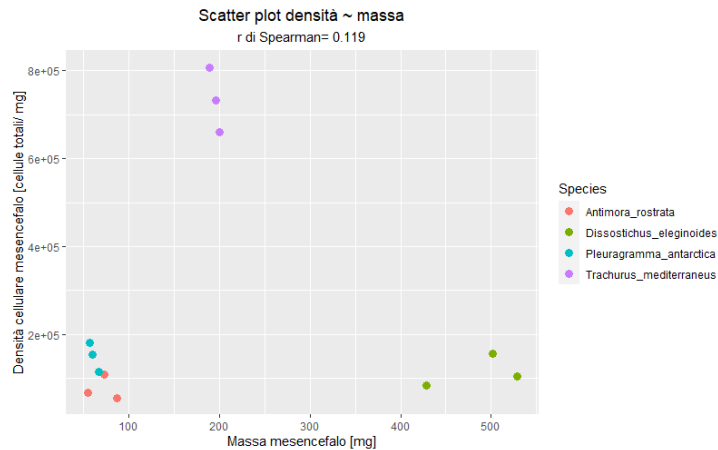


Grafico 31: scatter plot dei dati di densità cellulare nel mesencefalo in funzione della massa del mesencefalo [mg].

Relazione massa mesencefalo e massa encefalica

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile evidenziare una correlazione positiva tra le due variabili (r di Spearman= 0.9230769, p -value= 0.00). si è dunque proceduto con la realizzazione di un modello di regressione lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa mesencefalo}) = m * \ln(\text{massa encefalo}) + q$$

È stato necessario trasformare la variabile risposta con il logaritmo naturale in modo da avere una distribuzione normale della variabile risposta stessa. La retta che interpola al meglio i dati riportata nello scatterplot seguente ($R^2 = 0.7926$, p -value= 0.0001039) (Graf. 32).

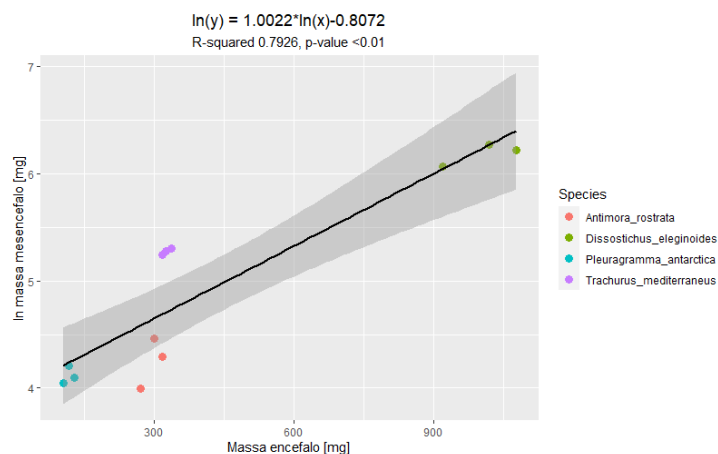


Grafico 32: scatter plot dei dati di massa del mesencefalo [mg] in funzione della massa encefalica [mg] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Relazione massa e volume

Il coefficiente di correlazione di Spearman ha permesso l'individuazione di una relazione tra le due variabili nell'ipotalamo ($r = 0.8461538$, p -value= 5E-04). Si è dunque deciso di procedere con la realizzazione di un modello lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{volume}) + q$$

Il modello ottenuto è riportato nel seguente grafico ($R^2= 0.9705$, $p\text{-value}= 5.539E-09$) (Graf. 33).

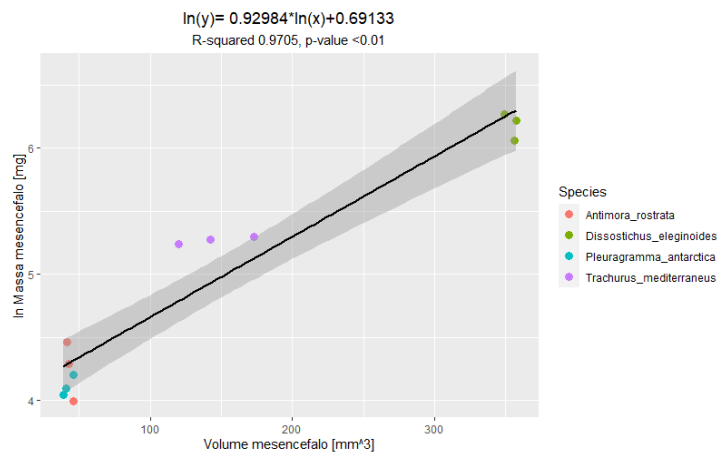


Grafico 33: scatter plot dei dati di massa del mesencefalo [mg] in funzione del volume del mesencefalo [mm³] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Telencefalo

Si è proceduto mediante la realizzazione di un modello one-way ANOVA per verificare se vi fosse differenze significative nei valori medi di cellule totali e densità cellulare (espressa come cellule totali/ mg). I dati di entrambe le variabili hanno subito una trasformazione logaritmica in base 10 per superare i test di normalità e omoschedasticità.

Cellule totali

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, $p= 0.1073$; test di Bartlett, $p= 0.1997$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: $\text{Log}_{10}(\text{cellule totali}+1) \sim \text{specie}$; è stato ottenuto un $p\text{-value} < 0.05$ ($p\text{-value}: 5.519E-05$) quindi sono risultate differenze significative tra le specie per quanto concerne il numero di cellule totali (Graf. 34).

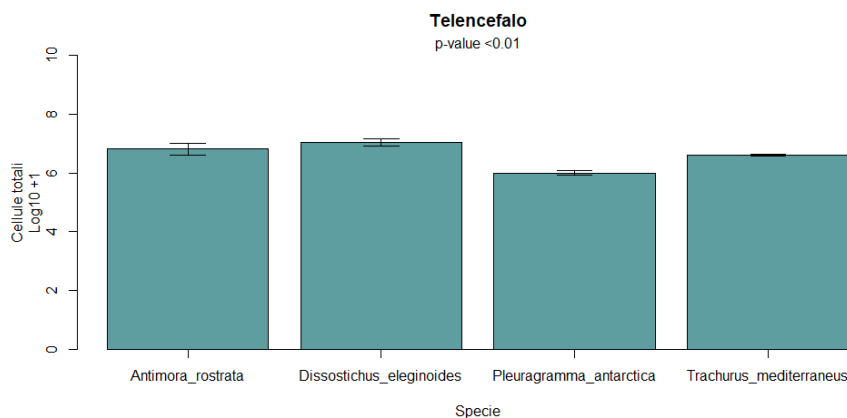


Grafico 34: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di cellule totali nel telencefalo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

Student-Newman-Keuls test for: Specie

Standard error = 0.0741

Df = 8

	Pleurogramma_antarctica	Trachurus_mediterraneus	Antimora_rostrata	Dissostichus_eleginoides
Rank order:	1	2	3	4
Ranked means:	5.9997	6.6157	6.8076	7.0336
Comparisons:				
1	4-1 ***			
2	3-1 ***	4-2 **		
3	2-1 ***	3-2 ns	4-3 ns	

Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'

Sono risultate differenze altamente significative tra *P. antarctica* e le altre tre specie analizzate. Differenze abbastanza significative sono state riscontrate tra *A. rostrata* e *T. mediterraneus* mentre non ci sono differenze significative tra *A. rostrata* e *D. eleginoides*. Non ci sono differenze significative tra *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*.

Si riporta di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana (Tab. 17).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	6.96E+06	3.59E+06	5.03E+06
<i>D. eleginoides</i>	1.11E+07	3.02E+06	1.26E+07
<i>P. antarctica</i>	1.01E+06	1.71E+05	9.48E+05
<i>T. mediterraneus</i>	4.14E+06	3.31E+05	4.13E+06

Tabella 17

Densità cellulare

Entrambi i test statistici preliminari sono stati superati (test di Shapiro-Wilk, $p=0.455$; test di Bartlett, $p=0.2585$).

Il modello ANOVA utilizzato è il seguente: cellule totali/ mg~ specie; è stato ottenuto un p-value < 0.05 (p-value: 0.01387) quindi sono risultate differenze significative tra le specie per quanto concerne la densità cellulare (Graf. 35).

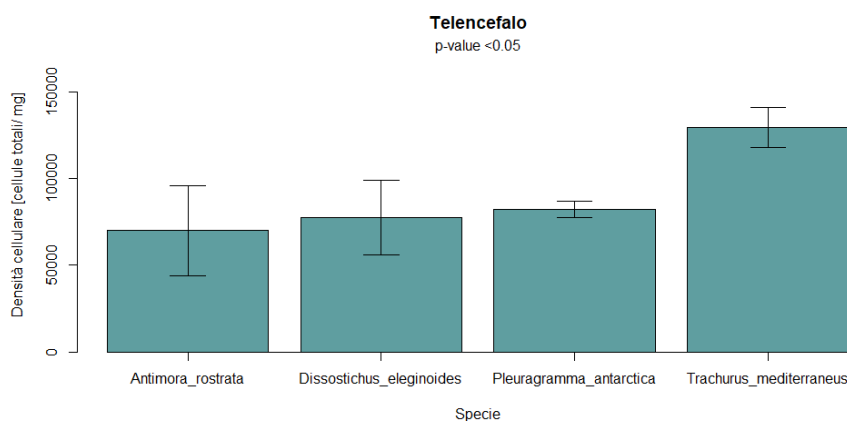


Grafico 35: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di densità cellulare nel telencefalo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

```

Student-Newman-Keuls test for: Specie
Standard error = 10387.29
Df = 8
Rank order: 1 Antimora_rostrata 2 Dissostichus_eleginoides 3 Pleuragramma_antarctica 4 Trachurus_mediterraneus
Ranked means: 70100 77433.3333 82266.6667 129666.6667
Comparisons:
1 4-1 *
2 3-1 ns 4-2 *
3 2-1 ns 3-2 ns 4-3 *
---
Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'
    
```

Sono risultate differenze abbastanza significative tra *A. rostrata*, *P. antarctica*, *D. eleginoides* e *T. mediterraneus* mentre non sono presenti differenze tra le altre specie.

Si riporta di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana (Tab. 18).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	7.01E+04	2.60E+04	5.66E+04
<i>D. eleginoides</i>	7.74E+04	2.16E+04	8.10E+04
<i>P. antarctica</i>	8.23E+04	4.74E+03	8.01E+04
<i>T. mediterraneus</i>	1.30E+05	1.18E+04	1.28E+05

Tabella 18

Massa relativa

I dati di massa percentuale del telencefalo sono stati sottoposti al test di Kruskal-Wallis che ha evidenziato la presenza di differenze significative tra le specie (p-value= 0.02374) osservabili nei seguenti boxplot (Graf. 36).

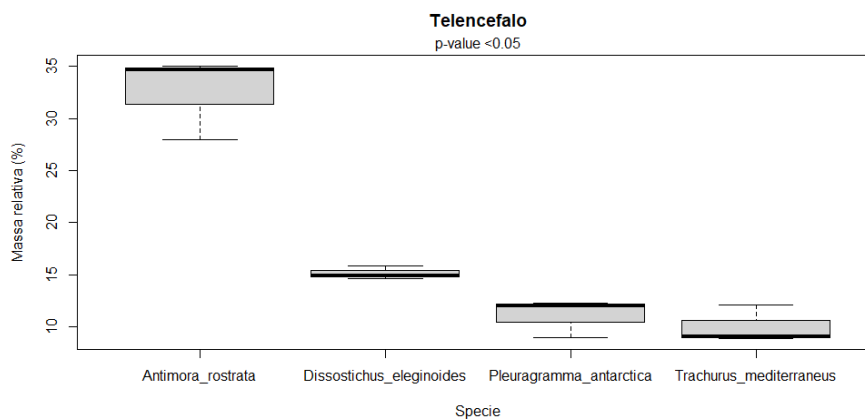


Grafico 36: boxplot dei valori di massa relativa del telencefalo, la linea nera rappresenta i valori di mediana.

Si allega di seguito una tabella con i valori di media, deviazione standard e mediana per meglio interpretare i boxplot.

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	32.58%	3.98%	34.73%
<i>D. eleginoides</i>	14.36%	1.39%	14.96%
<i>P. antarctica</i>	10.56%	1.75%	12.00%
<i>T. mediterraneus</i>	9.88%	1.75%	9.09%

Tabella 19

Volume [mm³]

I valori di volume del telencefalo sono stati analizzati preformando una oneway-ANOVA, il modello utilizzato è il seguente: volume ~ specie. È stato ottenuto un valore di p-value significativo <0.05 (p-value= 0.0001157) evidenziando la presenza di differenze tra le specie (Graf. 37).

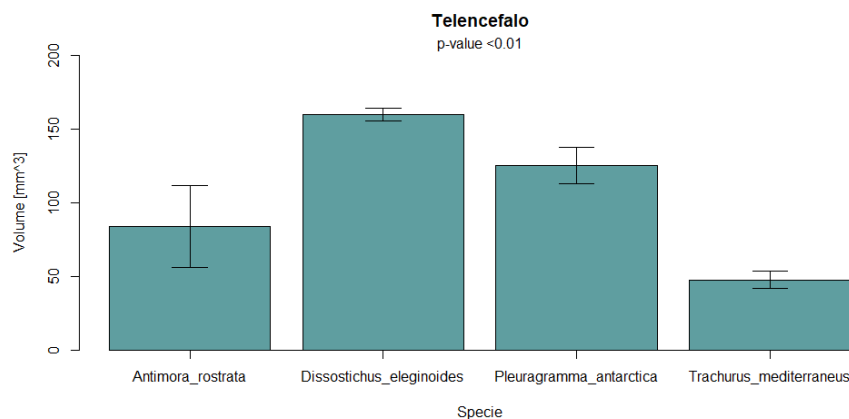


Grafico 37: rappresentazione grafica del risultato del test ANOVA condotta sui valori di Volume [mm³] del telencefalo in funzione delle specie, le barre rappresentano i valori medi, le barre la deviazione standard.

Mediante l'utilizzo del test di Student-Newman-Keuls è stato possibile indagare quali specie presentassero differenze significative tra di loro.

Student-Newman-Keuls test for: Species

Standard error = 9.0545
Df = 8

	Trachurus_mediterraneus	Antimora_rostrata	Pleuragramma_antarctica	Dissostichus_eleginoides
Rank order:	1	2	3	4
Ranked means:	47.5002	83.7131	125.3455	160.0055

Comparisons:

1	4-1 ***		
2	3-1 ***	4-2 ***	
3	2-1 *	3-2 *	4-3 *

Signif. codes: <0.001 '***' <0.01 '**' <0.05 '*' >0.05 'ns'

Sono presenti differenze altamente significative tra *T. mediterraneus* e *P. antarctica* e *D. eleginoides*, differenze abbastanza significative tra *T. mediterraneus* e *A. rostrata*. Sono, inoltre, presenti differenze altamente significative tra *A. rostrata* e *D. eleginoides* e abbastanza significative tra *A.*

rostrata e *P. antarctica*. Sono, infine, presenti differenze abbastanza significative tra *P. antarctica* e *D. eleginoides*.

Si riporta di seguito una tabella con i valori medi e di deviazione standard e mediana dei volumi del telencefalo nelle specie analizzate (Tab. 20).

Specie	Media	Deviazione standard	Mediana
<i>A. rostrata</i>	83.71	27.90	67.97
<i>D. eleginoides</i>	160.01	4.29	162.36
<i>P. antarctica</i>	125.35	12.36	125.70
<i>T. mediterraneus</i>	47.50	5.84	46.59

Tabella 20

Relazione massa e cellule totali

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile evidenziare la presenza di una correlazione forte positiva tra le due variabili ($r= 0.965035$, $p\text{-value}: 0.00$).

È stata effettuata una regressione lineare tra le due variabili, anche in questo caso è stato necessario utilizzare il logaritmo naturale per trasformare la variabile risposta (la massa) per fare in modo che questa avesse distribuzione normale; il modello generale di regressione lineare utilizzato è il seguente:

$$\ln(\text{massa}) = m * \ln(\text{cellule totali}) + q$$

Vediamo in grafico la retta, con la sua equazione, che interpola al meglio i dati ($R^2= 0.8937$, $p\text{-value}= 3.497E-06$) (Graf. 38).

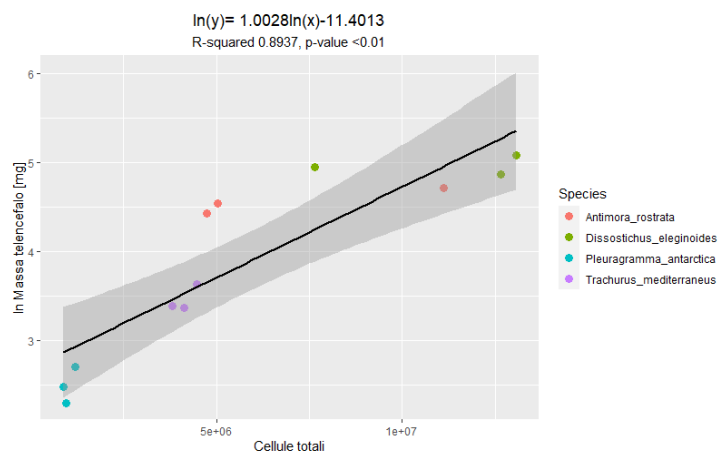


Grafico 38: : scatter plot dei dati di massa del telencefalo [mg] in funzione del numero di cellule totali con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Relazione densità cellulare e massa

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile evidenziare che non esiste alcun tipo di correlazione tra le due variabili in esame ($r= -0.1888112$, $p\text{-value} > 0.05$) (Graf. 39).

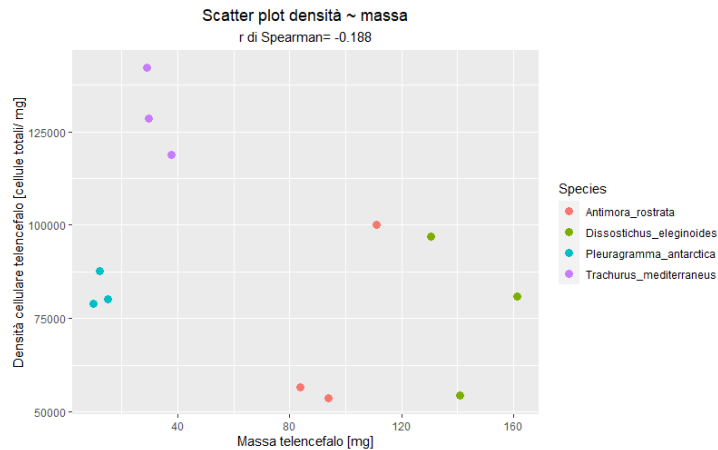


Grafico 39: scatter plot dei dati di densità cellulare nel telencefalo in funzione della massa del telencefalo [mg].

Relazione massa telencefalo e massa encefalica

Attraverso l'utilizzo del coefficiente di correlazione di Spearman è stato possibile evidenziare una correlazione positiva tra le due variabili (r di Spearman= 0.7902098, p -value= 0.0022). si è dunque proceduto con la realizzazione di un modello di regressione lineare del seguente tipo:

$$\ln(\text{massa telencefalo}) = m * \ln(\text{massa encefalo}) + q$$

È stato necessario trasformare la variabile risposta con il logaritmo naturale in modo da avere una distribuzione normale della variabile risposta stessa. La retta che interpola al meglio i dati riportata nello scatterplot seguente ($R^2 = 0.768$, p -value= 0.0001841) (Graf. 40).

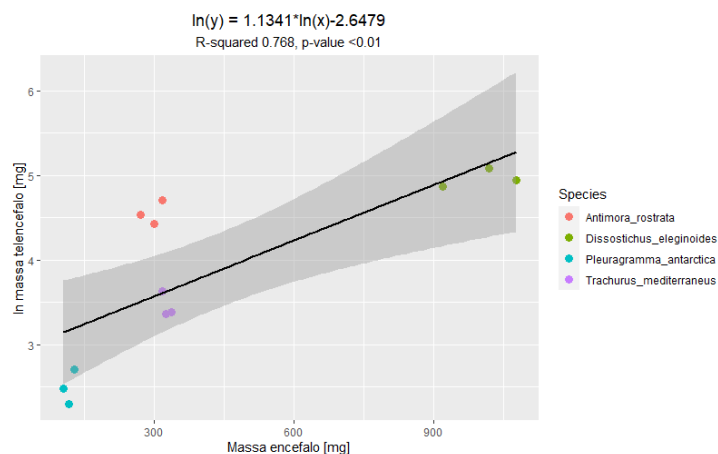


Grafico 40: scatter plot dei dati di massa del telencefalo [mg] e massa encefalica [mg] con sovrainposta la retta di regressione che meglio approssima il loro andamento.

Relazione massa e volume

Il coefficiente di correlazione di Spearman ha permesso l'individuazione di un'assenza relazione tra le due variabili nell'ipotalamo ($r = 0.4545455$, p -value= 0.1377) (Graf. 41).

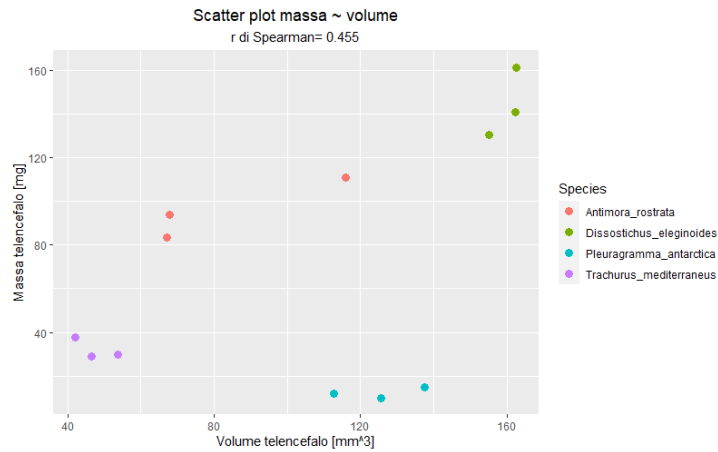


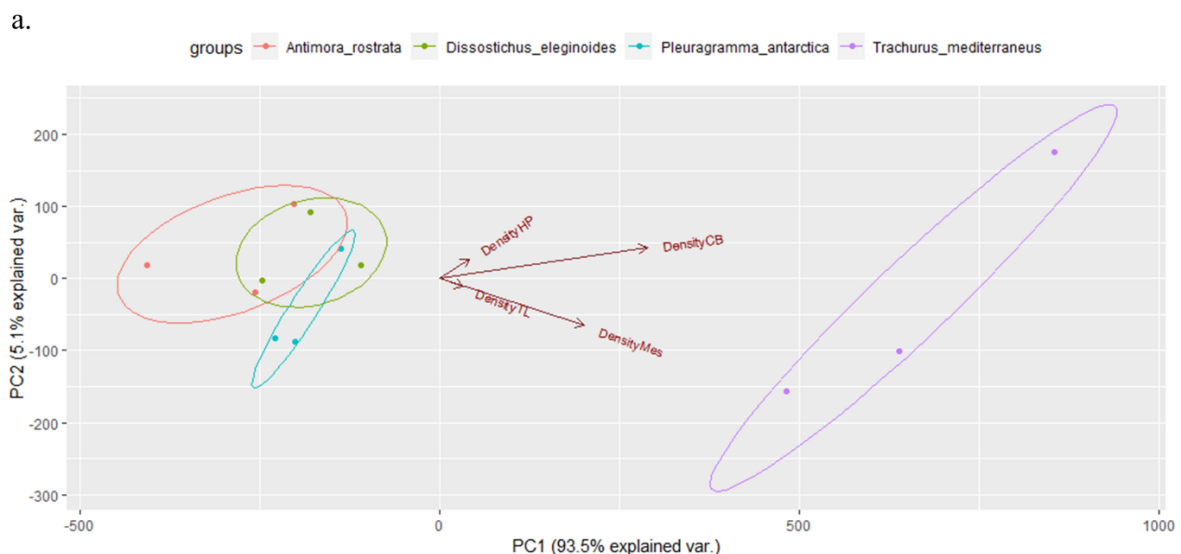
Grafico 41: scatter plot dei dati di massa del telencefalo [mg] in funzione del volume del telencefalo [mm³].

Analisi delle componenti principali (PCA)

È stata effettuata, infine, un'analisi multivariata utilizzando come variabili risposta la densità cellulare di cervelletto, ipotalamo, mesencefalo e telencefalo dal momento che queste variabili non hanno relazione con la massa. Dal momento che la PCA lavora meglio su dati trasformati, è stata effettuata una trasformazione con radice quadrata. Di seguito vengono riportati la tabella degli assi PC (Tab. 21), il grafico della PCA (Graf. 42^a) e il relativo screeplot (Graf. 42b) che consentono di capire quanto ciascun asse contribuisca alla spiegazione della variabilità del sistema.

	PC1	PC2	PC3	PC4
Densità CB	0.81315381	0.5121416	-0.2590968	0.09675078
Densità HP	0.11444250	0.3250210	0.8889182	-0.30180895
Densità Mes	0.56363895	-0.7829517	0.1374928	-0.22448512
Densità TL	0.08941434	-0.1380545	0.3518365	0.92149719

Tabella 21: contributo di ciascuna variabile risposta agli assi PC.



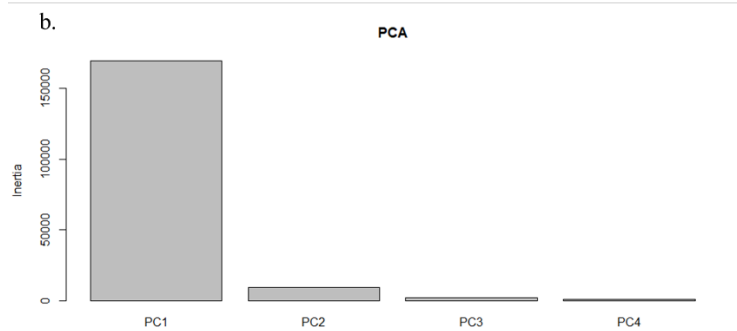


Grafico 42: a. rappresentazione grafica dell'analisi multivariata realizzata utilizzando i dati di densità cellulare di ciascuna regione per ciascuna specie; b. screeplot della PCA: si vede come i primi due assi PC descrivano la maggiore variabilità del sistema, pertanto, l'analisi multivariata realizzata è buona.

Analisi sequenze RBFOX3

Le sequenze della proteina RBFOX3 sono state allineate e nelle immagini è possibile vedere il risultato del multi-allineamento.

Nelle immagini vediamo l'allineamento delle sequenze di diversi organismi sui quali è stato effettuato il frazionamento isotropico: *H. glaber* (Herculano-Houzel et al., 2011); *C. jacchus*, *G. gorilla gorilla*, *H. sapiens*, *M. mulatta*, *S. (Cebus) apella* (Herculano-Houzel & Kaas, 2011); *L. africana* (Herculano-Houzel et al., 2014); *C. porcellus*, *M. auratus*, *M. musculus*, *O. cuniculus*, *R. norvegicus*, (Ribeiro et al., 2014); *C. lupus familiaris*, *F. catus*, *H. hyaena*, *M. putorius furo*, *U. arctos horribilis* (Jardim-Messeder et al., 2017), *P. reticulata* (Marhounová et al., 2019); *S. canicula* (Aicardi et al., 2020); *R. aegyptiacus* (Herculano-Houzel et al., 2020). Per una migliore visualizzazione delle sequenze, è stato riportato l'allineamento comprendente i primi 100 aminoacidi della proteina umana (Fig. 9) e, di seguito, l'allineamento delle sequenze della proteina RBFOX3 dalla prima metionina dell'uomo fino all'amminoacido terminale di ciascuna specie (Fig. 10).

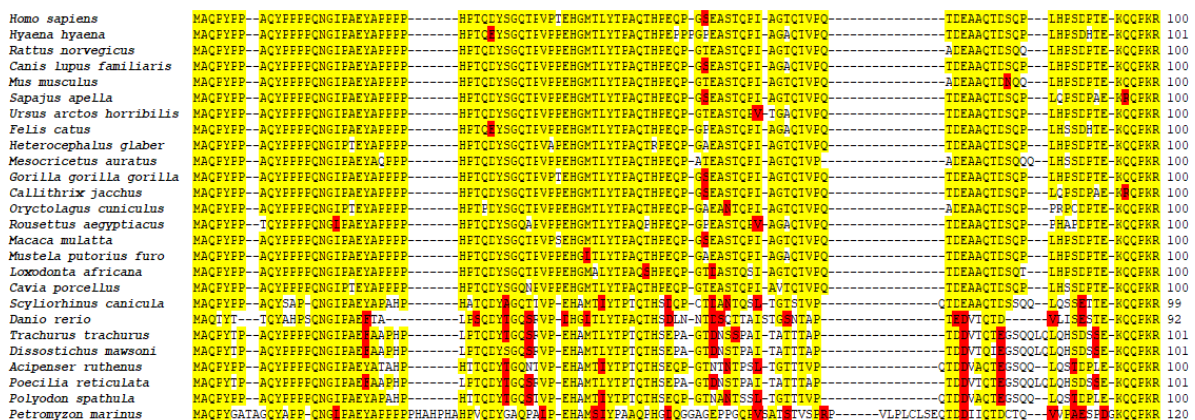


Figura 9: rappresentazione grafica del multi-allineamento dei primi 100 aminoacidi della proteina RBFOX3; in giallo sono rappresentati gli aminoacidi identici mentre in rosso quelli simili.

Homo sapiens	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Hyamca hyaena	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	118
Rattus norvegicus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Canis lupus familiaris	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Mus musculus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Sapajus apella	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Ursus arctos horribilis	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Felis catus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Heterocephalus glaber	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Mesocricetus auratus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Gorilla gorilla gorilla	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Callithrix jacchus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Oryctolagus cuniculus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Rousettus aegyptiacus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Macaca mulatta	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Mustela putorius furo	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Loxodonta africana	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Cavia porcellus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Scyliorhinus canicula	MACYFEP ACYFAPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Poecilia reticulata	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	118
Danio rerio	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	118
Trachurus trachurus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	109
Dissostichus mawsoni	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	118
Acipenser ruthenus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Polyodon spathula	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	117
Petromyzon marinus	MACYFEP ACYFFPCNGIFAEYAFEPF	FTCYSGQIVFVEFHGMLITFACIHEEQ	GEASTCFIAGTCIVQ	TEEAQCTDSC	LFSDFTKCCPRLIEVSNIFFRFDLRLQ	137
Homo sapiens	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Hyamca hyaena	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					258
Rattus norvegicus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Canis lupus familiaris	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Mus musculus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Sapajus apella	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Ursus arctos horribilis	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Felis catus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Heterocephalus glaber	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Mesocricetus auratus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Gorilla gorilla gorilla	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Callithrix jacchus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Oryctolagus cuniculus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Rousettus aegyptiacus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Macaca mulatta	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Mustela putorius furo	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Loxodonta africana	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Cavia porcellus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Scyliorhinus canicula	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					258
Poecilia reticulata	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					256
Danio rerio	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					249
Trachurus trachurus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					258
Dissostichus mawsoni	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Acipenser ruthenus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Polyodon spathula	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					257
Petromyzon marinus	MFCGFRLLVVEIINERGSNGFGVITETSSDALARERKINGIIVGGRIVEVNNATAFVTHRNTANFVYNGHRLNIVGAVYGFEEVAVTGFVYTTGTAIVYRGALHGRGRVYNTFRAPAFEEFFIITYGAVYQD					277
Homo sapiens	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			312
Hyamca hyaena	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			313
Rattus norvegicus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			314
Canis lupus familiaris	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Mus musculus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		327
Sapajus apella	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Ursus arctos horribilis	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Felis catus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Heterocephalus glaber	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		331
Mesocricetus auratus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		327
Gorilla gorilla gorilla	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Callithrix jacchus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			312
Oryctolagus cuniculus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			311
Rousettus aegyptiacus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			315
Macaca mulatta	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		312
Mustela putorius furo	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Loxodonta africana	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		327
Cavia porcellus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		329
Scyliorhinus canicula	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		319
Poecilia reticulata	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		326
Danio rerio	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTM			303
Trachurus trachurus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		325
Dissostichus mawsoni	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		327
Acipenser ruthenus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		328
Polyodon spathula	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		328
Petromyzon marinus	GFYGAIVGGVAAYPYACF	AAAAAYSESYGFV	AAADFYHHTIGPATYSIGTMASLRCGG	YSRTEFY		357

Figura 10: rappresentazione grafica del multiallineamento delle sequenze proteiche complete della RBOFX3, in giallo sono rappresentati gli aminoacidi identici mentre in rosso quelli simili.

6. Discussioni

Nel presente lavoro sono stati analizzati tramite analisi di immagine e frazionamento isotropico gli encefali di quattro specie di teleostei. Sono stati ottenuti dati quantitativi relativi alla massa, al volume e al numero di cellule per cinque regioni encefaliche ritenute di particolare interesse nella regolazione ecologico comportamentale dell'organismo (Edmunds, McCann & Laberge, 2016).

Inoltre, è stata condotta un'analisi bioinformatica delle sequenze relative alla proteina RBFOX3 nei pesci ossei, per cercare di comprendere il diverso funzionamento dell'anticorpo anti-NeuN, utilizzato nel protocollo del frazionamento isotropico, nelle specie.

Relazione massa corporea – lunghezza corporea

Analogamente a quanto riportato in letteratura (Artigue, Morales-Nin & Balguerías, 2003; Froese, Thorson & Reyes, 2014), i dati di massa [kg] e lunghezza [cm] delle specie analizzate possono essere anch'essi descritti da una regressione di potenza ($R^2 = 0.99861$, p-value <0.01). Data la presenza di dati esigui per ciascuna delle specie analizzate, non è stato possibile effettuare una regressione di potenza di ciascuna specie ma, visto l'andamento generale, si presume che in caso di dati più numerosi, ciascuna specie possa essere descritta da una regressione di potenza.

Relazione massa encefalica – massa corporea

I dati di massa encefalica (senza considerare i bulbi olfattivi e il tronco encefalico) e di massa corporea sono stati plottati per vedere come potesse essere descritta matematicamente la relazione tra queste due variabili. È stato necessario modificare con il logaritmo naturale la variabile risposta, cioè la massa encefalica, per ottenere una distribuzione normale. In questo modo è stato possibile appurare che i dati delle specie analizzate possono essere descritti dal seguente modello lineare ($R^2 = 0.7118$, p-value <0.01):

$$\ln(\text{massa encefalica}) = 0.29855 * \ln(\text{massa corporea}) + 1.77016$$

Come visibile nel grafico 2, e come indicato anche dal valore del coefficiente di determinazione, questo modello non spiega in toto la variabilità della massa encefalica. *P. antarctica* non sembra avere un andamento lineare e non rientra nemmeno nell'intervallo di confidenza del modello. Per quanto concerne *P. antarctica*, è comunque da tenere in considerazione che i valori di massa riportata sono stati ricavati a partire da valori di total length anch'essi ricavati partendo dai valori di lunghezza dell'encefalo (Eastman & Lannoo, 2011; Humboldt, 1984) e, quindi, i dati di massa corporea riportati potrebbero essere errati e per questo non essere descritti in maniera appropriata dal modello. A parte questa eccezione, è possibile considerare, comunque, la regressione lineare con doppio logaritmo un

buon modello per descrivere la relazione tra massa encefalica e massa corporea. La regressione con doppio logaritmo è convertibile in una regressione di potenza che assume i seguenti valori:

$$y = 5.871793x^{0.29855}$$

I valori di coefficiente angolare e di esponente risultano, però, molto diversi da quelli riportati da Van Dongen (1998) ma ciò è probabilmente dovuto al fatto che i valori forniti nel suo lavoro riguardano la massa totale dell'encefalo e che sono complessivi di 878 specie di Osteitti.

Analizzando quanto presente in letteratura, non tutti gli organismi sono stati descritti da una relazione massa encefalica – massa corporea lineare. *P. reticulata*, per esempio, vede la relazione descritta in maniera ottimale da un modello lineare misto (Marhounová et al., 2019). Sono stati utilizzati i dati riportati da Marhounová et al. (2019) per vedere se si potesse realizzare un normale modello lineare con doppio logaritmo naturale tra massa encefalica e massa corporea analogo a quello ottenuto in questo lavoro. I diversi esemplari analizzati sono stati suddivisi, come nel lavoro, in *big-* e *small-brained*. Per quanto concerne gli *small-brained*, il modello lineare non sembra descrivere al meglio l'andamento della variabile risposta ($R^2 = 0.4925$, p-value < 0.01) a differenza dei dati di massa encefalica e corporea degli organismi *big-brained* dove una regressione lineare con doppio logaritmo sembra descrivere bene la relazione tra le due variabili ($\ln(y) = 0.44557\ln(x) - 1.01171$, $R^2 = 0.8119$, p-value < 0.01). anche in questo caso è possibile ottenere una funzione di potenza che ha la seguente formula:

$$y = 0.3635967x^{0.44557}$$

Esaminando le relazioni di massa encefalica e massa corporea in altri organismi diversi dai pesci è possibile osservare come gli uccelli appartenenti agli ordini Psittaciformes, Passeriformes, Columbiformes, Galliformes, Strigiformes e Struthioniformes abbiano la stessa relazione generale di rapporto tra le due variabili descritta in questo lavoro (Olkowicz et al., 2016) e quindi di potenza. Nei mammiferi, anche, la relazione tra massa encefalica e massa corporea viene descritta da una regressione di potenza nei seguenti ordini: Artiodactyla (Kazu et al. 2014), Carnivora (Jardim-Messeder et al., 2017), Eulipotyphla (Sarko et al., 2009), Primates (Herculano-Houzel et al., 2007) e Rodentia (Herculano-Houzel, Mota & Lent, 2006).

Da questi dati è possibile evincere che la migliore regressione per descrivere la relazione tra massa encefalica e massa corporea nei vertebrati è quella di potenza, analogamente a quanto indicato da Van Dongen (1998), ciò nonostante ciascun ordine presenta, ovviamente, dati diversi rispetto a quelli sinottici di diverse specie riportate da Van Dongen (1998) medesimo.

La *P. reticulata* small-brained è una linea artificialmente selezionata in laboratorio e, insieme a *P. antarctica*, è l'unico esempio di discostamento dalla regressione di potenza dei vertebrati.

L'evoluzione dei Notothenioidi è caratterizzata da episodi di pedomorfosi, cioè di ritenzione nell'adulto di caratteri larvali (Balushkin, 2000). Ad esempio, è stato dimostrato per la stessa *P. antarctica* pedomorfismo per lo sviluppo cranio-facciale (Albertson et al., 2010) e pedomorfismo a livello dell'encefalo è stato visto per altri nototenioidi (Eastman & Lannoo, 2003). I nostri dati, per quanto provengano da pochi esemplari, indicano una possibile pedomorfosi per l'encefalo di *P. antarctica* che potrebbe essere la causa del discostamento dalla regressione di potenza, similmente al discostamento indotto da selezione artificiale in *P. reticulata*. Dobbiamo tuttavia considerare che anche *D. eleginoides*, che pure si allinea alla regressione degli altri vertebrati, è un nototenioide. Sarà quindi interessante in studi futuri approfondire questo aspetto.

Bulbi olfattivi

Per quanto concerne i bulbi olfattivi, questi sono stati analizzati solo in *D. eleginoides*, *P. antarctica* e *T. mediterraneus* in quanto assenti negli encefali di *A. rostrata* che ci sono stati forniti.

Analizzando i dati di cellule totali è possibile vedere come vi siano differenze significative (p -value <0.05) tra le tre specie, in particolar modo è possibile visualizzare come *D. eleginoides* presenti un numero di cellule maggiore di due ordini di grandezza rispetto a *P. antarctica* e *T. mediterraneus* (Fig. 11a). Non sono, invece, presenti differenze significative tra le specie in termini di densità cellulare (p -value >0.05) (Fig. 11b). Osservando le differenze in termini di massa relativa è possibile osservare come *D. eleginoides* abbia il valore percentuale maggiore, intermedio per *P. antarctica* e minimo per *T. mediterraneus* (Fig. 11c); se invece si guardano i valori di volume è possibile osservare come quelli di *P. antarctica* e *T. mediterraneus* siano molto simili e presentino notevoli differenze con *D. eleginoides* che ha il volume dei bulbi olfattivi maggiore (Fig. 11d). È importante sottolineare che l'utilizzo della massa relativa per spiegare le differenze tra diverse specie è stato messo in discussione da McGann (2017), anche se per i Mammiferi, a causa della differente allometria delle diverse porzioni dell'encefalo. Pertanto, verranno analizzate le differenze tra specie basandosi sulle altre variabili analizzate e disponibili. È possibile osservare come intercorrano le stesse differenze tra specie osservando sia il numero di cellule totali sia il volume. Osservando i valori di livello trofico assunto da ciascuna specie (*D. eleginoides*: 4.5 ± 0.8 ; *P. antarctica*: 3.2 ± 0.3 ; *T. mediterraneus*: 3.8 ± 0.3) è possibile osservare come a un livello trofico maggiore corrispondano maggiori valori di volume e un numero maggiore di cellule; ciò nonostante, i valori di entrambe le variabili non sembrano essere particolarmente dissimili in *P. antarctica* e *T. mediterraneus*, dove la seconda specie ha un valore di livello trofico maggiore rispetto alla prima. A determinare gli elevati numeri cellulari e l'elevato volume dei bulbi olfattivi di *D. eleginoides* potrebbero concorrere non solo il livello trofico ma anche l'habitat in cui *D. eleginoides* vive. Infatti, *D. eleginoides*, copre

un range batimetrico molto ampio, fra i 50m e i 3850 m (Miller, 1993). A profondità maggiori di 1000m si entra nella zona di assenza totale di luce. Sapendo che gli adulti vivono tendenzialmente in acque profonde, dove si comportano da predatori opportunisti e scavenger e dove si trovano i tipici predatori profondi del *D. eleginoides*, è possibile che l'aumento in volume e di conseguenza, di cellule totali, a livello dei bulbi olfattivi possa favorire la sopravvivenza degli adulti a maggiori profondità consentendo loro di poter detectare prede, predatori e partner facendo affidamento sull'olfatto.

Per quanto concerne relazioni intercorrenti tra diverse variabili nei bulbi olfattivi, non sono state osservate relazioni significative tra massa dei bulbi e cellule totali, tra densità cellulare e massa e tra massa dei bulbi e massa encefalica. La mancanza di significatività statistica potrebbe essere attribuibile al numero limitato di campioni analizzati. Si ipotizza che, con un numero maggiore di campioni, sia possibile individuare una qualche relazione tra le variabili sopra citate.

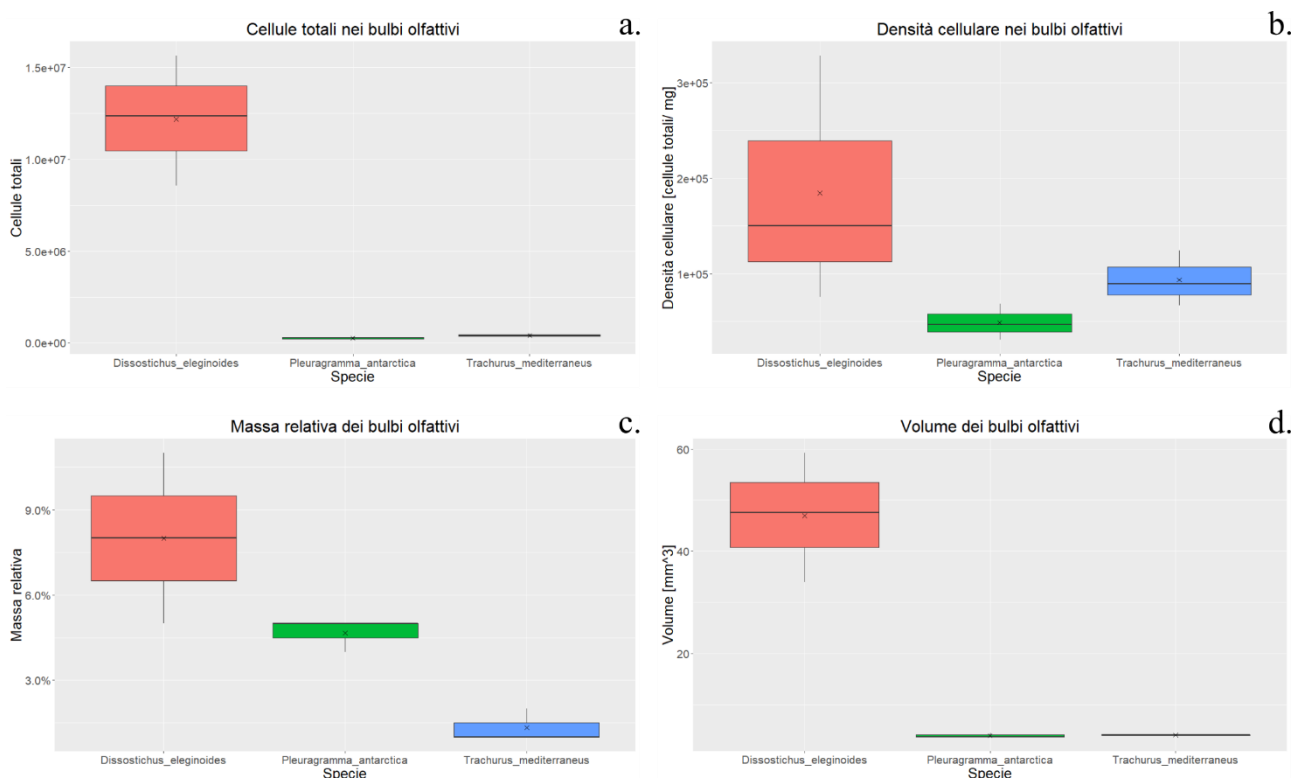


Figura 11: boxplot con i valori di media e mediana di cellule totali (a.), densità cellulare (b.), massa relativa (c.) e volume (d.) per i bulbi olfattivi.

Cervelletto

Anche per il cervelletto sono state condotte analisi statistiche per verificare la presenza di differenze significative tra le specie medesime. Analizzando il numero di cellule totali (Fig. 12a) mediante ANOVA, è stato possibile mettere in evidenza differenze significative tra le specie (p-value <0.01). Sono risultate differenze altamente significative tra *P. antartica* e *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*

e differenze significative tra *P. antarctica* e *A. rostrata*. Differenze abbastanza significative sono state riscontrate tra *A. rostrata*, *T. mediterraneus* e *D. eleginoides*. Non ci sono differenze significative tra *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*.

Osservando i dati di densità cellulare (Fig. 12b) e sottoponendoli anch'essi ad analisi mediante un'ANOVA, sono state riscontrate differenze significative (p-value <0.01) tra le specie, in particolare modo è stato possibile visualizzare come *A. rostrata*, *D. eleginoides* e *P. antarctica* non presentino differenze significative tra loro ma tutte e tre presentano differenze significative con *T. mediterraneus*.

I dati di massa relativa (Fig. 12c), analizzati mediante un'analisi ANOVA, mostrano differenze significative tra le specie (p-value <0.05), in particolare *T. mediterraneus* mostra differenze abbastanza significative solo con *A. rostrata* mentre *D. eleginoides* mostra differenze abbastanza significative sia con *A. rostrata* che con *P. antarctica*, queste ultime due specie non mostrano differenze significative tra di loro.

Osservando i dati di volume (Fig. 12d), è possibile evidenziare differenze tra le specie (p-value <0.05), *D. eleginoides* ha, infatti, il valore volumetrico maggiore contro *P. antarctica* che ha quello più basso fra le quattro specie analizzate. Leggere differenze intercorrono tra *A. rostrata* e *T. mediterraneus*.

Il cervelletto è una regione encefalica fondamentale nei processi di coordinazione e apprendimento motori e propriocezione (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Huber et al., 1997; Pollen et al., 2007). Analizzando dati riportati in letteratura è possibile osservare come vi siano differenze notevoli tra le specie analizzate in questo lavoro e le specie oggetto di analisi da parte di altri ricercatori. Concentrandosi sui dati di massa relativa, è possibile osservare che *A. rostrata* e *P. antarctica* hanno i dati percentuali maggiori e fra loro molto simili. Dati in letteratura riportano come il cervelletto sia di fondamentale importanza nelle specie pelagiche sia per la tridimensionalità dell'habitat sia per l'importanza dei movimenti nei processi di interazione predatore-vittima vista la mancanza di rifugi nell'ambiente pelagico (Edmunds, McCann & Laberge, 2016). Questi dati confermano quanto ottenuto per *P. antarctica* in termini di massa relativa, essendo l'unica specie completamente pelagica, ma sono in contrasto con quanto trovato per gli altri organismi, in quanto *A. rostrata* che è un organismo bentonico/bentopelagico di profondità, *D. eleginoides* è bentopelagico e *T. mediterraneus* è emipelagico. È possibile che, come per i dati di massa relativa dei bulbi olfattivi, anche la massa relativa per il cervelletto possa non essere un buon descrittore delle capacità di movimento degli organismi in funzione della loro dieta e del loro habitat. Focalizzandosi sui dati di volume è possibile osservare come *D. eleginoides*, predatore opportunista e scavenger con

un ampio range batimetrico e con il maggior livello trofico tra le nostre specie, presenti il volume maggiore. Seguono poi i valori volumetrici di *T. mediterraneus*, *A. rostrata* e *P. antarctica*. Facendo riferimento ai valori di livello trofico (*A. rostrata*: 3.6 ± 0.47 , *D. eleginoides*: 4.5 ± 0.8 ; *P. antarctica*: 3.2 ± 0.3 ; *T. mediterraneus*: 3.8 ± 0.3) è possibile osservare che a un livello trofico inferiore corrisponde un volume del cervello minore. Inoltre, facendo riferimento anche ai range batimetrici ricoperti dalle specie, l'elevato valore di volume di *D. eleginoides* potrebbe essere spiegato anche dall'ampio range di batimetrie in cui lo si può ritrovare, molto più ampio rispetto a quelle delle altre specie. Differentemente da quanto osservato nei bulbi olfattivi, il numero di cellule non sembra ricalcare le differenze che si riscontrano in termini di volumi.

Data la presenza dei dati proveniente da tutte e quattro le specie, in questo caso è stato possibile trovare la presenza di una relazione positiva tra massa del cervello e cellule totali ($r_s = 0.57$, p-value ~ 0.05). È stata dunque realizzata una regressione lineare con doppio logaritmo naturale: come visualizzabile dal grafico con la retta di regressione sovrainposta, è possibile visualizzare come *T. mediterraneus* sembri deviare dall'andamento che sembra invece accomunare le altre specie. Questo ha portato, infatti, a ottenere un valore di coefficiente di determinazione non troppo elevato ($R^2 = 0.4785$, p-value < 0.05). L'elevato numero di cellule in *T. mediterraneus* ha riscontri importanti sui valori di densità cellulare dove viene a essere l'unica specie ad avere un numero di cellule per milligrammo di tessuto nell'ordine di 10^6 (le altre specie sono nell'ordine di 10^5). Sembra che i fattori latitudine e profondità, che vanno a determinare differenze nei valori di temperatura nelle masse d'acqua, vadano a influenzare il numero di cellule totali, e quindi i valori di densità, nel cervello dei pesci; ovviamente per confermare questa ipotesi sarà necessario raccogliere informazioni su più specie. I pesci antartici hanno, infatti, bassi rate metabolici (Sandersfeld, Mark & Knust; 2017) e *P. antarctica* è riportata come specie a basso consumo energetico anche tra i notothenioidi (Martinez & Torres, 2017). È altresì noto che anche i pesci di acque profonde hanno bassi rate metabolici (Seibel & Drazen; 2007); nonostante ciò, è stato dimostrato che *A. rostrata* si muove con la stessa velocità di pesci di acque superficiali date le stesse temperature. Questo potrebbe spiegare l'assenza di differenze significative con *D. eleginoides* ma non con *P. antarctica* visto quanto scritto sopra. Forse, nonostante *P. antarctica* sia una specie a basso consumo energetico, potrebbe presentare densità cellulari simili a quelle di *A. rostrata* e *D. eleginoides* tenendo in considerazione che *P. antarctica* è l'unica specie esclusivamente pelagica e quindi potrebbero essere presenti più network per favorire una maggiore coordinazione dei movimenti per far fronte a un ambiente in cui non sono presenti rifugi. Considerando la temperatura media preferita delle specie in esame, possiamo vedere che *A. rostrata* vive a temperature di 2.9°C (range: $1.9 - 4.6^\circ\text{C}$, Kaschner et al., 2016), *D. eleginoides* a 4.5°C (range: $1.8 - 8.8^\circ\text{C}$, Kaschner et al., 2016), *P. antarctica* a -1°C

(range: $-1.8 - 0.9^{\circ}\text{C}$, Kaschner et al., 2016) e *T. mediterraneus* a 17.4°C (range: $13.2 - 21^{\circ}\text{C}$, Kaschner et al., 2016). È evidente che *T. mediterraneus* viva mediamente in acque particolarmente calde che potrebbero influenzare positivamente i rate metabolici e quindi portare ad avere densità cellulari più elevate rispetto alle altre specie; analogamente a quanto detto per *P. antarctica*, *T. mediterraneus* è emipelagico quindi anche questo fattore ecologico potrebbe avere un'influenza positiva sulla densità cellulare. Inoltre, è noto che, nell'uomo, l'encefalo richiede molta più energia rispetto agli altri organi (Lehmann & Martins; 2013) ma si suppone che questo sia valido anche per altri organismi, pesci inclusi. Il cervelletto, nelle quattro specie indagate, presenta la densità cellulare più elevata rispetto alle altre regioni encefaliche e proprio la densità cellulare, nelle regioni maggiormente dispendiose dell'encefalo, sembra essere vincolata al metabolismo della specie (Ridgway et al 2019), questo spiegherebbe dunque le differenze osservate tra le specie in termini di densità.

Fatta eccezione per l'andamento particolare di *T. mediterraneus*, le altre tre specie, che vivono in range di temperature non eccessivamente diversi, mostrano differenze non significative tra le densità cellulari del cervelletto. Questo dato non è in contrasto con l'osservazione di una possibile correlazione densità/temperatura media, in quanto il numero di specie ed esemplari è esiguo e previene la possibilità di mettere in evidenza differenze minime di densità cellulari. Infatti, l'aumento di cellule totali e l'aumento di massa del cervelletto nelle tre specie non temperate sembrano seguire statisticamente un andamento lineare.

Negli articoli che riportano i risultati dei dati del frazionamento isotropico, di norma, vengono effettuate regressioni tra massa della regione encefalica presa in considerazione e numero di neuroni e, separatamente, di cellule non neuronali. In questo lavoro il numero di neuroni e il numero di cellule gliali non sono stati soggetti a particolari analisi viste le problematiche riscontrate con l'anticorpo anti-NeuN e con la conservazione dei campioni in PEG che hanno portato a ottenere risultati alterati per quanto concerne la percentuale di neuroni e tutti i dati che vi si possono derivare. Considerando, comunque, che le cellule totali sono la somma di neuroni e cellule gliali, è possibile comunque effettuare dei confronti con i dati presenti in letteratura tenendo conto del fatto che, se aumentano sia neuroni che cellule gliali in maniera lineare con la massa, allora anche il numero di cellule totali seguirà questo andamento. Teniamo conto del fatto che da una regressione con doppio logaritmo naturale è possibile derivare una funzione di potenza che, però, non riportiamo in questo caso visto che è prima da appurare quale sia il miglior modello lineare per i teleostei tenendo in considerazione il possibile contributo della temperatura. Per gli ordini Artiodactyla (Kazu et al. 2014), Carnivora (Jardim-Messeder et al., 2017), Primates (Herculano-Houzel et al., 2007), Rodentia (Herculano-Houzel, Mota & Lent, 2006) e per la specie *Crocodylus niloticus* (Ngwenya et al., 2016) la relazione

è descritta da una funzione di potenza a differenza degli Eulipotyphla (Sarko et al., 2009) dove la relazione è di tipo lineare.

Nelle specie analizzate in questo lavoro non esiste nessuna relazione tra la densità cellulare nel cervelletto e la sua massa (r_s : -0.18, p-value >0.05).

Per il cervelletto esiste forte correlazione positiva tra la sua massa e quella dell'encefalo (r_s = 0.83, p-value = 0.01) descrivibile da una regressione lineare con doppio logaritmo (R^2 = 0.94, p-value <0.01).

Lo stesso dicasi per la relazione massa e volume del cervelletto (r_s = 0.83, p-value <0.01; R^2 = 0.87, p-value <0.01).

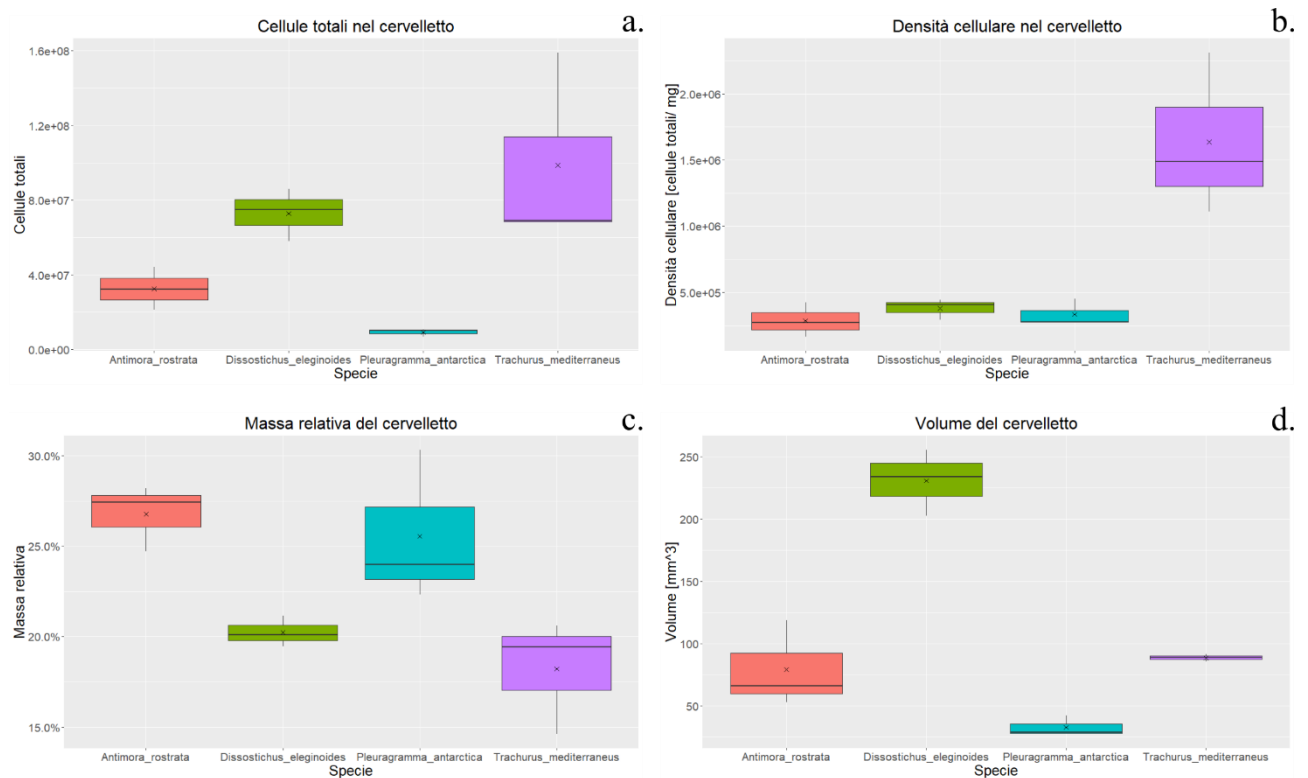


Figura 12: boxplot con i valori di media e mediana di cellule totali (a.), densità cellulare (b.), massa relativa (c.) e volume (d.) per il cervelletto.

Ipotalamo

Il test ANOVA sul numero di cellule totali ha messo in evidenza differenze significative (p-value <0.01) tra le specie: *P. antarctica* presenta differenze altamente significative con tutte le specie, *A. rostrata* e *T. mediterraneus* presentano entrambi differenze significative con *D. eleginoides* mentre tra *A. rostrata* e *T. mediterraneus* non esistono differenze significative (Fig. 13a).

Prendendo in considerazione i dati di densità cellulare (Fig. 13b), il test ANOVA non ha evidenziato la presenza di differenze significative (p-value >0.05).

Per quanto concerne i dati di massa relativa dell'ipotalamo (Fig. 13c), sono state riscontrate, sempre mediante l'utilizzo dell'ANOVA, differenze significative tra le specie (p-value <0.01): *P. antarctica*

mostra differenze significative con tutte e tre le altre specie, sia *T. mediterraneus* sia *D. eleginoides* presentano differenze significative con *A. rostrata* ma non fra loro.

Analizzando i valori dei volumi (Fig. 13d) mediante Kruskal-Wallis è possibile visualizzare che *D. eleginoides* ha il volume maggiore, *P. antarctica* quello minore e quelli di *A. rostrata* e *T. mediterraneus* risultano essere abbastanza simili tra di loro. È possibile notare come le cellule totali ricalchino l'andamento e le differenze riscontrate in termini volumetrici, analogamente a quanto riscontrato per i bulbi olfattivi.

L'ipotalamo è noto avere importanti funzioni nella regolazione neuroendocrina, nella regolazione dei comportamenti, nei processi di accoppiamento e nel regolare l'organizzazione sociale (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Pollen et al., 2007). In questo caso non è possibile affermare con certezza se vi siano relazioni con questo tipo di comportamenti, dal momento che non sono stati forniti dati in merito, è solo possibile fare deduzioni in base a quanto riportato in letteratura. Interessante è quanto viene riportato da Gonzalez-Voyer & Kolm (2010) in termini volumetrici: una forte selezione sessuale è correlata a una diminuzione dei volumi nelle regioni encefaliche, non solo nell'ipotalamo. Osservando ora i dati relativi ai volumi dell'ipotalamo e del cervelletto, si potrebbe dedurre che in *P. antarctica* sia molto maggiore rispetto alle altre specie. Seguendo questo ragionamento *D. eleginoides* avrebbe la minore selezione sessuale fra tutte e quattro le specie mentre quelle di *A. rostrata* e *T. mediterraneus* risultano simili. Non è possibile sapere con certezza se questa regola, applicata inizialmente ai cicliidi, sia estendibile anche ad altre specie e altre famiglie, interessante prospettiva futura potrebbe essere quella di cercare di testare la selezione del partner nelle specie di questo lavoro per verificare se questa ipotesi possa considerarsi veritiera o se, invece, possa valere solo per i cicliidi.

Focalizzandosi ora sui risultati di relazione tra massa ipotalamica e cellule totali, densità cellulare e massa ipotalamica e massa ipotalamica ed encefalica, si precisa che non è possibile fare confronti con dati presenti in letteratura dal momento che nei Vertebrati superiori si tende ad analizzare il diencefalo oppure il diencefalo medesimo non viene nemmeno analizzato a parte ma viene fatto confluire nel cosiddetto *rest of the brain*. Per quanto concerne *P. reticulata* non è possibile effettuare alcun tipo di paragone dal momento che l'ipotalamo non è stato analizzato (Marhounová et al., 2019). È stata riscontrata una forte correlazione positiva tra massa ipotalamica e cellule totali ($r_s = 0.85$, p-value < 0.05) ed esiste una relazione tra due variabili descrivibile da una regressione lineare con doppio logaritmo naturale ($R^2 = 0.90$, p-value < 0.01), in questo caso non risultano specie che sembrano assumere un altro andamento. Analogamente, esiste una forte correlazione positiva tra massa ipotalamica ed encefalica ($r_s = 0.79$, p-value < 0.01) la cui relazione può essere anch'essa descritta da una retta di regressione con doppio logaritmo naturale ($R^2 = 0.93$, p-value < 0.01); in maniera analoga

è stata trovata una forte correlazione positiva e una relazione descritta da un'equazione lineare con doppio logaritmo naturale per massa ipotalamica e volume ipotalamico ($r_s = 0.78$, $p\text{-value} < 0.01$; $R^2 = 0.91$, $p\text{-value} < 0.01$). Così come riscontrato nel cervelletto, anche per l'ipotalamo non esiste nessuna correlazione tra densità cellulare e massa ipotalamica.

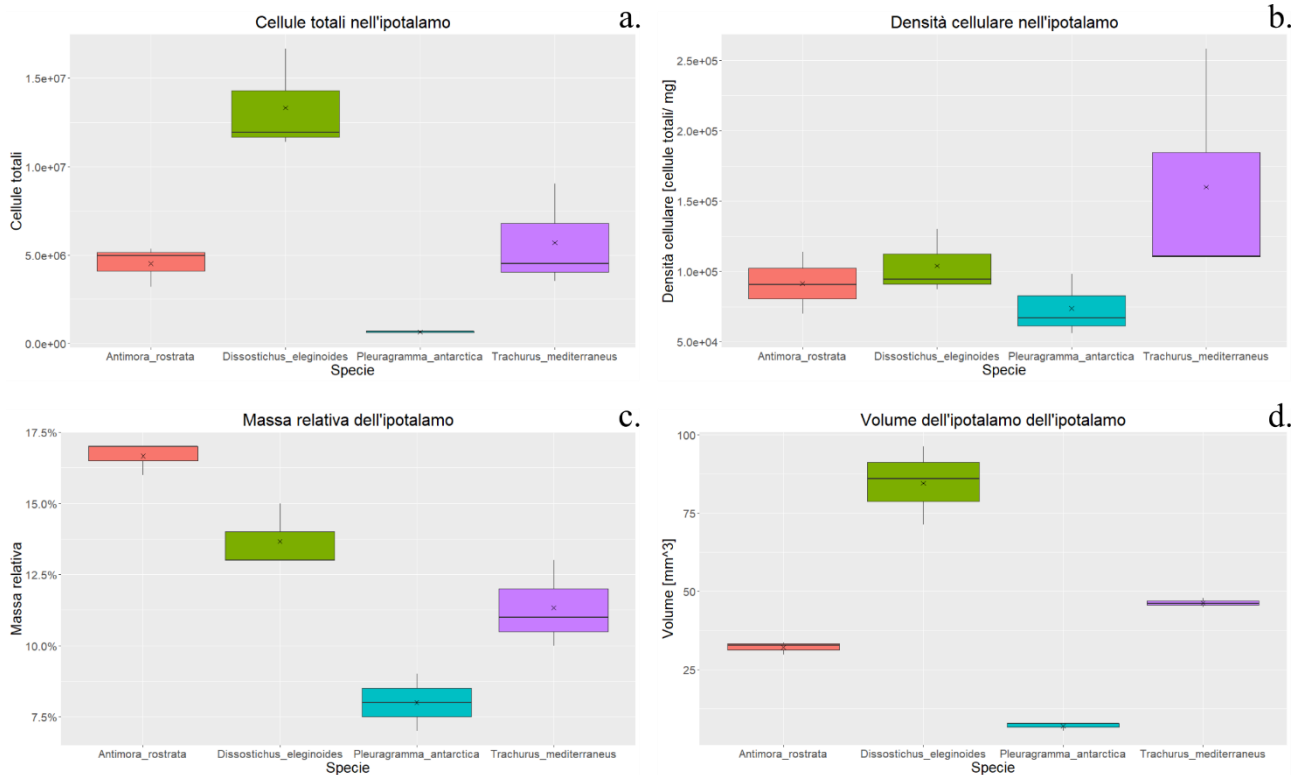


Figura 13: boxplot con i valori di media e mediana di cellule totali (a.), densità cellulare (b.), massa relativa (c.) e volume (d.) per l'ipotalamo.

Mesencefalo

L'analisi ANOVA condotta sul numero di cellule totali ha messo in evidenza differenze tra le specie analizzate ($p\text{-value} < 0.01$): *A. rostrata* presenta differenze significative con tutte le altre specie, *P. antarctica* e *D. eleginoides* presentano differenze significative tra loro ed entrambe le specie con *T. mediterraneus* (Fig. 14a).

Il test di Kruskal-Wallis condotto sui valori di densità ha messo in evidenza differenze significative tra le specie ($p\text{-value} < 0.05$). I valori di densità di *A. rostrata*, *D. eleginoides* e *P. antarctica* sono simili tra loro e inferiori a *T. mediterraneus* che presenta il valore di mediana maggiore (Fig. 14b).

Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato anche per i valori di massa relativa ($p\text{-value} < 0.05$) e per i volumi ($p\text{-value} < 0.05$). In termini di massa relativa è possibile osservare come *A. rostrata* presenti valori nettamente inferiori rispetto alle altre tre specie analizzate (Fig. 14c); in termini di volume a presentare i valori maggiori è *D. eleginoides* seguito da *T. mediterraneus* che a sua volta è seguito da *A. rostrata* e *P. antarctica* che hanno valori molto simili (Fig. 14d).

Il mesencefalo permette lo svolgimento di funzioni legate alla vista guidando i movimenti nello spazio e favorendo i processi di nutrizione, ricerca della preda e fuga dai predatori (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Huber et al., 1997; Pollen et al., 2007).

Edmunds, McCann & Laberge (2016) hanno trovato una diminuzione della massa relativa del mesencefalo con l'aumento del livello trofico; in questo lavoro, invece, questo andamento non è stato assolutamente rispettato dai valori di massa relativa. È possibile invece notare che organismi con un livello trofico maggiore presentano un volume maggiore sebbene il livello trofico non sembri l'unica variabile a determinare valori volumetrici maggiori in *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*. Pesci piscivori hanno bulbi olfattivi e mesencefalo di maggiori dimensioni (Huber et al., 1997) e questo sembra essere vero per *D. eleginoides* ma non per *A. rostrata* e *T. mediterraneus* che annoverano nella loro dieta, oltre a diversi invertebrati, anche i pesci. Forse, essendo *A. rostrata* un pesce profondo, ha bulbi olfattivi di dimensioni notevoli e va quindi a compensare il basso valore di volume e massa relativa del mesencefalo con un importante sviluppo dei bulbi olfattivi. *T. mediterraneus* si nutre anch'esso di pesci ma, come visto precedentemente, non ha bulbi olfattivi particolarmente sviluppati e non ha volumi mesencefalici di grandi dimensioni come quelli di *D. eleginoides*. In questo caso è importante tenere in considerazione che i valori di volume aumentano in maniera lineare (modello di regressione lineare con doppio logaritmo) con l'aumento della massa ($r_s = 0.85$, p-value < 0.01 ; $R^2 = 0.97$, p-value < 0.01) quindi, essendo il valore di massa mesencefalica di *T. mediterraneus* inferiore rispetto a quello di *D. eleginoides*, di conseguenza i valori volumetrici risulteranno inferiori. Inoltre, il valore in volume di *T. mediterraneus* potrebbe non essere particolarmente elevato tenendo conto del fatto che le prede predilette sono rappresentate dai molluschi non bivalvi. È comunque da evidenziare che in termini di massa relativa il mesencefalo rappresenta circa il 60% dell'encefalo; quindi, i valori di volume non troppo elevati vengono a essere compensati da un'importante massa relativa. *P. antarctica* è una specie pelagica e zooplanktivora, i valori di volume non sono particolarmente elevati ma osservando i dati di massa relativa è possibile constatare che il mesencefalo rappresenta quasi la metà della massa encefalica, questo può essere dovuto al fatto che le prede zooplanktoniche si camuffano bene in colonna d'acqua e quindi sono difficili da visualizzare (Edmunds, McCann & Laberge, 2016). Anche in *D. eleginoides* la massa relativa del mesencefalo è quasi prossima al 50%. I dati di massa relativa sembrano descrivere in maniera accurata l'importanza della regione mesencefalica nelle specie analizzate non solo in relazione alla posizione trofica ma anche al range batimetrico. In *A. rostrata* oltre a essere bassi i valori di volume, sono particolarmente ristretti anche quelli di massa relativa del mesencefalo (circa 24%), dovuto quasi certamente al fatto che si tratta di una specie profonda.

Per quanto concerne le relazioni quantitative tra variabili, analogamente a quanto avviene nel cervelletto, anche in questo caso è stata trovata una correlazione positiva tra massa del mesencefalo e cellule totali ($r_s = 0.64$, $p\text{-value} < 0.05$) la cui relazione è stata descritta da un modello lineare con doppio logaritmo naturale ($R^2 = 0.58$, $p\text{-value} < 0.01$). Il basso valore del coefficiente di determinazione è dovuto, nuovamente, alla presenza di *T. mediterraneus* che presenta il maggior numero di cellule totali e la maggiore densità cellulare nel mesencefalo. Forse, analogamente a quanto ipotizzato per il cervelletto, anche in questo caso il fattore temperatura/metabolismo potrebbe spiegare questa anomalia, tenendo conto del fatto che *T. mediterraneus* presenta i valori maggiori di densità nel mesencefalo in confronto alle altre tre specie che presentano valori inferiori e simili tra loro.

Anche in questo caso non è presente alcun tipo di correlazione tra densità cellulare e massa del mesencefalo. Esiste, invece, una forte correlazione tra la massa del mesencefalo e la massa encefalica ($r_s = 0.92$, $p\text{-value} = 0.00$) descritta da una retta di regressione lineare con doppio logaritmo naturale ($R^2 = 0.81$, $p\text{-value} < 0.01$).

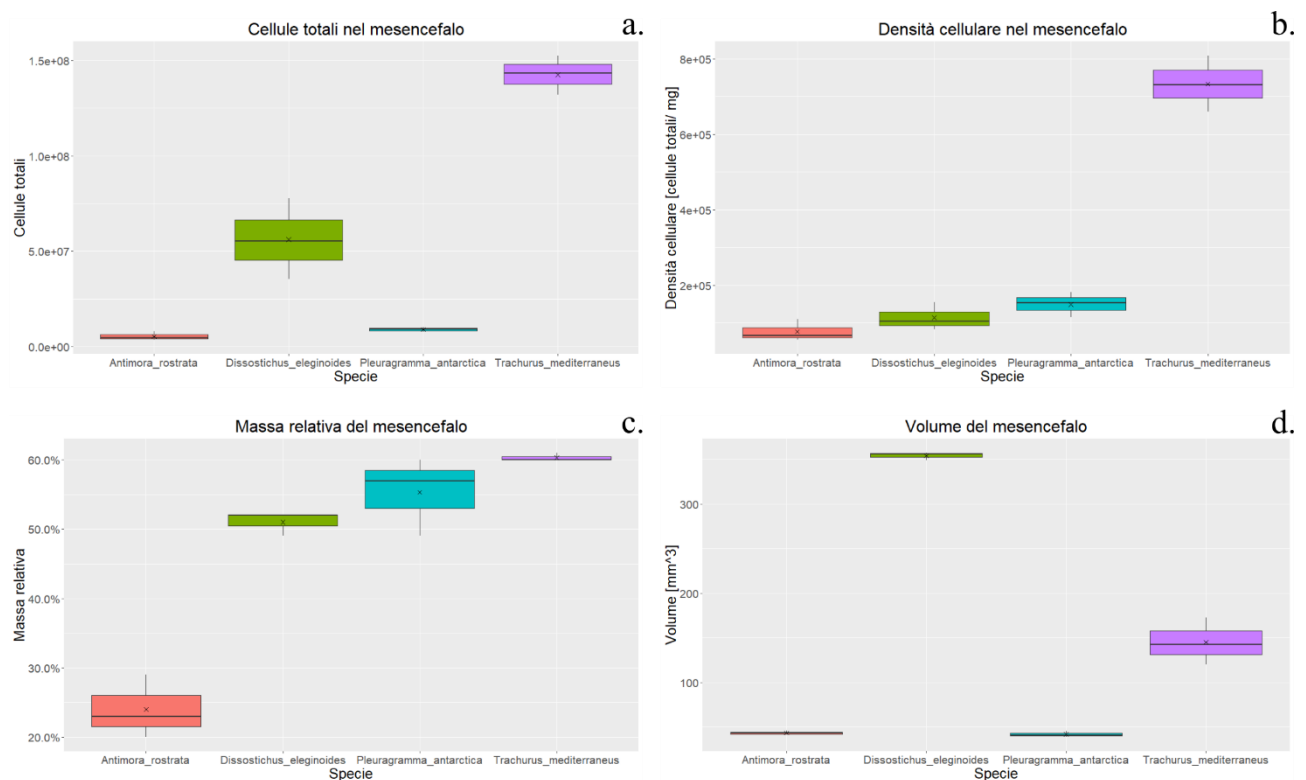


Figura 14: boxplot con i valori di media e mediana di cellule totali (a.), densità cellulare (b.), massa relativa (c.) e volume (d.) per il mesencefalo.

Telencefalo

Sono risultate differenze significative in termini di cellule totali evidenziate dal test ANOVA ($p\text{-value} < 0.01$): *P. antarctica* presenta differenze significative con tutte le altre tre specie, *T. mediterraneus*

presenta, poi, differenze significative con *D. eleginoides* ma non con *A. rostrata*; infine non sono presenti differenze significative tra *A. rostrata* e *D. eleginoides* (Fig. 15a). In termini di densità cellulare, sempre mediante un test ANOVA, sono state evidenziate differenze significative (p-value <0.05) tra *A. rostrata*, *P. antarctica*, *D. eleginoides* e *T. mediterraneus* mentre non sono presenti differenze tra le altre specie (Fig. 15b). I valori di massa relativa (Fig. 15c) sono stati analizzati mediante il test di Kruskal-Wallis che ha messo in evidenza differenze tra le specie: *A. rostrata* ha un telencefalo che rappresenta più del 30% del suo encefalo, nelle altre tre specie i dati sono invece inferiori al 15% (p-value <0.05). Il volume (Fig. 15d) è stato analizzato mediante ANOVA che ha rilevato la presenza di differenze significative (p-value <0.01): *T. mediterraneus* presenta differenze significative con tutte e tre le altre specie, differenze significative sono riscontrabili anche tra *A. rostrata* e *D. eleginoides* e abbastanza significative tra *A. rostrata* e *P. antarctica*.

Le funzioni del telencefalo sono svariate e complesse: apprendimento, integrazioni di input sensoriali, nutrizione e utilizzo dell'habitat (Edmunds, McCann & Laberge, 2016; Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Huber et al., 1997; Park & Bell, 2010; Pollen et al., 2007). Da un punto di vista morfologico-quantitativo, è stato osservato che nei ciclidi del Lago Tanganyika le dimensioni del telencefalo sono maggiori nelle specie monogame rispetto a quelle poligame (Gonzalez-Voyer & Kolm, 2010; Pollen et al., 2007). In questo caso non sono disponibili dati o informazioni circa la poligamia o monogamia delle specie ma se quanto trovato nei ciclidi può essere estendibile anche ad altre famiglie, allora in questo caso si potrebbe affermare che *T. mediterraneus* è una specie poligama a differenza di *D. eleginoides* e *P. antarctica* che potrebbero essere monogame visti i loro elevati valori di volume. *A. rostrata* presenta valori maggiori di *T. mediterraneus* ma visti i suoi valori intermedi di volume risulta difficile da classificare in una delle due categorie. È interessante, invece, osservare come la massa percentuale sembri poter fungere da proxy del range batimetrico utilizzato dalle specie: una specie profonda come *A. rostrata* ha un telencefalo che rappresenta circa il 30% della massa, valori molto inferiori, attorno al 10% circa, sono invece tipici di specie superficiali quali *P. antarctica* e *T. mediterraneus*. Valori intorno al 15% sono invece tipici di *D. eleginoides* che lo si può ritrovare in acque sia superficiali sia profonde.

È interessante notare come, anche nel caso del telencefalo, i valori di densità cellulare siano più elevati per *T. mediterraneus* rispetto alle altre specie tipiche di alte latitudini (*D. eleginoides* e *P. antarctica*) e di elevate profondità (*A. rostrata*) dove le temperature sono ben inferiori rispetto a quelle a cui vive *T. mediterraneus*.

Focalizzandosi ora sulle relazioni intercorrenti tra le variabili, esiste una correlazione positiva tra massa telencefalica e cellule totali ($r_s = 0.97$, p-value 0.00) e la relazione dalle due variabili può essere

descritta da una regressione lineare con doppio logaritmo naturale ($R^2= 0.89$, p-value <0.01). La regressione lineare con doppio logaritmo è convertibile in una regressione di potenza:

$$y = 1.12 \times 10^{-5} x^{1.0028}$$

Vediamo dall'equazione che fondamentalmente è una retta a descrivere l'andamento di questi dati. Anche nel caso di *C. niloticus* il numero di neuroni e cellule gliali è descritto da equazioni di potenza con esponenti prossimi al valore di 1 quindi molto simili a quanto ottenuto per queste quattro specie di pesci (Ngwenya et al., 2016).

Anche per il telencefalo non esiste alcuna correlazione tra la sua massa e la densità cellulare e, a differenza delle altre regioni encefaliche sottoposte a questa analisi, nemmeno tra massa e volume del telencefalo. Questo andamento diverso, relativo a massa e volume, difficilmente indica una diversa densità (g/cm^3) del tessuto nervoso nelle diverse specie, ma potrebbe essere spiegata dalla presenza di ventricoli con diverso volume relativo e, in minima parte dalla diversa irrorazione sanguigna. Esiste, infine, una forte correlazione tra massa telencefalica e massa encefalica ($r_s = 0.79$, p-value <0.01) descrivibile da una regressione lineare con doppio logaritmo ($R^2= 0.75$, p-value <0.01).

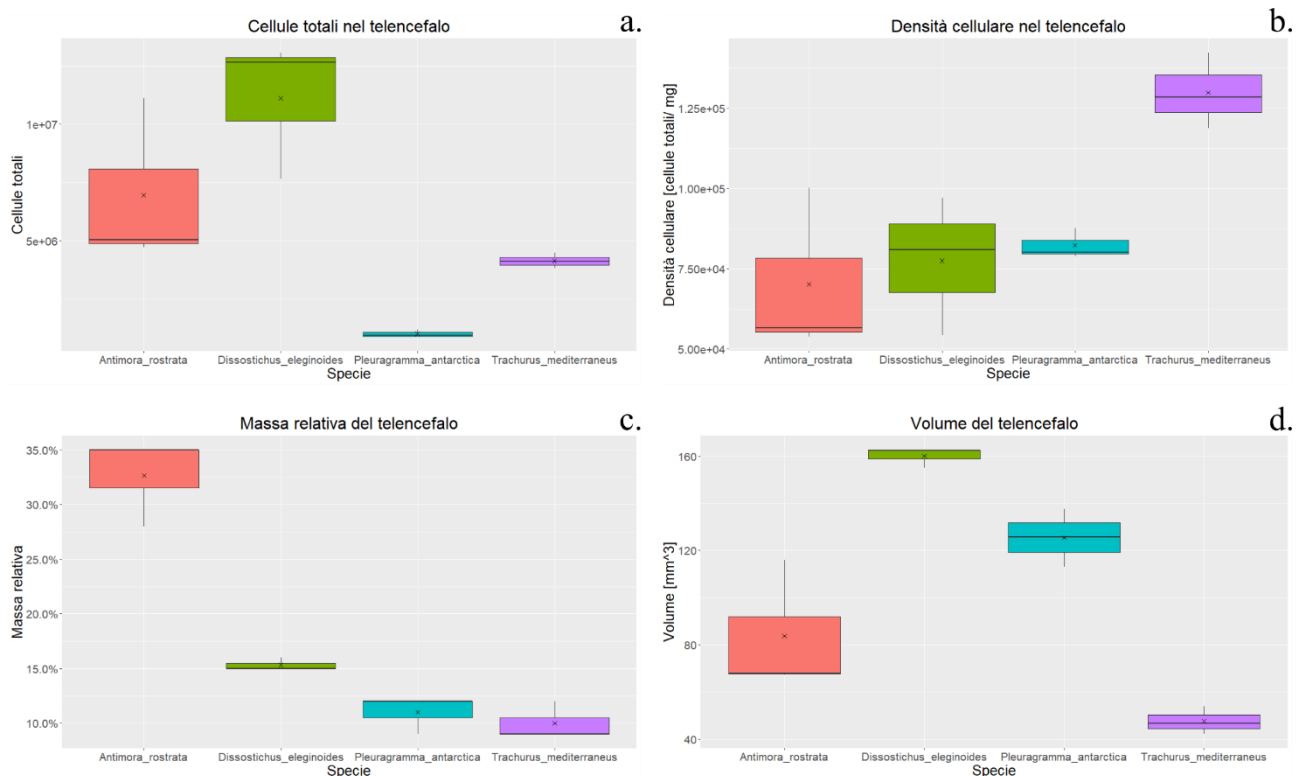


Figura 15: boxplot con i valori di media e mediana di cellule totali (a.), densità cellulare (b.), massa relativa (c.) e volume (d.) per il telencefalo.

PCA

L'analisi multivariata è stata condotta su tutte le variabili che non hanno mostrato correlazione con la massa della regione encefalica presa in considerazione per ovviare a visualizzare differenze ascrivibili alle dimensioni dell'encefalo e dell'organismo. Le variabili utilizzate come assi PC sono i valori di densità di tutte le regioni encefaliche (bulbi olfattivi esclusi) e il volume del telencefalo. Come è possibile visualizzare dal grafico della PCA le maggiori differenze tra le specie sono ascrivibili alla densità cellulare nel mesencefalo e nel cervelletto che, come evidenziato nelle discussioni precedenti, portano *T. mediterraneus* ad avere un andamento completamente diverso dalle altre specie nelle regressioni bivariate tra massa e cellule totali di cervelletto e mesencefalo. Questa analisi permette inoltre di differenziare e clusterizzare le specie in base alle temperature a cui vivono: temperature tipiche del bacino Mediterraneo per *T. mediterraneus* e più fredde e tipiche delle regioni antartiche, sub-antartiche per *D. eleginoides* e *P. antarctica* e particolarmente fredde per *A. rostrata* che è un organismo di profondità.

RBFOX3

Il mancato funzionamento dei due anticorpi anti-NeuN ha portato a effettuare delle ricerche sulle sequenze del NeuN o RBFOX3. Dei due anticorpi utilizzati in questo lavoro, è nota solo per uno (anti-NeuN dell'Abcam) la regione dell'epitopo marcato: tra il primo e il centesimo amminoacido della RBFOX3 umana. Pertanto, si è pensato che nelle due specie negative all'anticorpo, *D. eleginoides* e *T. mediterraneus*, vi fossero differenze notevoli in termini di composizione amminoacidica in questa regione. Come evidenziato dall'allineamento delle sequenze utilizzate, si nota, però, che negli amminoacidi combacianti con i primi 100 della proteina umana, le differenze amminoacidiche non sono significative, tenendo in considerazione che in organismi quali *S. canicula* e *P. reticulata*, in cui sono presenti alcuni amminoacidi non conservati tra i primi 15, l'anticorpo anti-NeuN ha dato risultati positivi. È possibile che l'anticorpo sia risultato negativo nelle due specie a causa di una bassa trascrizione del gene in questione e, di conseguenza, a bassi livelli traduzionali che potrebbero determinare una mancata visualizzazione dell'anticorpo in quanto non rilevabile a bassi livelli. Per verificare l'attendibilità di questa ipotesi sarebbe interessante in futuro eseguire una PCR quantitativa al fine di verificare i livelli di espressione. Ovviamente sarebbe necessario effettuare delle qPCR anche su organismi in cui l'anticorpo ha dato risultati positivi per verificare se, effettivamente, vi siano differenze in termini trascrizionali del gene codificante per la RBFOX3.

7. Conclusioni

In tutte queste analisi si è cercato di correlare le differenze e le analogie tra i vari parametri ottenuti con caratteristiche ecologiche della specie come le abitudini alimentari e il range batimetrico. Ovviamente è possibile che alcuni tratti risentano anche della filogenesi. Non è stato intrapreso questo tipo di analisi, tuttavia è possibile sottolineare che due delle specie, *D. eleginoides* e *P. antarctica*, appartengono alla stessa famiglia e pertanto condividono un antenato comune molto più recente rispetto alle altre due specie. Pertanto, non è possibile escludere che alcune analogie (densità cellulare nel cervelletto, massa relativa del cervelletto, densità cellulare nell'ipotalamo, densità cellulare del mesencefalo, massa relativa del mesencefalo, densità cellulare del telencefalo e massa relativa del telencefalo) che accomunano le due specie stiano mostrando un segnale filogenetico oltre che ecologico. Inoltre, considerando gli ordini, solo *A. rostrata* appartiene ad un ordine diverso rispetto alle altre tre specie e anche questo potrebbe influenzare alcuni parametri osservati.

Analizzando la relazione massa encefalica in funzione della massa corporea è stato trovato che *P. antarctica* si discosta dall'andamento generale presentato dalle altre tre specie. Questo discostamento potrebbe essere dovuto a fenomeni di pedomorfismo e potrebbe trovare conferma prendendo in considerazione quanto avviene per organismi *small-brained*, selezionati artificialmente, della specie *P. reticulata* dove un modello lineare con doppio logaritmo non descrive correttamente l'andamento dei dati.

Da questo lavoro è emerso che il frazionamento isotropico funziona, in parte, sulle specie analizzate. Il mancato funzionamento dell'anticorpo anti-NeuN, diretto contro la proteina RBFOX3, potrebbe essere dovuto a una bassa trascrizione, e quindi traduzione, della proteina medesima. Saranno necessari studi in ambito di biologia molecolare per capire se effettivamente vi siano differenze in termini trascrizionali tra le specie in cui l'anticorpo non ha funzionato e quelle in cui ha funzionato.

Concentrandosi ora sui dati maggiormente analizzati (cellule totali, densità cellulare, massa relativa e volume) è emerso che alcune di queste variabili possono fungere da proxy per capire, per esempio, il livello trofico o il range batimetrico in cui le specie si trovano. La specie *D. eleginoides* ha un volume e un numero di cellule totali nel bulbo molto maggiore rispetto a *P. antarctica* e *T. mediterraneus*. Queste ultime vivono per lo più in acque superficiali a differenza di *D. eleginoides* che, oltre ad avere un ampio range batimetrico (50-3850 m), vede per lo più gli adulti stanziare a profondità maggiori; pertanto, un elevato volume dei bulbi e un elevato quantitativo di cellule sembrerebbero essere dei buoni descrittori per capire se un organismo frequenta profondità elevate, al di sotto della zona fotica.

Passando al cervelletto, i valori di volume di tale regione sembrano aumentare all'aumento del livello trofico ma è possibile che altre variabili possano influire sui valori di volume; infatti, *D. eleginoides*, sebbene sia la specie con il maggior livello trofico, presenta valori nettamente più elevati rispetto alle altre specie, che potrebbero trovare spiegazione tenendo in considerazione l'ampio range batimetrico in cui è possibile trovare la specie. Aumenti di volume in funzione del livello trofico sono stati riscontrati anche con i valori volumetrici del mesencefalo sebbene, anche in questo caso, il livello trofico non sembri essere l'unica variabile ecologica a spiegare le differenze tra i valori osservati. A livello mesencefalico, è interessante osservare come i valori di massa relativa sembrano avere una relazione con la profondità ma anche con la latitudine. *A. rostrata* ha valori di massa relativa del mesencefalo esigui se comparati a quelle delle altre specie, dove *T. mediterraneus* ha i valori medi maggiori seguito da *P. antarctica* e *D. eleginoides*. *P. antarctica* è l'unica specie prettamente pelagica e vive per lo più in acque superficiali, nonostante ciò, non ha valori medi analoghi a quelli di *T. mediterraneus* e questo potrebbe essere dovuto al fatto che durante il periodo invernale, nella regione antartica, si viene a creare una situazione di buio totale e la copertura di ghiaccio che può persistere anche nella bella stagione limita il quantitativo di radiazione luminosa incidente. Stesso discorso si può fare per *D. eleginoides* che, oltre a ciò, frequenta anche profondità elevate.

Interessante è anche quanto emerso analizzando i valori di densità cellulare di cervelletto, mesencefalo e telencefalo dove *T. mediterraneus* presenta differenze significative con tutte le altre specie che hanno tra loro valori simili e inferiori. Soprattutto a livello di cervelletto e mesencefalo *T. mediterraneus* presenta elevati numeri di cellule che lo portano, infatti, a discostarsi dall'andamento lineare generale che accumuna le altre specie quando si analizza la relazione massa- cellule totali. Dati i valori di temperatura medi a cui le specie vivono, influenzati da latitudine e profondità a cui l'organismo vive, *T. mediterraneus* risulta essere l'unica specie a vivere in acque piuttosto calde. Questo, dunque, sembrerebbe influenzare il metabolismo cellulare portando quindi specie di acque temperate ad avere densità maggiori. Inoltre, dal momento che i valori di densità sembrano essere vincolati dal metabolismo, cervelletto e mesencefalo risultano essere le regioni maggiormente dispendiose nell'encefalo delle specie analizzate.

L'analisi delle componenti principali rimarca le osservazioni sui diversi descrittori utilizzati, evidenziando il raggruppamento di tre delle specie che per ragioni diverse vivono in ambienti più freddi e con parziale o totale scarsità di luce.

8. Bibliografia

1. Aicardi, S., Amaroli, A., Gallus, L., Di Blasi, D., Ghigliotti, L., Betti, F., ... & Ferrando, S. (2020). Quantification of neurons in the olfactory bulb of the catsharks *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) and *Galeus melastomus* (Rafinesque, 1810). *Zoology*, 141, 125796.
2. Albertson, R. C., Yan, Y. L., Titus, T. A., Pisano, E., Vacchi, M., Yelick, P. C., ... & Postlethwait, J. H. (2010). Molecular pedomorphism underlies craniofacial skeletal evolution in Antarctic notothenioid fishes. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 1-12.
3. Artigues, B., Morales-Nin, B., & Balguerías, E. (2003). Fish length-weight relationships in the Weddell Sea and Bransfield Strait. *Polar Biology*, 26(7), 463-467.
4. Balushkin, A. V. (2000). Morphology, classification, and evolution of notothenioid fishes of the Southern Ocean (Notothenioidei, Perciformes). *Journal of Ichthyology*, 40(1), S74.
5. Bayhan, B., Sever, T. M., & Kara, A. (2013). Diet composition of the Mediterranean horse mackerel, *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) (Osteichthyes: Carangidae), from the Aegean Sea. *Belg. J. Zool.*, 143(1), 15-22.
6. Brown, J. (2011). Ecology and life history of a deepwater notothenid, *Dissostichus eleginoides* Smitt 1989, around the Falkland Islands, SW Atlantic Ocean (Doctoral dissertation, University of Aberdeen).
7. D'Amato, L. C., & Di Porzio, U. (2011). *Introduzione alla neurobiologia: Meccanismi di sviluppo, funzione e malattia del sistema nervoso centrale*. Springer Science & Business Media.
8. Eastman, J. T., & Lannoo, M. J. (2001). Anatomy and histology of the brain and sense organs of the Antarctic eel cod *Muraenolepis microps* (Gadiformes; Muraenolepididae). *Journal of Morphology*, 250(1), 34-50.
9. Eastman, J. T., & Lannoo, M. J. (2003). Anatomy and histology of the brain and sense organs of the Antarctic plunderfish *Dolloidraco longedorsalis* (Perciformes: Notothenioidei: Artedidraconidae), with comments on the brain morphology of other artedidraconids and closely related harpagiferids. *Journal of Morphology*, 255(3), 358-377.
10. Edmunds, N. B., McCann, K. S., & Laberge, F. (2016). Food web structure shapes the morphology of teleost fish brains. *Brain, behavior and evolution*, 87(2), 128-138.
11. FAO-FIGIS, 2005. A world overview of species of interest to fisheries. Chapter: *Trachurus mediterraneus*.

12. Ferrando, S., Amaroli, A., Gallus, L., Di Blasi, D., Carlig, E., Rottigni, M., ... & Ghigliotti, L. (2019). Olfaction in the Antarctic toothfish *Dissostichus mawsoni*: clues from the morphology and histology of the olfactory rosette and bulb. *Polar Biology*, 42(6), 1081-1091.
13. Froese, R., Thorson, J. T., & Reyes Jr, R. B. (2014). A Bayesian approach for estimating length-weight relationships in fishes. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(1), 78-85.
14. Gonzalez-Voyer, A., & Kolm, N. (2010). Sex, ecology and the brain: evolutionary correlates of brain structure volumes in Tanganyikan cichlids. *PLoS One*, 5(12), e14355.
15. Gordon, J. D. M., & Duncan, J. A. R. (1985). The biology of fish of the family Moridae in the deep-water of the Rockall Trough. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65(2), 475-485.
16. Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3, 31.
17. Herculano-Houzel, S., & Kaas, J. H. (2011). Gorilla and orangutan brains conform to the primate cellular scaling rules: implications for human evolution. *Brain, behavior and evolution*, 77(1), 33-44.
18. Herculano-Houzel, S., & Lent, R. (2005). Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2518-2521.
19. Herculano-Houzel, S., Avelino-de-Souza, K., Neves, K., Porfírio, J., Messeder, D., Mattos Feijó, L., ... & Manger, P. R. (2014). The elephant brain in numbers. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 46.
20. Herculano-Houzel, S., Collins, C. E., Wong, P., & Kaas, J. H. (2007). Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3562-3567.
21. Herculano-Houzel, S., da Cunha, F. B., Reed, J. L., Kaswera-Kyamakya, C., Gillissen, E., & Manger, P. R. (2020). Microchiropterans have a diminutive cerebral cortex, not an enlarged cerebellum, compared to megachiropterans and other mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 528(17), 2978-2993.
22. Herculano-Houzel, S., Mota, B., & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12138-12143.
23. Herculano-Houzel, S., Ribeiro, P., Campos, L., Da Silva, A. V., Torres, L. B., Catania, K. C., & Kaas, J. H. (2011). Updated neuronal scaling rules for the brains of Glires (rodents/lagomorphs). *Brain, behavior and evolution*, 78(4), 302-314.

24. Huber, R., van Staaden, M. J., Kaufman, L. S., & Liem, K. F. (1997). Microhabitat use, trophic patterns, and the evolution of brain structure in African cichlids. *Brain, Behavior and Evolution*, 50(3), 167-182.
25. Jardim-Messeder, D., Lambert, K., Noctor, S., Pestana, F. M., de Castro Leal, M. E., Bertelsen, M. F., ... & Herculano-Houzel, S. (2017). Dogs have the most neurons, though not the largest brain: trade-off between body mass and number of neurons in the cerebral cortex of large carnivoran species. *Frontiers in neuroanatomy*, 11, 118.
26. Kaschner, K., Kesner-Reyes, K., Garilao, C., Rius-Barile, J., Rees, T., & Froese, R. (2016). AquaMaps: predicted range maps for aquatic species. World wide web electronic publication.
27. Kazu, R. S., Maldonado, J., Mota, B., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2014). Cellular scaling rules for the brain of *Artiodactyla* include a highly folded cortex with few neurons. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 128.
28. Kock, K. H. (1991). The state of exploited fish stocks in the Southern-Ocean-a review. *Archiv fur Fischereiwissenschaft*, 41(1), 1-66.
29. Lehmann, S., & Martins, L. M. (2013). Insights into mitochondrial quality control pathways and Parkinson's disease. *Journal of molecular medicine*, 91(6), 665-671.
30. Lisney, T. J., Wagner, H. J., & Collin, S. P. (2018). Ontogenetic shifts in the number of axons in the olfactory tract and optic nerve in two species of deep-sea grenadier fish (Gadiformes: Macrouridae: Coryphaenoides). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 168.
31. Magnússon, J. V. (2001). Distribution and some other biological parameters of two morid species *Lepidion eques* (Günther, 1887) and *Antimora rostrata* (Günther, 1878) in Icelandic waters. *Fisheries research*, 51(2-3), 267-281.
32. Marhounová, L., Kotrschal, A., Kverková, K., Kolm, N., & Němec, P. (2019). Artificial selection on brain size leads to matching changes in overall number of neurons. *Evolution*, 73(9), 2003-2012.
33. Martinez, E., & Torres, J. J. (2017). Energetics of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarctica*, from the Western Antarctic Peninsula. In *The Antarctic Silverfish: a Keystone Species in a Changing Ecosystem* (pp. 149-171). Springer, Cham.
34. McGann, J. P. (2017). Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science*, 356(6338).
35. Miller, R. G. (1993). *History and atlas of the fishes of the Antarctic Ocean*.
36. Mitchell, L., G., Mutchmor, J., A., Dolphin, W., D. (1991). *Zoologia*. Zanichelli Editore S.p.A.

37. Neves, K., Guimaraes, D. M., Rayêe, D., Valério-Gomes, B., Iack, P. M., Lent, R., & Mota, B. (2019). The reliability of the isotropic fractionator method for counting total cells and neurons. *Journal of neuroscience methods*, 326, 108392.
38. Ngwenya, A., Patzke, N., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2016). Continued growth of the central nervous system without mandatory addition of neurons in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Brain, behavior and evolution*, 87(1), 19-38.
39. Nieuwenhuys, R., Hans, J., & Nicholson, C. (2014). *The central nervous system of vertebrates*. Springer.
40. Olkowicz, S., Kocourek, M., Lučan, R. K., Porteš, M., Fitch, W. T., Herculano-Houzel, S., & Němec, P. (2016). Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26), 7255-7260.
41. Park, P. J., & Bell, M. A. (2010). Variation of telencephalon morphology of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in relation to inferred ecology. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(6), 1261-1277.
42. Park, P. J., & Bell, M. A. (2010). Variation of telencephalon morphology of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in relation to inferred ecology. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(6), 1261-1277.
43. Păun, C., Galațchi, M., Țiganov, G., Danilov, C. S., Nicolaev, A., Maximov, V., ... & Nicolae, C. G. (2019). Growth and Age of *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) on the Romanian Black Sea Coast. *Cercetări Marine-Recherches Marines*, 49(1), 116-124.
44. Pinkerton, M. H. (2017). Diet and trophic ecology of adult Antarctic silverfish (*Pleuragramma antarctica*). In *The Antarctic silverfish: a keystone species in a changing ecosystem* (pp. 93-111). Springer, Cham.
45. Pollen, A. A., Dobberfuhr, A. P., Scace, J., Igulu, M. M., Renn, S. C., Shumway, C. A., & Hofmann, H. A. (2007). Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain, Behavior and Evolution*, 70(1), 21-39.
46. Pollen, A. A., Dobberfuhr, A. P., Scace, J., Igulu, M. M., Renn, S. C., Shumway, C. A., & Hofmann, H. A. (2007). Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain, Behavior and Evolution*, 70(1), 21-39.
47. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., & White, L. E. (2001). *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
48. Ragonese, S., Fiorentino, F., Garofalo, G., Gristina, M., Levi, D., Gancitano, S., ... & Zarrad, R. (2003). Distribution, abundance, and biological features of picarel (*Spicara flexuosa*), Mediterranean (*Trachurus mediterraneus*) and Atlantic (*T. trachurus*) horse mackerel based

- on experimental bottom-trawl data (MEDITS, 1994–2002) in the Strait of Sicily. *MedSudMed Technical Documents*, 5(100-114), 92.
49. Ribeiro, P. F., Manger, P. R., Catania, K. C., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2014). Greater addition of neurons to the olfactory bulb than to the cerebral cortex of eulipotyphlans but not rodents, afrotherians or primates. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 23.
 50. Sandersfeld, T., Mark, F. C., & Knust, R. (2017). Temperature-dependent metabolism in Antarctic fish: do habitat temperature conditions affect thermal tolerance ranges?. *Polar Biology*, 40(1), 141-149.
 51. Sarko, D. K., Catania, K. C., Leitch, D. B., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2009). Cellular scaling rules of insectivore brains. *Frontiers in neuroanatomy*, 3, 8.
 52. Van Dongen, P. A. M. (1998). Brain size in vertebrates. In *The central nervous system of vertebrates* (pp. 2099-2134). Springer, Berlin, Heidelberg.
 53. Viette, M., Giulianini, P. G., & Ferrero, E. A. (1997). Reproductive biology of scad, *Trachurus mediterraneus* (Teleostei, Carangidae), from the Gulf of Trieste. *ICES Journal of Marine Science*, 54(2), 267-272.
 54. Welsford, D. C., Candy, S. G., Lamb, T. D., Nowara, G. B., Constable, A. J., & Williams, R. (2011). Habitat use by Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides* Smitt 1898) on the Kerguelen Plateau around Heard Island and the McDonald Islands. *The Kerguelen Plateau: Marine Ecosystem and Fisheries*. Société française d'ichtyologie, Paris, 125-136.
 55. Wenner, C. A., & Musick, J. A. (1977). Biology of the morid fish *Antimora rostrata* in the western North Atlantic. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(12), 2362-2368.
 56. Wöhrmann, A. P., Hagen, W., & Kunzmann, A. (1997). Adaptations of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum* (Pisces: Nototheniidae) to pelagic life in high-Antarctic waters. *Marine Ecology Progress Series*, 151, 205-218.
 57. Yankova, M., Mihneva, V., Radu, G., & Mehanna, S. (2010). General biology of horse mackerel *Trachurus mediterraneus* (Aleev, 1956) off the Bulgarian Black Sea Coast. *Proceedings of the Union of Scientists, Varna*, 73-77.
 58. Zaccheo, D., & Pestarino, M. (2013). *Citologia, Istologia e Anatomia microscopica*. Pearson Italia.