

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA  
INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA  
XX CICLO

TESI

**IL NERVO TERMINALE E IL SISTEMA DI FIBRE  
OLFATTIVE EXTRABULBARI**

LUCIANO LUONGO

TUTORE  
CH.MO PROF.  
RAKESH K. RASTOGI

COORDINATORE  
CH.MA PROF.  
SILVANA FILOSA

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

*“It is not the strongest of the species that survives,  
nor the most intelligent that survives.  
It is the one that is the most adaptable to change.”*  
C. Darwin

# INDICE

INTRODUZIONE	4
IL SISTEMA OLFATTIVO PRINCIPALE	8
IL SISTEMA OLFATTIVO ACCESSORIO	11
IL SISTEMA DEL NERVO TERMINALE	14
MORFOLOGIA DEL NERVO TERMINALE NEI VERTEBRATI	18
FUNZIONI DEL NERVO TERMINALE	21
LA SCOPERTA DELL'EBOS	24
EBOS = NT?	26
SCOPO DELLA RICERCA	30
MATERIALI E METODI	33
ANIMALI	34
PRELIEVI	34
FISSAZIONE	35
INCLUSIONE E TAGLIO	35
• <i>PREPARATI PER IL TAGLIO AL MICROTOMO</i>	35
• <i>PREPARATI PER IL TAGLIO AL CRIOSTATO</i>	37
• <i>PREPARATI PER IL TAGLIO AL VIBRATOMO</i>	37
ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA	37
L'FMRFA	42
L'ANTIGENE NUCLEARE DI PROLIFERAZIONE CELLULARE	43
APPLICAZIONE DI TRACCIANTI NEURONALI	44
• <i>APPLICAZIONI DI BIOCITINA</i>	45
• <i>APPLICAZIONI DI CRISTALLI DI CARBOCIANINA (DII/DIA)</i>	47
OSSERVAZIONE E FOTODOCUMENTAZIONE	50

RISULTATI	51
TELEOSTEI	52
• ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DI MATERIALE <i>FMRFA-IR NELL'ENCEFALO DEL TELEOSTEO           MOENKHAUSIA SANCTAEFILOMENAE</i>	52
• APPLICAZIONI CRISTALLI DI <i>DII/DIA</i> ALLA MUCOSA OLFATTIVA O AL NERVO TRANCIATO DEL TELEOSTEO <i>MOENKHAUSIA SANCTAEFILOMENAE</i>	58
• <i>MOENKHAUSIA SANCTAEFILOMENAE: DOPPIA MARCATURA           CON APPLICAZIONE DI BIOCITINA ALLA CAMERA OLFATTIVA           E IMMUNOISTOCHEMICA PER IL PEPTIDE FMRFA</i>	62
• ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DI MATERIALE <i>FMRFA-IR NELL'ENCEFALO DEL TELEOSTEO           PARACHEIRODON INNESI</i>	63
• APPLICAZIONE CRISTALLI DI <i>DII/DIA</i> ALLA MUCOSA OLFATTIVA O AL NERVO TRANCIATO DEL TELEOSTEO <i>PARACHEIRODON INNESI</i>	69
• ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DI MATERIALE <i>FMRFA-IR NELL'ENCEFALO DEL TELEOSTEO           ASTYANAX FASCIATUS MEXICANUS</i>	71
• APPLICAZIONI CRISTALLI DI <i>DII/DIA</i> ALLA MUCOSA OLFATTIVA O AL NERVO TRANCIATO DEL TELEOSTEO <i>ASTYANAX FASCIATUS MEXICANUS</i>	73
• <i>ASTYANAX FASCIATUS MEXICANUS: DOPPIA MARCATURA           CON APPLICAZIONE DI BIOCITINA ALLA CAMERA OLFATTIVA           E IMMUNOISTOCHEMICA PER IL PEPTIDE FMRFA</i>	75
• ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DI MATERIALE <i>FMRFA-IR NELL'ENCEFALO DEL TELEOSTEO           CARASSIUS AURATUS</i>	76
• APPLICAZIONI CRISTALLI DI <i>DII/DIA</i> ALLA MUCOSA OLFATTIVA O AL NERVO TRANCIATO DEL TELEOSTEO <i>CARASSIUS AURATUS</i>	78
• <i>CARASSIUS AURATUS: DOPPIA MARCATURA CON           APPLICAZIONE DI BIOCITINA ALLA CAMERA OLFATTIVA           E IMMUNOISTOCHEMICA PER IL PEPTIDE FMRFA</i>	80
ANFIBI	82
• <i>RANA ESCULENTA: APPLICAZIONE TRACCIANTE <i>DII</i> ALLA           MUCOSA OLFATTIVA O AL NERVO TRANCIATO DURANTE LO           SVILUPPO</i>	82
• <i>RANA ESCULENTA: DOPPIA MARCATURA CON           APPLICAZIONE DI BIOCITINA ALLA CAMERA OLFATTIVA E           IMMUNOISTOCHEMICA PER IL PEPTIDE FMRFA</i>	88
• <i>RANA ESCULENTA: IMMUNOISTOCHEMICA PER LA PCNA</i>	90

• <i>XENOPUS LAEVIS: APPLICAZIONE TRACCIANTI NEURONALI (DII E BIOCITINA) ALLA CAMERA OLFATTIVA O AL NERVO TRANCIATO DURANTE LO SVILUPPO</i>	104
• <i>XENOPUS LAEVIS: APPLICAZIONE DI CRISTALLI DI DII A LIVELLO DELLA COMMESSURA ANTERIORE DURANTE LO SVILUPPO</i>	107
• <i>XENOPUS LAEVIS: DOPPIA MARCATURA CON APPLICAZIONE DI BIOCITINA ALLA CAMERA OLFATTIVA E IMMUNOISTOCHEMICA PER IL PEPTIDE FMRFA</i>	109
• <i>XENOPUS LAEVIS: IMMUNOISTOCHEMICA PER LA PCNA</i>	111
DISCUSSIONI	120
CONSIDERAZIONI METODOLOGICHE	122
• <i>FMRFA</i>	122
• <i>PCNA</i>	123
• <i>TRACCIANTI NEURONALI</i>	124
ANALISI COMPARATIVA	127
• <i>TELEOSTEI</i>	127
• <i>ANFIBI</i>	135
ANALISI COMPARATIVA INTERCLASSE	141
CONSIDERAZIONI FUNZIONALI	144
EBOS E NT	148
CONCLUSIONI	151
BIBLIOGRAFIA	152

# INTRODUZIONE

La capacità di percepire stimoli di natura chimica è una caratteristica comune a quasi tutti gli animali, anche se in realtà non è facile stabilire in quali casi si può parlare di senso dell'olfatto paragonabile a quello dei vertebrati.

In alcuni casi si possono riconoscere cellule di senso specializzate alla percezione di sostanze di natura chimica. Gli insetti, ad esempio, presentano degli organi specifici costituiti da sensilli particolari localizzati, soprattutto e in gran numero, sulle antenne, le quali rappresentano il principale organo olfattivo in questa classe.

Nei vertebrati, l'organo olfattivo, situato nelle cavità nasali, contiene sempre strutture nervose e si presenta sotto forma di un paio di lobi olfattivi. Strutturalmente l'organo olfattivo è abbastanza complesso e la sua organizzazione ha uno sviluppo diverso nelle varie classi.

Nei mammiferi, il senso dell'olfatto è molto sviluppato in quanto riveste una grande importanza per le interazioni dell'animale con l'ambiente esterno.

L'olfatto è considerato il più antico dei cinque sensi a livello evolutivo. Ciò è confermato dai suoi legami con le zone più remote e primitive del cervello, le quali controllano gli istinti primari e le emozioni, e dalla conservazione del suo livello funzionale.

Agli inizi del XX secolo, fu proposto da alcuni autori che il telencefalo degli anamni fosse, per la maggior parte, sotto il controllo del sistema olfattivo (Herrick, 1910; Backstrom, 1924) e che il cervello dei vertebrati più evoluti derivasse da un primitivo "cervello olfattivo" (Herrick, 1924). Lo stesso Herrick introdusse il termine rinencefalo per indicare la regione dell'encefalo sotto il dominio olfattivo. L'autore considerava che da un telencefalo essenzialmente olfattivo si fosse sviluppato, nel corso dell'evoluzione, il complesso telencefalo dei mammiferi, in cui la regione olfattiva è molto limitata ed oscurata da nuove acquisizioni evolutive.

In realtà, nel telencefalo dei pesci e degli anfibi, aree non olfattive sono già presenti (Ebbesson and Heimer, 1968; Scalia et al., 1968; Royce and Northcutt, 1969; Scalia and Ebbesson, 1971) e mostrano gli stessi collegamenti della corteccia dei mammiferi (Ebbesson and Schroeder, 1971; Northcutt, 1972; Cohen et al., 1973). Questi elementi sono definiti neocorticali equivalenti.

In sostanza il piano strutturale del telencefalo dei vertebrati era già definito fin dall'inizio della loro evoluzione.

In ogni modo, nonostante l'enorme sviluppo del telencefalo di regioni non olfattive, il sistema olfattivo ha subito modeste modificazioni evolutive.

Il sistema olfattivo è implicato nella percezione di sostanze chimiche coinvolte nelle funzioni riproduttive, nella regolazione neuroendocrina, le risposte emozionali, il riconoscimento di conspecifici, predatori e prede, nella selezione del cibo, poiché la percezione dei sapori risulta dall'integrazione di segnali olfattivi e gustativi.

I meccanismi molecolari legati alla funzione olfattiva prevedono, a livello periferico, la captazione delle sostanze chimiche e la trasduzione operata da specifici recettori.

La maggior parte di anfibi, rettili e mammiferi, possiede un duplice sistema olfattivo, costituito da differenti reti neuronali che, in base alle conoscenze presenti, assolverebbero diverse e specifiche funzioni. Il primo sistema neuronale mette in comunicazione la cavità nasale con i bulbi olfattivi primari, costituendo, in questo modo, il sistema olfattivo principale. La seconda rete di fibre costituisce il sistema olfattivo accessorio, costituito da un organo sensoriale (vomeronasale o di Jacobson) un nervo vomeronasale e un bulbo olfattivo accessorio. Si ritiene che il sistema olfattivo accessorio sia principalmente coinvolto nella mediazione delle risposte comportamentali e fisiologiche relative alla predazione e/o ai feromoni sessuali.



Accanto a queste due principali vie olfattive, sono state descritte altre vie nervose, la cui funzione è, tuttora, oggetto di vivaci discussioni. Tali sistemi sono, molto spesso, difficili da distinguere e da caratterizzare morfologicamente. Di conseguenza, sono scarse le conoscenze sulle loro implicazioni funzionali.

In seguito è riportata una breve descrizione dei sistemi coinvolti nella percezione olfattiva.

## IL SISTEMA OLFATTIVO PRINCIPALE

Il sistema olfattivo principale (Fig.1) ha origine dal placode olfattivo e consta, a livello periferico, di una mucosa olfattiva dove hanno accesso le sostanze odorose attraverso le narici o le coane. Nella mucosa olfattiva sono presenti recettori olfattivi primari in associazione a cellule secernenti e di supporto. I recettori olfattivi primari sono cellule bipolari dotate di un dendrite nella regione apicale provvisto di microvilli, salvo qualche eccezione. All'opposto emerge il prolungamento assonico che, unendosi a quelli provenienti dagli altri recettori, forma il nervo olfattivo. Questo ultimo termina a livello dei bulbi olfattivi principali telencefalici. All'estremità dei prolungamenti assonici, si presentano ramificazioni che formano sinapsi con l'albero dendritico delle cellule mitrali bulbari costituendo delle strutture caratteristiche, i glomeruli. La struttura dei bulbi

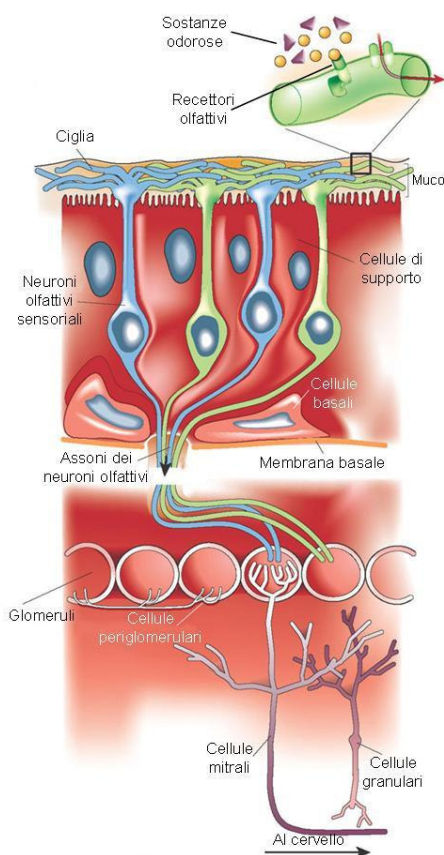


Fig.1 Sistema olfattivo principale. Da: How the olfactory system makes sense of scents (2001). Stuart Firestein, Nature 413, 211-218. leggermente modificato.

olfattivi ha un'organizzazione pressoché laminare: lo strato superficiale è quello del nervo olfattivo che contiene gli assoni dei recettori olfattivi descritti prima, e cellule gliali. Spostandosi verso l'interno, vi si trova lo strato glomerulare, costituito, appunto, dai glomeruli, i quali sono circondati da piccoli neuroni e da cellule gliali. Le cellule mitrali, i cui dendriti sono parte dei glomeruli, costituiscono il terzo strato della struttura. Infine, si ha lo strato granulare, il più interno della struttura bulbare. Esso è costituito da molte piccole cellule, granulari, prive di assoni, con dendriti che

si ramificano nello strato ed un unico dendrite che raggiunge lo strato delle cellule mitrali prendendo contatti sinaptici con esse.

Tale descrizione fa riferimento ad uno schema base presente nei ciclostomi. Tuttavia, sono presenti alcune variazioni negli altri gruppi di vertebrati, anche se si tratta di modificazioni specifiche che, sostanzialmente, non cambiano l'organizzazione generale. Ad esempio, negli squalomorfi, tra i pesci cartilaginei, gli strati granulare e mitrale non sono distinguibili; essi costituiscono uno strato unico contenente entrambi i tipi cellulari. Nei pesci non teleostei, sotto allo strato glomerulare, è posta una lamina esterna, costituita da cellule mitrali e periglomerulari; queste ultime contattano, a livello periferico, i recettori dell'epitelio olfattivo. Nei dipnoi la struttura è più complessa per la presenza di due strati di fibre, lo strato plessiforme esterno, posto tra quello glomerulare e quello mitrale, e lo strato plessiforme interno, subito prima di quello delle cellule granulari. Negli anfibi la struttura dei bulbi olfattivi principali è simile a quella dei dipnoi con l'unica differenza che, in questo gruppo, manca lo strato plessiforme interno.

I bulbi olfattivi di rettili, uccelli e mammiferi sono più complessi, in quanto sono costituiti da un numero maggiore di strati: glomerulare, granulare esterno, plessiforme esterno, mitrale, plessiforme interno e granulare interno.

I bulbi olfattivi inviano informazioni al telencefalo anteriore attraverso le proiezioni olfattive secondarie, anche note come tratti olfattivi.

La lunghezza relativa dei nervi e dei tratti olfattivi è variabile. Nei pesci cartilaginei ed ossei, i bulbi olfattivi possono essere in posizione sessile, in pratica giustapposti al telencefalo. In questi casi i nervi olfattivi sono, di regola, lunghi, e i tratti olfattivi più brevi. La situazione è diametralmente opposta nelle specie con i bulbi olfattivi pedunculati, in cui i bulbi sono

prossimi alla mucosa olfattiva e sono collegati al resto del telencefalo mediante peduncolo olfattivo.

## IL SISTEMA OLFATTIVO ACCESSORIO

Nonostante non fossero noti i meccanismi molecolari della rilevazione chimica, il quadro complessivo relativo alla fisiologia del sistema olfattivo principale sembrava piuttosto chiara. Con la scoperta del sistema olfattivo accessorio, si pose immediatamente il problema delle competenze funzionali dell'uno e dell'altro sistema.

La componente sensoriale del sistema olfattivo accessorio (o vomeronasale, perché presente in prossimità dell'osso vomere) fu scoperta per caso nel 1703 da un chirurgo olandese di nome Ruysch. Egli durante l'intervento ad un soldato, nel tentativo di curargli una profonda ferita al viso, si accorse della presenza di un piccolo organo alloggiato in prossimità del setto nasale. Tale organo fu in seguito riscoperto e studiato da Jacobson (1811) in una varietà di mammiferi, anche se ne negò esplicitamente la presenza nell'uomo (forse Jacobson non era nemmeno a conoscenza del dato di Ruysch). Sta di fatto che l'organo periferico preposto alla percezione sensoriale è oggi noto come organo di Jacobson e non di Ruysch. Il nome d'organo di Jacobson si deve a Potiquet (1821), che produsse la prima estesa trattazione dell'organo vomeronasale nell'uomo. Probabilmente, anch'egli era all'oscuro della scoperta di Ruysch.

Questo organo non differisce in maniera sostanziale dall'organo olfattivo principale. Importante porre l'accento sul fatto che i recettori olfattivi secondari presenti nell'organo di Jacobson presentano, a livello del dendrite apicale, ciglia anziché microvilli (con rare eccezioni). Le sostanze odorose accedono all'organo vomeronasale prevalentemente attraverso aperture specifiche presenti sotto la volta palatina o attraverso dotti che sboccano nel canale nasale. Gli assoni dei recettori olfattivi secondari, unendosi, formano il nervo vomeronasale che termina nei bulbi olfattivi accessori, dove si formano i glomeruli vomeronasali.

Sin dagli studi di Jacobson, era stato stabilito che il sistema olfattivo accessorio fosse una caratteristica apparsa durante il percorso evolutivo dai tetrapodi. Di conseguenza, sembrava piuttosto logico legare l'organo vomeronasale alla percezione delle sostanze disciolte nell'aria, come adattamento all'habitat terrestre (Bertmar, 1981). Tuttavia, Broman (1920) notò che l'organo vomeronasale era ripieno di liquido, quindi l'organo percepiva sostanze in soluzione come la mucosa olfattiva dei pesci. Quindi, aveva ipotizzato che la mucosa olfattiva dei pesci fosse omologa all'organo vomeronasale dei vertebrati e il sistema olfattivo principale fosse la nuova acquisizione evolutiva dei tetrapodi. Alla luce delle conoscenze attuali, entrambe le ipotesi sembrano poco sostenibili. Infatti, sono ormai molti i gruppi di ricerca che riportano la presenza d'omologhi vomeronasali nei pesci. In *Protopterus* è stato segnalato da diversi autori un bulbo olfattivo accessorio (Rudebeck, 1945; Schnitzlein and Crosby, 1967). Schnitzlein e Crosby (1967) hanno anche segnalato la presenza di un nervo e di un organo vomeronasali separati. Tuttavia, queste osservazioni non sono state confermate da un altro autore (Derivot, 1984a, b). Nel pesce ratto (*Chimaera*, condroitto non elasmobranco) sono stati descritti due bulbi olfattivi accessori per lato: uno situato dorsalmente, come quello descritto in *Protopterus*, e uno in posizione ventrolaterale, caso unico finora nei pesci (Faucette, 1969). Inoltre, una porzione del bulbo olfattivo di *Amia* è stata riconosciuta come bulbo olfattivo accessorio (Schnitzlein, 1964). Altre segnalazioni nei pesci di componenti olfattive accessorie sono state ricavate da studi sugli actinopterigi non teleostei: lo storione (Adair, 1964) e il pesce spatola (Story, 1964) in cui il bulbo olfattivo accessorio è stato identificato come una porzione della parte dorsomediale del bulbo olfattivo principale. In uno studio sui teleostei è stato anche evidenziato che il tratto olfattivo mediale ha delle connessioni molto simili a quelle del bulbo olfattivo accessorio (Dulka, 1993). Tuttavia, non si può dire con certezza

che le due strutture siano omologhe, oppure che si siano evolute indipendentemente.

L'organo vomeronasale potrebbe essere presente nei pesci in una forma non segregata. Ciò è supportato dall'osservazione che la mucosa olfattiva dei pesci possiede recettori ciliati (tipici dell'organo vomeronasale) e recettori dotati di microvilli (caratteristici della mucosa olfattiva principale).

Riguardo agli altri vertebrati, il sistema vomeronasale è ben sviluppato in anfibi, mammiferi e nella maggioranza dei rettili squamati (lucertole e serpenti). E' assente nei proteidi (urodeli), nei tecodonti (coccodrilli e uccelli) e in alcuni mammiferi marini. In questi casi si tratta, probabilmente, di una condizione secondaria.

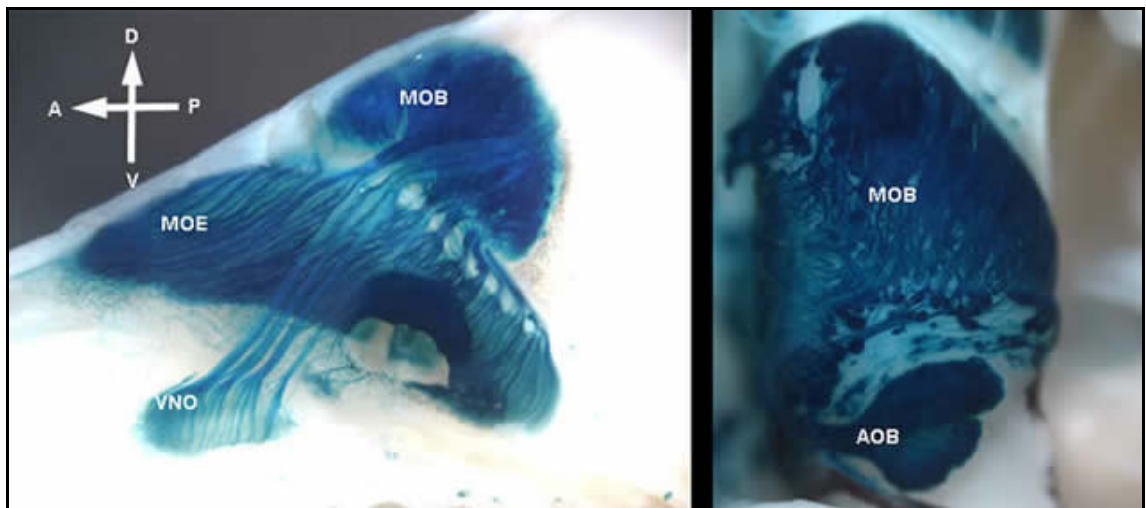


Fig. 2 Sistema olfattivo accessorio. In figura è mostrato l'organo vomeronasale di topo. Le fibre olfattive dei neuroni dell'organo di Jacobson, terminano nel bulbo olfattivo accessorio. MOE, epitelio olfattivo principale; MOB, bulbo olfattivo principale; VNO, organo vomeronasale; AOB, bulbo olfattivo accessorio. Da: <http://research.stowers-institute.org/yulab/Research.html>

## IL SISTEMA DEL NERVO TERMINALE

Nella maggioranza dei casi, il nervo terminale (NT) si presenta come una rete lassa di fibre distribuita tra la mucosa olfattiva e la regione ipotalamica. Esso presenta lungo il suo percorso uno o più gangli o anche singole cellule. Fu scoperto per la prima volta come nervo cranico soprannumerario in un piccolo squalo (Fritsch, 1878) e descritto come un peduncolo che si estende dal telencefalo ventrale anteriore alla regione della mucosa olfattiva, procedendo medialmente separato completamente dai tratti olfattivi (Fig. 3). Un nervo con simili caratteristiche fu descritto in seguito nel dipnoo *Protopterus* (Pinkus, 1894) e in varie specie di squali e razze (Locy, 1905), come un nervo che presenta terminali nella mucosa olfattiva ed entrerebbe nell'encefalo a livello del neuroporo anteriore il quale è chiuso dalla lamina terminale. Per tale motivo lo stesso autore lo designò come “nervo terminale”. La presenza di un nervo ganglionato, in

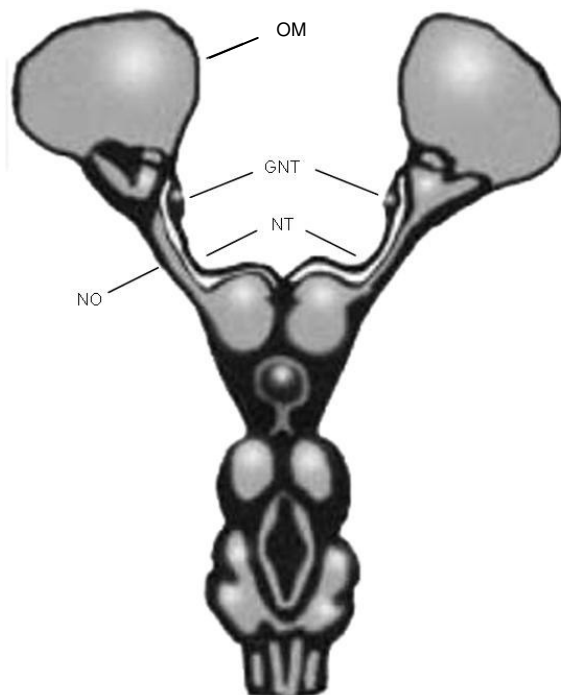


Fig. 3 Diagramma del cervello di un squalo. Il nervo terminale (NT) è fisicamente separato dal nervo olfattivo (NO). Visibili i gangli del NT (GNT). OM, mucosa olfattiva. Da: Wirsig-Wiechmann et al., 2001.

posizione rostrale rispetto ai bulbi olfattivi, è stata riportata in quasi tutti i vertebrati. Tuttavia, l'identificazione di tale struttura nei tetrapodi e nella maggioranza degli osteitti, è complicata dalla sua stretta associazione con i nervi olfattivo e/o vomeronasale (Fig. 4). D'altronde, in alcuni casi non sono nemmeno nettamente distinguibili gangli lungo il suo percorso. Tali problematiche oscurarono lo studio del NT per oltre cinquanta anni.



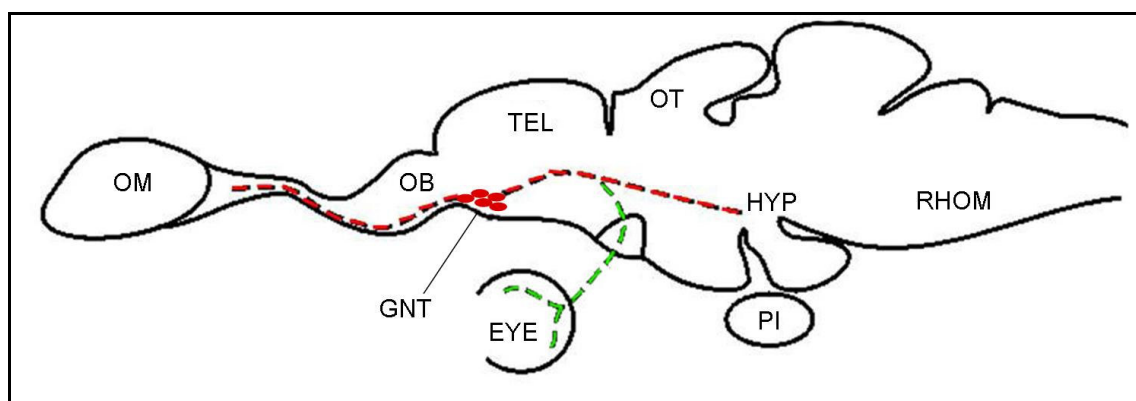


Fig. 4 Il nervo terminale nei tetrapodi. In figura il cervello di *Danio rerio*. Le proiezioni del nervo terminale (in rosso nella figura) si estendono dalla mucosa olfattiva (OM) all'ipotalamo (HYP). Presenti gangli lungo il suo percorso (GNT). Nei pesci sono presenti fibre (in verde nella figura) che si estendono alla retina, costituendo il nucleo olfatto-retinale. OB, bulbo olfattivo; TEL, telencefalo; OT, tetto ottico; EYE, occhio; PI, ipofisi; RHOM, rombencefalo.

L'avvento delle tecniche d'immunoistochimica suscitò nuovamente l'interesse allo studio del sistema del NT. Esse permettevano la localizzazione di diverse sostanze nel sistema nervoso centrale e nei nervi periferici. Le successive indagini immunoistochimiche, infatti, permisero di rilevare la presenza di gonadotropin releasing hormone (GnRH) nel NT dei mammiferi (Schwanzel-Fukuda and Silverman, 1980). In seguito, tale peptide fu localizzato nel NT di tutti gli gnatostomi (Muske, 1993). In seguito, furono localizzate altre molecole neuroattive nel NT: il tetrapeptide FMRFamide (FMRFa; Stell et al., 1984; Bonn and König, 1988, 1989a, b; Fujii et al., 1992; Magliulo-Cepriano et al., 1993), l'acetilcolina (Wirsig and Leonard, 1986; von Bartheld et al., 1990), sostanza P (Stell, 1985; Szabo et al., 1987; Alonso et al., 1989) e il neuropeptide Y (NPY; Chiba and Honma, 1992; Vallarino et al., 1995; Chiba et al., 1996; Gaikwad et al., 2004; Gaikwad et al., 2005; Sakharkar et al., 2005). Tali molecole, comunque, delineano la regione più periferica del NT e non sono utili per descrivere il percorso prossimale, poiché tali sostanze sono anche presenti in neuroni encefalici le cui fibre si sovrappongono in alcune aree a quelle del NT, impedendone, di fatto, la

corretta caratterizzazione morfologica e i siti di terminazione centrale del nervo.

L'avvento dei traccianti permise di approfondire ulteriormente gli studi sul NT. Queste sostanze sono capaci di spostarsi lungo una fibra nervosa con meccanismi molecolari differenti. Applicate alla mucosa olfattiva, tali sostanze percorrono il nervo olfattivo invadendo il cervello. Altra tecnica utile è l'istochimica per le lectine, specialmente per la lectina della soia. Con tale tecnica è stato evidenziato il sistema olfattivo primario e le fibre eccedenti nell'encefalo che non terminavano nei bulbi.

Il quadro generale che si ottenne dall'utilizzo di tali tecniche, fu la presenza del sistema terminale in tutti i vertebrati. Infatti, esso è stato descritto nei ciclostomi (von Bartheld and Meyer, 1988), nei pesci ossei (Munz et al., 1981), nei pesci actinopterigi non-teleostei come *Amia* (Allis, 1897) e *Polypterus* (von Bartheld and Meyer, 1986); tra gli anfibi un NT sembra essere presente in alcune specie di anuri e urodeli (Herrick, 1909; McKibben, 1911; Wirsig and Getchell, 1986; Muske and Moore, 1988; Schmidt et al., 1988; Schmidt and Roth, 1990; di Meglio et al., 1991; D'Aniello et al., 1994; Wirsig-Wiechmann, 1993); è stato dettagliatamente studiato in *Xenopus* (Hofmann and Meyer, 1989a, 1989b, 1991a, 1991b, 1992) e descritto in una specie di apode, *Ichthyophis beddomei* (Pinelli et al., 1997). Nei rettili, il NT è stato identificato in embrioni di tartaruga (Johnston, 1913; Larsell, 1919), nella luscengola (D'Aniello et al., 2001) e nel serpente giarrettiera adulto, in cui sarebbe stato localizzato un ganglio terminale GnRH immunoreattivo (GnRH-ir) (Smith et al., 1997). Tra gli uccelli, tale nervo è stato descritto in embrioni d'anatra (von Bartheld et al., 1987), di pollo (Wirsig-Wiechmann, 1990) e di piccione (Norgren et al., 1992). Il NT è stato identificato in molti mammiferi, incluse specie quali il porcellino d'India (Schwanzel-Fukuda and Silverman, 1980), i pipistrelli (Brown, 1980; Oelschläger and Northcutt, 1992), i cetacei

(Demeski et al., 1990; Ridgway et al., 1987) ed alcuni primati (Wirsig and Getchell, 1986; Witkin, 1987a, 1987b) tra cui l'uomo (Brookover, 1914, 1917; Fuller and Burger, 1990).

## MORFOLOGIA DEL SISTEMA DEL NERVO TERMINALE NEI TELEOSTEI

Il sistema del NT nei teleostei presenta caratteristiche peculiari, tanto da meritare una trattazione più approfondita.

Studi compiuti su alcune specie di pesci, in cui è stato seguito il trasporto di horseradish peroxidase (HRP) in seguito ad iniezioni intraoculari o applicazioni al nervo olfattivo reciso, hanno dimostrato la presenza di alcune cellule immunoreattive poste nel telencefalo rostrale che avevano processi distali che si estendevano nel nervo olfattivo e, contemporaneamente, fibre che raggiungevano la retina controlaterale attraverso le vie dell'encefalo anteriore, chiasma ottico e nervi ottici (Munz and Claas, 1981). Tale gruppo di cellule HRP immunoreattive (HRP-ir), per le sue particolari connessioni, è stato designato come nucleo olfatto-retinale (NOR; Fig. 4). Gli autori suggerirono che tale sistema potesse essere omologo al NT, poiché, cellule localizzate nella stessa posizione in altri teleostei erano già state considerate un ganglio dello stesso nervo. Successive indagini immunoistochimiche in varie specie di teleostei, hanno invece mostrato che il NOR e il NT sono due strutture diverse, entrambe distinte dal sistema olfattivo primario e che nessuna delle due contatta l'epitelio olfattivo (Szabo et al., 1991a). In ogni caso, quest'ultima ipotesi trova scarso riscontro in letteratura.

Altri studi hanno indicato che le cellule gangliari del NT presentano caratteristiche diverse nelle specie con bulbi olfattivi sessili e peduncolati. Nel primo gruppo si osserva, di solito, un unico aggregato di neuroni localizzato nel telencefalo subito dopo i bulbi olfattivi, mentre nelle specie con bulbi peduncolati la situazione è meno chiara, perché sono presenti una serie di gangli lungo i tratti olfattivi, di cui l'ultimo dovrebbe essere il NOR.

Per verificare se il NT nei pesci con bulbi olfattivi pedunculati ha relazioni simili al NOR, Demski e Northcutt (1983) hanno posto HRP nel sacco nasale del pesce rosso e dimostrato che, oltre all'attesa colorazione dei terminali delle fibre olfattive nel bulbo, erano marcati altri assoni che si estendevano, attraverso il tratto olfattivo mediale, nell'area del telencefalo omologa alla regione del setto dei tetrapodi. Queste fibre sembravano originare da grandi neuroni (paragonati alle cellule del bulbo) localizzati maggiormente sul lato ventrale del nervo e bulbo olfattivi. In aggiunta, alcune delle stesse cellule erano HRP positive in seguito ad iniezioni del tracciante nella retina. Questi ultimi neuroni apparentemente non contattavano l'epitelio olfattivo. Gli autori ipotizzarono l'esistenza di due popolazioni cellulari del sistema olfatto-retinale. In questo lavoro essi fanno riferimento al NT, ma l'omologia non può essere considerata certa, poiché non è rispettato il criterio odologico. Infatti, è molto controversa la questione se fibre del NT contattano la mucosa olfattiva. Inoltre, l'estensione alla retina è stata dimostrata solo in pesci (Springer, 1983; Ekström et al., 1988; Stell et al., 1984; Ostholm et al., 1990) ed anfibi (Uchiyama et al., 1988; Wirsig-Wiechmann and Basinger, 1988), ma non in altri vertebrati. Tuttavia, molti autori citano indifferentemente il sistema olfatto-retinale e il NT, dando per scontata l'omologia.

Stell e collaboratori (1984, 1987), hanno dimostrato che alcune delle cellule e delle fibre retinopetali del pesce rosso erano contemporaneamente GnRH-ir e FMRFa-immunoreattivi (FMRFa-ir). Anch'essi hanno discusso circa l'esistenza di due popolazioni di cellule del NT, una associata all'epitelio olfattivo ma non alla retina e l'altra con proiezioni alla retina ma senza connessioni dirette con la mucosa nasale.

Demski e Northcutt (1983) hanno anche ipotizzato che il sistema potesse essere coinvolto nel controllo della fisiologia riproduttiva e del comportamento, in base all'osservazione che la stimolazione sia del tratto

olfattivo mediale (ma non d'altre parti del tratto olfattivo), sia del nervo ottico, provoca il rilascio di sperma. Alcuni autori hanno anche suggerito che il sistema olfatto-retinale possa mediare le risposte del maschio ai feromoni sessuali femminili, poiché l'attività diminuisce, o è eliminata, da lesioni del tratto olfattivo mediale e septo-preottiche (Kyle et al., 1987). Interessante notare, ancora, che in *Oncorhynchus kisutch* le proiezioni alla retina immunoreattive all'FMRFa, si sviluppano al momento della "smoltification", in altre parole nel momento in cui il pesce si prepara alla migrazione dall'acqua dolce al mare (Ebbesson et al., 1991).

## FUNZIONI DEL NERVO TERMINALE

Le implicazioni funzionali del NT sono tuttora poco chiare, anche se le ipotesi a riguardo sono varie. Da studi condotti negli ultimi decenni, emerge un coinvolgimento del NT nel comportamento legato alla riproduzione. Infatti, iniezioni intraventricolari di GnRH in maschi e femmine di criceto, ristabiliscono parzialmente i comportamenti legati all'accoppiamento in soggetti a cui è stato lesionato il sistema vomeronasale (Mackay-Sim et al., 1986; Meredith et al., 1992). Se questo tipo di facilitazione indotta dal GnRH avviene in modo naturale, probabilmente l'origine più accreditata per l'ormone è di natura terminale. Un dato ancor più indicativo è l'aumento di concentrazione di GnRH del NT nei primi venti minuti di corteggiamento in esemplari di sesso femminile di *Taricha granulosa* (Propper and Moore, 1991). Simili variazioni di concentrazione dell'ormone non avvengono in altri distretti encefalici.

Evidenze continue associano il NT a varie funzioni riproduttive: in effetti, del sistema fanno parte fibre contenenti peptidi implicati nello sviluppo e nel comportamento riproduttivo (Demski and Northcutt, 1983; Mackay-Sim and Rose, 1986; Wirsig and Leonard, 1986; Dulka et al., 1987; Schreibman and Margolis-Nunno, 1987; Wirsig, 1987; Propper and Moore, 1991; Meredith and Howard, 1992).

Negli anfibi, fibre del NT sono presenti nella regione ipotalamica. La loro presenza è stata correlata ad un controllo del NT sulla secrezione delle gonadotropine da parte dell'ipofisi mediante il rilascio di GnRH (Muske and Moore, 1988). Supporto all'ipotesi che funzioni dell'ipofisi siano sotto il controllo del NT, è la presenza di fibre immunoreattive al tetrapeptide FMRFa nella ghiandola pituitaria di *Clarias batracus* (Krishna et al., 1992).

Diversi autori hanno imputato al NT funzioni di mediazione delle risposte feromonalì (Demski and Northcutt, 1983). Comunque, tale ipotesi sembra essere poco convincente. Difatti, in seguito a lesioni selettive del NT del pesce rosso, è stato riscontrato che l'animale non perdeva le sue capacità di rispondere agli stimoli dei feromoni sessuali (Fujita et al., 1991). Probabilmente il NT non è il principale mediatore delle risposte feromonalì, ma sembra più verosimilmente coinvolto in cambiamenti a lungo termine correlati con lo sviluppo delle gonadi a risposte all'ambiente esterno (Demski, 1993a). Infatti, le gonadi maschili della torpedo, rispondono direttamente al GnRH (Fasano et al., 1989). Quindi il NT controlla le funzioni delle ghiandole sessuali indirettamente, attraverso la ghiandola pituitaria con la secrezione delle gonadotropine, e direttamente tramite recettori per il GnRH localizzati sulle gonadi.

Il NT presenta fibre nella ghiandola pineale in alcuni teleostei (Schreibman et al., 1987; Ekström et al., 1988). Tale tipo di connessioni può essere particolarmente importante nel modulare la sensibilità della ghiandola interessata al fotoperiodo, con la correlata sintesi e secrezione di melatonina. Quindi il NT sembra implicato nella modulazione della principale sorgente d'informazioni correlate al fotoperiodo, quale la pineale, implicata nella regolazione del ciclo riproduttivo (Demski, 1993b). Alcuni studiosi ritengono che il NT possa essere coinvolto nel controllo dei vasi sanguigni e delle ghiandole del naso per la presenza di fibre del sistema nelle regioni olfattive (Wirsig-Wiechmann, 1993).

Recentemente è stato proposto un modello secondo cui il GnRH di natura terminale attiverrebbe la mucosa olfattiva rendendola più efficace nella percezione dei feromoni coinvolti nella fisiologia riproduttiva (Wirsig-Wiechmann, 2001). In effetti, recettori per il GnRH sono stati individuati sugli olfactory sensory neurons (OSN). Essi sono localizzati principalmente sui corpi cellulari, di rado sui dendriti e mai sulle ciglia.

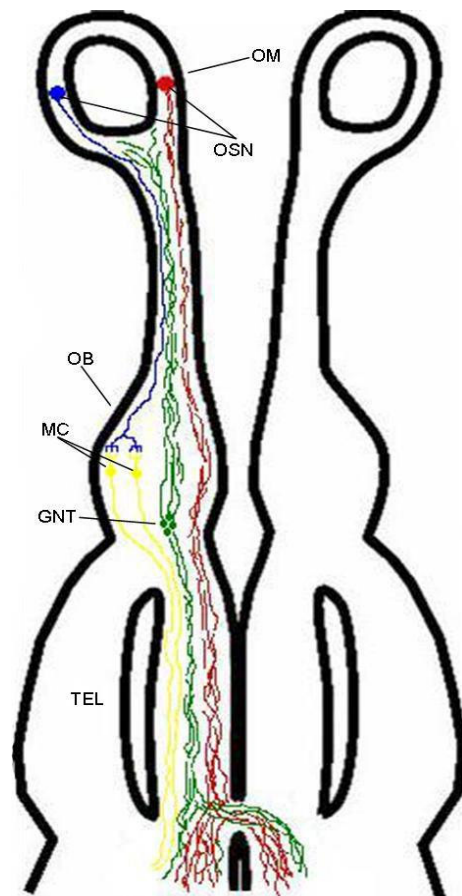


Inoltre, solo una parte degli OSN esprime tali recettori. L'azione del GnRH ha un effetto stagionale che si esplica maggiormente durante il periodo riproduttivo dell'animale. Il legame dell'ormone al recettore induce una cascata di segnale che coinvolge secondi messaggeri ciclici e proteine chinasi (Zhang and Delay, 2007).

## LA SCOPERTA DELL'EBOS

La scoperta del sistema olfattivo accessorio e quella del sistema del NT, avevano procurato non pochi problemi agli studiosi del sistema olfattivo. Numerosi erano, infatti, gli interrogativi riguardo alle competenze funzionali dei due sistemi. Gli studi successivi, morfologici e funzionali, contribuirono alla soluzione di alcuni dei problemi riscontrati, a tal punto che l'armonia di vedute tra i diversi gruppi di ricerca sembrava quasi inverosimile. La situazione, però, si complicò ulteriormente in seguito alla scoperta di una nuova componente del sistema olfattivo: il sistema di fibre olfattive extrabulbari (EBOS; Fig. 5).

Fig. 5 Schema rappresentante il rapporto tra sistema olfattivo principale, NT e EBOS. Gli assoni (in blu) dei neuroni olfattivi sensoriali (OSN) si estendono fino al bulbo olfattivo (OB) dove formano sinapsi con le cellule mitrali (MC). Le fibre olfattive secondarie (in giallo) si estendono, poi, nel cervello. Il NT presenta una rete di fibre (in verde) che si estende tra la mucosa olfattiva (OM) e le regioni ipotalamiche. Sono presenti gangli lungo il suo percorso (GNT). I corpi cellulari dell'EBOS si trovano nella OM (OSN in rosso) e presentano assoni (ancora in rosso) che oltrepassano i OB e non formano sinapsi con le MC.



Nel 1991, Szabo e collaboratori segnalavano che alcune fibre del sistema olfattivo principale, anziché terminare, come di consueto, nei bulbi olfattivi, li attraversavano per invadere profondamente il cervello.

L'idea che il bulbo olfattivo fosse l'unico bersaglio delle fibre originate dai recettori primari della mucosa olfattiva, sembrava decadere (Cajal, 1911). In verità, alcuni autori in precedenza avevano già osservato le fibre del sistema olfattivo extrabulbare iniettando traccianti nella camera olfattiva (Key and Giorgi, 1986a, 1986b) e alcuni avevano considerato l'EBOS come proiezioni olfattive secondarie (Honkanen and Ekström, 1990). Tale osservazione è meno probabile in quanto la recisione del nervo olfattivo provocava la scomparsa dell'EBOS (Denizot et al., 1988). Studi successivi hanno fornito ulteriori evidenze dell'esistenza dell'EBOS, poiché la rimozione della mucosa olfattiva comportava la sua scomparsa (Riddle and Oakley, 1992); ciò ha anche suggerito che i corpi cellulari dell'EBOS erano localizzati nella mucosa.

Il gruppo di Szabo ha anche sottolineato che gli studi precedenti, che descrivevano il NT grazie all'introduzione di traccianti nella mucosa olfattiva, avrebbero, in realtà, rilevato il sistema olfattivo extrabulbare. Naturalmente, una tale osservazione, dopo un certo imbarazzo iniziale, scatenò la reazione dei ricercatori interessati. Questi, nel tentativo di difendere i propri lavori, cercarono di sostenere l'idea che l'EBOS potesse essere considerato parte del sistema terminale.

Quindi, la questione è ancora aperta ed è giusto porsi la domanda se i traccianti posti nella camera olfattiva evidenziano il NT o l'EBOS. Ovvero, è possibile considerare l'EBOS come parte del NT, o viceversa?

## EBOS = NT?

Affinché due componenti strutturali siano considerate equivalenti, esse devono condividere una serie di proprietà. In particolare dovrebbero avere in comune stesse caratteristiche odologiche, proprietà chimiche, morfologiche o almeno qualcuna di queste.

Questa problematica è stata affrontata dettagliatamente nel 1996 da Eisthen e Northcutt in un lavoro sulla lampreda. Grazie a metodi immunostochimici per il GnRH e l'FMRFa, gli autori hanno concluso che negli agnati il NT descritto in precedenza (von Bartheld and Meyer, 1988) era in realtà l'EBOS e che il NT era assente in questo gruppo. Anche Szabo e collaboratori nel 1991 fecero una tale osservazione. Lo studio effettuato era di notevole importanza, in quanto determinava uno spostamento di vedute sostanziale: il NT origina a partire dagli gnatostomi e non è quindi una caratteristica apparsa precocemente nell'evoluzione dei vertebrati. Nello stesso studio, gli autori ribadiscono che l'uso di traccianti nella camera olfattiva permettevano la rilevazione dell'EBOS. Ciò comportava una severa autocritica, in quanto lo stesso Northcutt aveva descritto il NT negli agnati mediante l'uso di traccianti (Northcutt and Puzdrowski, 1988). Malgrado ciò, recenti lavori d'autorevoli gruppi di ricerca rifuggono quest'idea riportando ancora l'EBOS come sub-componente del sistema terminale (Koza and Wirsig-Wiechmann, 2001).

In un recente lavoro su *X. laevis* (Pinelli et al., 2004), sono state utilizzate contemporaneamente due tecniche istologiche: l'immunostochimica per l'FMRFa e l'introduzione di un tracciante, la biocitina, nella mucosa olfattiva. Gli esperimenti sono stati condotti anche durante le fasi di sviluppo del girino. La metodica di doppia colorazione ha permesso di identificare contemporaneamente su una stessa sezione il sistema di fibre olfattive extrabulbari ed il sistema FMRFa-ir. Ad un'attenta analisi, i due sistemi presentavano una sovrapposizione inverosimile, ma, nonostante

ciò, sono risultati entità anatomicamente distinte. In particolare, il NT, visualizzato mediante l'immunoistochimica dell'FMRFa, non presenta connessioni dirette con la mucosa olfattiva, almeno a partire da un certo stadio dello sviluppo larvale. Infatti, è ormai ben noto che molti sistemi di neuropeptidi derivano in parte da cellule che si formano nel placode olfattivo. In seguito, esse migrano proprio attraverso il NT per entrare nel cervello e sistemarsi nelle loro sedi definitive. Alcuni neuroni, però, manifestano una migrazione meno estensiva. Essi rimangono più in periferia, talvolta aggregandosi e costituendo le componenti cellulari e gangliari del sistema terminale. In realtà, in qualche specie di pesce sono stati citati elementi GnRH-ir molto vicini alla mucosa olfattiva, ma solo occasionalmente all'interno di essa negli adulti (Demski, 1993a), e in un solo caso nella mucosa (Biju et al., 2003). Un altro dato importante che conferma l'assenza di connessioni dirette con l'organo olfattivo si ricava da lavori in cui sono poste molecole traccia, nella camera olfattiva, in uno squalo (Hofmann and Meyer, 1995) e nei dipnoi (Shober et al., 1994). Questi sono gli unici due gruppi in cui il NT è indipendente dal complesso olfattivo, quindi è ben visibile alla semplice osservazione istologica. Pertanto, rappresentano un importante controllo positivo per osservare l'eventuale incorporazione del tracciante nel NT dalla mucosa olfattiva, cosa che non è avvenuta in entrambi i casi.

In definitiva, il sistema terminale non origina anatomicamente dalla mucosa olfattiva, diversamente dal sistema EBOS, i cui corpi cellulari sono esclusivamente presenti nella mucosa olfattiva (Wirsig-Wiechmann e Oka, 2002, sostengono che le cellule gangliari del NT nel gourami nano proiettano alla mucosa olfattiva e, ancora, Koza e Wirsig-Wiechmann, 2001, che una sub-popolazione di neuroni del NT in *Xenopus* abbia un comportamento simile). Anche le terminazioni centrali non corrispondono, in quanto il sistema terminale invade con buona probabilità solo

l'ipotalamo, mentre l'EBOS presenta campi terminali più vari, incluso il telencefalo e persino il mesencefalo.

Un'altra differenza sostanziale tra EBOS e NT è d'ordine morfologico: mentre il primo non presenta cellule lungo il suo percorso, il sistema terminale possiede corpi cellulari, talvolta organizzati in gangli, lungo tutta la sua estensione. I traccianti retrogradi dimostrano questa caratteristica.

C'è, infine, da tenere in conto che i due sistemi presentano anche differenti proprietà chimiche. Infatti, l'EBOS non esprime l'FMRFa e neanche il GnRH (von Bartheld et al., 1988). Per contro esprime l'agglutinina della soia (Hofmann and Meyer, 1991b) che non è rilevabile sulle componenti del sistema terminale.

In conclusione, da quanto detto è opportuno considerare l'EBOS e il NT come strutture completamente separate. Se i lavori sul NT che hanno utilizzato traccianti neuronali fossero interpretati nuovamente tenendo in considerazione l'EBOS, avrebbero un notevole valore dal punto di vista neuroanatomico.

L'apparente mancanza di un EBOS nella stragrande maggioranza degli amnioti, ha condotto a formulare l'ipotesi che questo sistema possa essere coinvolto nella percezione di sostanze disciolte in acqua. Tale ipotesi trova sostegno in *Xenopus laevis* in cui il sistema olfattivo è composto da due sub-componenti: un naso acquatico (water-nose) ed un naso aereo (air-nose), devoluti rispettivamente alla percezione di odori in ambiente acquatico e in ambiente aereo (Föske, 1934; Altner, 1962). Studi con traccianti (Weiss, 1986; Hofmann and Meyer, 1989a, b; Schmidt et al., 1988), lectine (Key and Giorgi, 1986a, 1986b; Hofmann and Meyer, 1991b) e con istochimica per NADPH-diaforasi (Hofmann and Meyer, 1991a) hanno, di fatto, evidenziato la componente extra-bulbare di fibre olfattive primarie, sottolineandone l'origine dalle cellule recettoriali situate nella porzione laterale della cavità nasale (water-nose) devoluta appunto

alla percezione di sostanze disciolte in acqua. In effetti, eccetto che in embrioni (Santacana et al., 1992) e adulti di ratto (Monti-Graziadei, 1992) e in neonati e giovani anafidi (von Bartheld et al., 1987; Meyer et al., 1987), un EBOS è stato consistentemente descritto solo in specie totalmente (es. Teleostei) o parzialmente (es. Anfibi) acquatiche.

## SCOPO DELLA RICERCA

La scoperta di due nuovi sistemi di fibre, probabilmente correlati funzionalmente alla chemiorecezione, ha accresciuto, indubbiamente, le conoscenze sul sistema olfattivo, ma, altresì, ha posto una serie d'interrogativi di carattere morfologico e funzionale. In particolare, è piuttosto arduo assegnare competenze e limiti funzionali in alcune specie a quattro componenti neuronali coinvolte funzionalmente nella percezione olfattiva. D'altronde, lo studio inerente le implicazioni funzionali di un sistema non può prescindere dalla sua caratterizzazione morfologica. Tuttavia, l'approccio morfologico offre non poche difficoltà, in quanto il NT e l'EBOS sono anatomicamente contigui. Infatti, i due sistemi risultano, molto spesso, difficilmente distinguibili a tal punto che alcuni autori hanno confuso l'EBOS con il NT, prima che lo stesso EBOS fosse scoperto (Demski and Northcutt, 1983; Meyer et al., 1987; von Bartheld et al., 1987).

Al momento non esiste un quadro neuroanatomico sufficientemente chiaro da evidenziare la correlazione esistente tra i due sistemi e tra questi e il sistema olfattivo primario ed accessorio (ove presente). Di conseguenza, sono di difficile interpretazione anche le loro competenze funzionali. Risulta, quindi, evidente la necessità di studi morfologici tesi a chiarire la morfologia dei due sistemi; in tal modo si può comprendere il loro coinvolgimento funzionale, mediante studi fisiologici mirati e definire il processo evolutivo che ha condotto alla costituzione degli stessi.

Il presente lavoro si propone di eseguire un'analisi neuroanatomica dei due sistemi di fibre in due classi di vertebrati, pesci e anfibi. Il loro studio è stato affrontato mediante l'utilizzo di tecniche immunostochimiche e l'impiego di traccianti neuronali in modo da descriverne la morfologia.

In particolare, lo studio ontogenetico del complesso dei nervi cranici anteriori è stato particolarmente appropriato negli anfibi in cui la



metamorfosi, in molte specie, determina un cambiamento nell'uso dell'olfatto dall'ambiente acquatico a quello aereo. A tale proposito, *Xenopus laevis* è un modello sperimentale particolarmente idoneo, in quanto il suo sistema olfattivo primario si suddivide in un “naso aereo” ed un “naso acquatico” (Föske, 1934; Altner, 1962).

D'altro canto, i teleostei rappresentano un gruppo di osteitti che ha subito un'estesa radiazione adattativa, mostrando una notevole plasticità encefalica intergruppo; inoltre, in varie specie sono stati descritti sia il NT sia l'EBOS. Pertanto essi rappresentano dei validi modelli sperimentali per analizzare contemporaneamente le strutture nervose in esame.

La scelta di tali modelli sperimentali ha permesso l'analisi di organismi che vivono in ambienti differenti, così da poter valutare le eventuali differenze tra il sistema EBOS e quello del NT. Gli anfibi, inoltre, rivestono un'importanza particolare in quanto rappresentano la transizione evolutiva e spesso ontogenetica tra l'ambiente acquatico e quello terrestre.

L'analisi ontogenetica dei due sistemi olfattivi secondari ha evidenziato la loro origine dal placode olfattivo (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Whitlock et al., 2003). Quest'organo, negli anfibi, da origine alla formazione delle camere olfattive transitorie del girino e definitive del neometamorfosato. In queste cavità alloggia la mucosa olfattiva e quella vomeronasale. Da alcuni neuroni della mucosa olfattiva, si dipartono le fibre dell'EBOS (Pinelli et al., 2004; Gaudin and Gascuel, 2005); inoltre, la funzionalità della stessa mucosa è, in qualche modo, influenzata dal NT (von Bartheld, 2004; Zhang and Delay, 2007). Quindi, allo scopo di approfondire le conoscenze sull'eventuale distinzione tra componenti EBOS e NT è stato effettuato uno studio sull'ontogenesi degli organi olfattivi. In particolare si è inteso studiare la morfogenesi delle componenti olfattive per valutare i differenti pattern temporali di proliferazione durante lo sviluppo, per tentare d'individuare precocemente i neuroni che danno

origine alle fibre dell'EBOS e del NT. Non sono disponibili marker specifici per il sistema EBOS, quindi è stato utilizzato l'antigene nucleare di proliferazione cellulare, che almeno permette di distinguere le cellule in attiva proliferazione cellulare (Tetè et al., 2000). La presenza di eventuali differenze temporali nella differenziazione delle componenti olfattive, è stata poi correlata con lo sviluppo dei sistemi di fibre in esame.

## MATERIALI E METODI

## ***Animali***

Gli organismi utilizzati nel presente studio sono stati i seguenti: *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *Paracheiroidon innesi*, *Astyanax fasciatus mexicanus*, teleostei appartenenti alla famiglia Characidae, ordine Characiformes; *Carassius auratus*, teleosteo appartenente alla famiglia Cyprinidae, ordine Cypriniformes; *Xenopus laevis*, anuro appartenente alla famiglia Pipidae; *Rana esculenta*, anuro appartenente alla famiglia Ranidae.

I teleostei sono stati acquistati da un rivenditore autorizzato e tenuti in vasche delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm, con adeguato sistema di filtrazione e termoregolazione.

Ovature di *Xenopus laevis*, gentilmente donate dal laboratorio della prof. Chiara Campanella dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", sono state allevate in vasche delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm, in assenza di sistema di filtrazione e alla temperatura di 24°C e n'è stato seguito lo sviluppo.

Ovature di *Rana esculenta* sono state prelevate in campo in prossimità delle foci del fiume Sele, in provincia di Salerno. Le uova sono state allevate in vasche delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm con adeguato sistema di filtrazione e alla temperatura di 19°C e n'è stato seguito lo sviluppo.

Gli animali utilizzati sono stati trattati secondo le linee guida internazionali.

## ***Prelievi***

Per il prelievo dell'encefalo e delle capsule olfattive, tutti gli animali sono stati anestetizzati in una soluzione 0,1% di tricaina metansulfonato (MS222, Sigma) ed in seguito sono stati sacrificati per decapitazione.

Nel caso dei teleostei ed embrioni di anfibi, i campioni sono stati immersi direttamente nella miscela di fissativo previa dissezione. Per gli adulti di anfibi, invece, la fissazione dei tessuti è stata effettuata mediante perfusione.

Per gli anfibi, sono stati eseguiti campionamenti a diversi stadi di sviluppo. Nel caso di *Rana esculenta*, i prelievi sono stati effettuati in accordo alla tavola di sviluppo di Witschi (1956); per *Xenopus laevis*, i campionamenti sono stati effettuati in accordo alla tavola di sviluppo di Nieuwkoop e Faber (1956).

### ***Fissazione***

In seguito a numerose prove preliminari utilizzando una vasta gamma di fissativi, sono state scelte, per la fissazione dei campioni, due tipi di miscele di fissativo: il fluido di Bouin (acido picrico, aldeide formica al 40% e acido acetico glaciale nel rapporto di 15:5:1) e la paraformaldeide (PFA) in soluzione al 4% in PBS, tampone fosfato salino, 0.1M pH 7.4.

I campioni destinati all'inclusione in paraffina sono stati fissati con fluido di Bouin per 24 ore; la PFA è stata adoperata per i campioni congelati per il taglio al criostato e per quelli destinati all'applicazione dei traccianti neuronali, con una fissazione di 4 ore a 4°C.

### ***Inclusione e Taglio***

#### ***Preparati per il taglio al microtomo***

In seguito alla fissazione in Bouin per 24 ore, i campioni sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi quotidiani in alcool (Carlo Erba Reagenti) 75% perpetuati fino all'allontanamento del fissativo in eccesso.

In seguito, sono stati inclusi in paraffina.

Si riporta di seguito schematicamente le fasi di tale processo:

1. Passaggio in alcool etilico 75% 1 X 15 min.
2. Passaggio in alcool etilico 85% 1 X 15 min.
3. Passaggio in alcool etilico 95 % 2 X 15 min.
4. Passaggio in alcool etilico 100% 2 X 15 min.
5. Chiarificazione in xilene (Carlo Erba Reagenti) 2 X 30 min.
6. Passaggi in paraffina (Paraplast, Bio-Optica) 3 X 60 min. in stufa a 58°C sottovuoto.
7. Immersione del campione in paraffina liquida in appositi stampi.

Il passaggio nella serie ascendente degli alcool garantisce la disidratazione del pezzo, necessaria per l'inclusione in paraffina, la cui natura è prettamente idrofoba (miscela di idrocarburi insaturi ad alto peso molecolare con formula generale  $C_nH_{2n+2}$  con  $21 < n < 34$  ).

La chiarificazione ha lo scopo di allontanare l'alcool, polare, dal tessuto, sostituendolo con un solvente apolare della paraffina. L'agente chiarificante deve possedere delle caratteristiche tali che lo rendano perfettamente miscibile con l'alcool idrofilico e con la paraffina, idrofobica.

Dopo la solidificazione della paraffina, si può procedere al taglio. Il blocchetto di paraffina in cui è incluso il campione, è stato appoggiato su un supporto porta-preparato del microtomo.

Il taglio del campione è stato eseguito in modo da ottenere delle sezioni di uno spessore di 7-10  $\mu\text{m}$ . Il film di sezioni è stato posto su un vetrino porta-oggetti inondato con un'aliquota di albumina glicerinata (albume d'uovo e glicerina nel rapporto di 1:1). La soluzione d'albumina glicerinata è stata preparata diluendo 3-4 gocce della miscela albume-glicerina in 100 ml di  $H_2O$  distillata. Il vetrino con le sezioni è stato posto su una piastra riscaldata a 37°C. Questo processo favorisce la distensione del campione e la sua adesione al vetrino.

### *Preparati per il taglio al criostato*

Prima del congelamento dei campioni, sono stati eseguiti dei lavaggi in PBS 0.1 M pH 7.4, in modo da allontanare il fissativo in eccesso. In seguito, i campioni sono stati crioprotetti overnight in una soluzione di saccarosio (Merck) alla concentrazione del 30% in PBS 0.1M pH 7.4 a 4°C. Il giorno successivo, sono stati inclusi in Tissue-Tek (Bio-Optica) e congelati a -24°C. I campioni sono stati tagliati secondo vari piani (sagittali, trasversali e/od orizzontali), prediligendo però il piano di taglio orizzontale, poiché è quello più utile per osservare i rami del NT marcati con FMRFa. Sezioni consecutive di spessore variabile tra 14 e 16 µm, sono state fatte aderire su vetrini portaoggetto Super Frost Plus (Bio-Optica). I vetrini sono stati lasciati asciugare all'aria per circa due ore e in seguito utilizzati o conservati a -20°C.

### *Preparati per il taglio al vibratomo*

I campioni fissati in PFA sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi in PBS 0.1M pH 7.4, in modo da allontanare il fissativo in eccesso, prima di essere inclusi in agarosio (4% in acqua bidistillata). Le sezioni, dello spessore di 30-80 µm, sono state poste su vetrini portaoggetti inondati con PBS 0.1M pH 7.4, e di seguito osservate al microscopio.

### *Analisi immunoistochimica*

Rappresenta di certo il metodo d'elezione per la rivelazione intra- ed extra-cellulare di sostanze. Essa si basa sul principio di combinare la sensibilità e la specificità dell'interazione antigene-anticorpo con la possibilità di individuare tale interazione attraverso l'impiego di markers opportuni. I markers utilizzati sono enzimi (perossidasi, fosfatasi), isotopi radioattivi, fluorofori e markers elettrodomensurabili (ferritina, oro colloidale).

I metodi di rilevazione possono essere:

- Diretti: il marker è coniugato direttamente all'anticorpo responsabile del riconoscimento dell'antigene.
- Indiretto: il marker è coniugato ad un altro anticorpo, detto secondario, che riconosce specificamente l'anticorpo (in questo caso detto primario) legato all'antigene.

Il metodo qui adoperato è quello indiretto (Fig. 6). Il marker è la perossidasi di rafano (HRP, horseradish peroxidase).

Il procedimento di colorazione immunoistochimica adoperato è stato il seguente:

1. Sparaffinatura in xilene 2 X 40 min.
2. Reidratazione del campione mediante passaggi di 5 min. ciascuno, in una serie decrescente di alcool (2 X 100%, 2 X 95%, 1 X 85%, 1 X 75%).
3. Passaggio in H<sub>2</sub>O distillata 1 X 5 min.
4. Passaggio in PBS 0.1M pH 7.4, 0.1% Triton X-100 (Sigma) (PBS-T) 2 X 10 min.
5. Incubazione con normal serum (Pierce), di capra o di cavallo in funzione dell'anticorpo secondario utilizzato, diluito 1:50 in PBS-T per 20 min. in camera oscura a temperatura ambiente.
6. Si aspira il normal serum e s'incuba con antisiero primario, over night in camera oscura a 4°C. L'antisiero diretto contro il tetrapeptide FMRFa (Phoenix) è stato utilizzato alla concentrazione di 1:10000, in PBS-T. L'antisiero contro l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (Dako) è stato utilizzato alla concentrazione di 1:30000, in PBS-T.
7. Lavaggi in PBS-T, 4 X 5 min.
8. Incubazione con anticorpo secondario (Pierce) (anti-rabbit o anti-mouse in funzione dell'anticorpo primario utilizzato) biotinilato anti IgG 1:200, in PBS-T per 60 min. a temperatura ambiente in camera oscura.
9. Lavaggi in PBS-T, 4 x 5 min.



10. Incubazione con streptavidina coniugata con perossidasi di rafano (Pierce) 1:200, in PBS-T, per 60 min. a temperatura ambiente in camera oscura.
11. Lavaggi in PBS-T, 4 X 5 min.
12. Passaggio in Tris-HCl (Merck) 0.1 M pH 7.4 2 X 5 min.
13. Incubazione con diamminobenzidina (DAB) (Sigma) 1 X 2-5 min.
14. Lavaggi in H<sub>2</sub>O distillata, 2 X 5 min.
15. Disidratazione del campione mediante passaggi di 5 min. ciascuno, in una serie crescente di alcool (1 X 75%, 1 X 85%, 2 X 95%, 2 X 100%).
16. Passaggio in Bioclear (Bio-Optica) 2 X 20 min.
17. Montaggio in Permount (Nova, Pertex).

Dopo tale procedimento, si lasciano asciugare i vetrini. Solo in seguito si può procedere all'osservazione al microscopio ottico.

La reidratazione del campione è necessaria a causa della natura acquosa delle soluzioni coloranti.

L'incubazione con il siero normale, ottenuto dall'animale nel quale è stato ottenuto l'anticorpo secondario, minimizza le interazioni aspecifiche dell'anticorpo secondario con il tessuto. Infatti, bisogna considerare che l'anticorpo secondario è policlonale, costituito in altre parole da popolazioni di IgG ciascuna delle quali interagisce con epitopi specifici. Quindi, c'è una certa probabilità che l'anticorpo secondario possa interagire con epitopi presenti nel tessuto, causando delle false colorazioni. Le IgG del siero normale occupano i potenziali siti d'interazione con l'anticorpo secondario. Siccome il siero normale non è biotinilato, ad esso non potrà legarsi la streptavidina coniugata con la perossidasi, e quindi non sarà rivelata la sua presenza.

Gli anticorpi primari utilizzati in questo studio sono stati adoperati ad una diluizione ottimale. Infatti, sono state eseguite delle prove a diverse

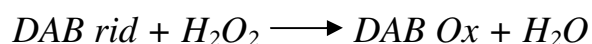
diluizioni su sezioni seriali in modo da poter valutare la migliore diluizione possibile.

Dopo l'incubazione con anticorpo primario, segue quella con l'anticorpo secondario. Quest'ultimo è coniugato con la biotina (vitamina H), molecola con alta affinità per l'avidina o la streptavidina. Infatti, successivamente segue una incubazione con streptavidina coniugata con più molecole di perossidasi di rafano.

Il sistema qui descritto è detto indiretto. N'esiste anche uno diretto in cui il marker è coniugato direttamente all'anticorpo primario.

Il metodo diretto è più specifico ma meno sensibile. Quello indiretto è meno specifico ma più sensibile: c'è un'amplificazione del segnale dovuta al fatto che la molecola dell'anticorpo primario può essere riconosciuta da più molecole di anticorpo secondario il quale a sua volta è coniugato con più molecole di perossidasi.

La perossidasi catalizza la reazione che prevede l'ossidazione della DAB, substrato appunto dell'enzima. La reazione (non bilanciata) è la seguente:



La diamminobenzidina deidrogenata (ossidata) che si forma, precipita nei siti in cui si trova l'enzima senza che ci sia il rischio che possa diffondere in altre zone del tessuto. In questo modo si ha una colorazione marrone che evidenzia indirettamente la presenza dell'antigene. Dopo l'incubazione con DAB, si procede ad un lavaggio e ad una disidratazione. Il montaggio in Permount e l'uso di vetrini coprioggetto, garantisce la conservazione del preparato per un lungo periodo. Dopo il montaggio, si può procedere all'osservazione al microscopio ottico.

La specificità della reazione immunostochimica è garantita dai seguenti controlli:

1. Omissione dell'anticorpo primario.

2. Omissione dell'anticorpo primario e di quello secondario.
3. Preassorbimento omologo.

L'omissione dell'anticorpo primario prevede che non ci sia riconoscimento dell'antigene e quindi la sua rilevazione. La sezione che subisce l'omissione del primario è comunque incubata con il secondario secondo il normale processo. Un'altra sezione subisce anche l'omissione del secondario per controllarne la sua specificità (ottimizzata con il trattamento delle sezioni con il siero normale come visto in precedenza).

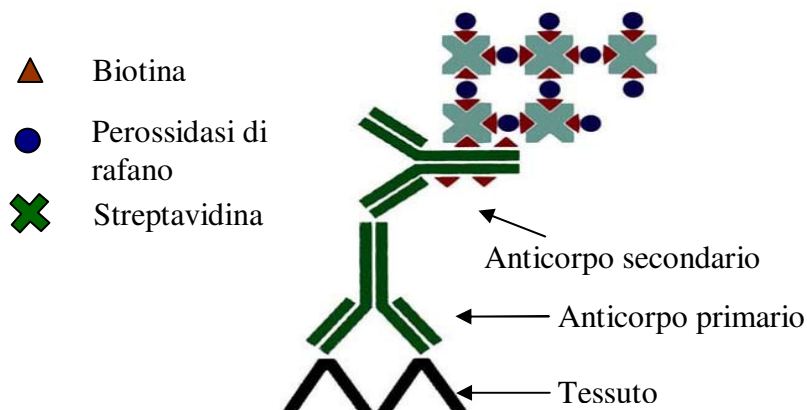


Fig. 6 Metodo con il complesso streptavidina-biotina.

Gli antisieri primari utilizzati nel presente studio sono l'anti-FMRFa e l'anti-PCNA. Essi sono stati scelti in conformità a determinate caratteristiche: il primo è un noto marker del sistema del NT (Stell et al., 1984; Ekström et al., 1988; Muske and Moore, 1988; Wirsig-Wiechmann and Basinger, 1988; Osthalm et al., 1990; Uchiyama, 1990; Wirsig-Wiechmann, 1990; Krishna et al., 1992; D'Aniello et al., 1996; Wright and Demski, 1996; Oelschläger et al., 1998); l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) è utilizzato come marcatore delle cellule in attiva proliferazione (Tetè et al., 2000).

### ***L'FMRFa***

L'FMRFa (Phe-Met-Arg-Phe-ammide) è un tetrapeptide originariamente isolato e caratterizzato nel sistema nervoso di un mollusco, *Macrocallista nimbosa* (Price and Greenberg, 1977a, b). In seguito, questo neuropeptide è stato localizzato in altri generi di molluschi come *Lymnea* (Boer et al., 1980); *Helix* (Cottrell, 1978; Price, 1982); *Aplisia* (Weiss et al., 1984; Leheman et al., 1984); *Bulla* (Jacklet et al., 1987); *Sepia* (Le Gall et al., 1988); e in altri invertebrati (Boer et al., 1980; Grimmelikhuijzen et al., 1982; Grimmelikhuijzen, 1983; Watson and Groome, 1984; Kobierski et al., 1987; Brownlee et al., 1993; Gaus et al., 1993). La presenza di materiale FMRFa-simile è stata dimostrata anche nel sistema nervoso di molte specie di vertebrati, dai ciclostomi ai mammiferi. Materiale FMRFa-simile è stato anche ritrovato nel tratto gastrointestinale e nel pancreas di alcuni vertebrati (Boer et al., 1980; Josse and Gerearts, 1983; Greenberg et al., 1985), nei bottoni gustativi e nel labirinto carotideo di alcuni anfibi (Kawakami et al., 1998; Kusakabe et al., 1995). Alcuni studi biochimici hanno dimostrato la presenza di peptidi FMRFa-simili, ma strutturalmente varianti, nei molluschi. In *Limnea stagnalis* sembrerebbero essere presenti ben otto forme distinte di peptidi con struttura simile all'FMRFa (Ebberink et al., 1987). Queste osservazioni suggeriscono che esiste una "famiglia" di peptidi di questo tipo nel regno animale, ma solo pochi di essi sono stati isolati e sequenziati in gruppi diversi dai molluschi. Dal cervello dei vertebrati sono state isolate e sequenziate quattro forme di FMRFa. Diversi anni or sono, dal sistema nervoso centrale di bovino, sono state identificate due forme molecolari: FLFOPORFamide (F8Famide) e il AGEGLSSPFWSLAAPORFamide (A18Famide), (Yang et al., 1985) e più recentemente è stata dimostrata la presenza di forme simili a queste anche nel pesce rosso (Kyle et al., 1995; Fisher et al., 1996). L'LPLRFamide, invece, fu isolato dal cervello degli uccelli (Dockray et al., 1983) e un

quarto RFamide (SPEIDPFWYVGRGVRPIGRFamide) è stato isolato e sequenziato recentemente dal tessuto nervoso di una specie di carpa (Fujimoto et al., 1998). Si può facilmente verificare che le strutture di tutti questi peptidi differiscono sostanzialmente da quella del FMRFa isolato inizialmente in *Macrocallista nimbosa* (Price and Greenberg, 1977a); tuttavia, essi hanno in comune con il tetrapeptide sempre la sequenza C-terminale, Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. Similitudini piuttosto marcate sono presenti anche con la Met-enkefalina-(Arg-Phe) ma, in questo caso il caratteristico gruppo amminico, necessario per l'attività biologica e probabilmente anche per l'immunoreattività, è assente. Attualmente, le relazioni evolutive tra tutti questi peptidi restano poco chiare.

### ***L'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA)***

La PCNA, è una proteina di 36 kDa ausiliaria della polimerasi delta del DNA. I livelli di PCNA aumentano durante la fase G1 e la fase S e diminuiscono nella fase G2 (Tetè et al., 2000), anche se la proteina, ha una lunga emivita e può, perciò essere riscontrata anche in cellule che hanno già terminato il loro ciclo riproduttivo. Successivi studi hanno rilevato la sua sorprendente abilità nell'interagire con molteplici partner, coinvolti in parecchie vie metaboliche tra cui la formazione di frammenti d'Okazaki, la riparazione del DNA, la metilazione, la riorganizzazione della cromatina e la regolazione del ciclo cellulare (Waga et al., 1994). Appartiene alla famiglia delle proteine che scorrono sul DNA, le quali svolgono una funzione essenziale nel coadiuvare la polimerasi replicativa, conferendo un'alta processività necessaria per duplicare un intero genoma. La PCNA ha una struttura quaternaria costituita da tre monomeri identici, formati ciascuno da due domini simili uniti in un legame testa coda a formare un omotrimerico. Quest'ultimo è quindi composto da sei domini ripetuti e mostra sei ripiegamenti. La struttura ad anello che ne risulta ha due superfici non equivalenti: una faccia esterna composta da ripiegamenti

beta, uno strato di alfa eliche ricco di residui basici che rivestono il lato interno dell'anello; questi residui sono posizionati perpendicolarmente ai gruppi fosfato del DNA. Questa struttura permette alla PCNA di legarsi alla doppia elica, circondandola, e di muoversi liberamente lungo essa. In questo modo la PCNA, come anche i suoi omologhi, incrementano l'attività della polimerasi mediante l'aggancio, nell'interazione proteina-proteina, con la sua superficie esterna e il legame al DNA. Questa proprietà della PCNA previene inoltre la dissociazione della polimerasi mentre avanza lungo il DNA aperto. Le caratteristiche molecolari fanno della PCNA un ottimo marker per le cellule in fase di sintesi che prelude alla divisione cellulare. Pertanto, l'utilizzo dell'immunoistochimica per questa molecola consente di evidenziare cellule in attiva proliferazione e quindi può essere un valido strumento per studi morfologici su tutti i tessuti.

### ***Applicazione di traccianti neuronali***

L'utilizzo di questa metodologia sperimentale si basa su un principio comune: un'aliquota di tracciante neuronale è applicata in una specifica regione del cervello, ai corpi neuronali e/o ai loro prolungamenti. In seguito, in base al tipo utilizzato, le molecole di tracciante migrano fruendo del flusso assonale o della natura lipofilica delle membrane cellulari. Il trasporto del tracciante può avvenire in senso anterogrado o retrogrado rispetto al corpo cellulare del neurone (Fig. 7).

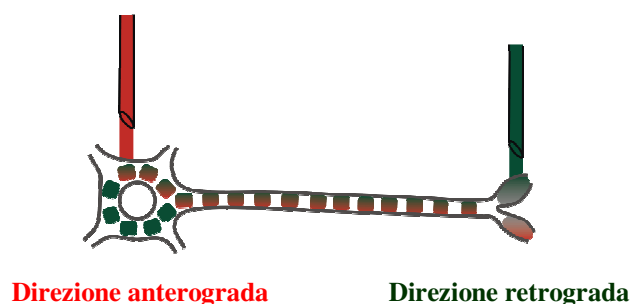


Fig. 7 Sistema di trasporto anterogrado e retrogrado dei traccianti.

### *Applicazioni di biocitina*

La biocitina è un derivato della biotina comunemente utilizzato quale tracciante neuronale anterogrado in animali vivi; essa è inglobata dalle cellule attraverso un meccanismo di pinocitosi in quanto la sua elevata polarità ne impedisce il passaggio attraverso la membrana plasmatica per semplice diffusione. Dopo essere stata incorporata dalle cellule localizzate nel punto d'applicazione, la sua migrazione è garantita dal trasporto assonale. Per le sue caratteristiche, la biocitina non può attraversare le sinapsi; in conseguenza di ciò, la migrazione del tracciante si interromperà in corrispondenza delle terminazioni nervose.

In questo studio la biocitina (Molecular Probes, Invitrogen) è stata applicata in cristalli direttamente nelle narici servendosi di un sottile ago. Prima dell'applicazione i campioni sono stati anestetizzati.

Per i teleostei, è stato utilizzato un sistema che garantisce di mantenere l'animale in anestesia totale per l'intera durata dell'esperimento. Quindi, i pesci sono stati collocati in una particolare vaschetta, con un sistema di tubi che portava una soluzione di anestetico alle branchie attraverso la bocca (Schema 1). In questo modo, i campioni sono stati tenuti in vita per l'intera durata della migrazione della biocitina, in pratica per un tempo di quattro ore. I cervelli sono stati, poi, rimossi, immersi in PFA 4% in PBS 0.1M pH 7.4 per 4h a 4°C e crioprotetti in saccarosio prima del congelamento.

Per gli anfibi, in seguito all'anestesia e all'applicazione del tracciante, i campioni sono stati collocati su capsule Petri e posti su ghiaccio per quattro ore. Anche in questo caso, i cervelli sono stati rimossi, immersi nel medesimo fissativo utilizzato per i teleostei per quattro ore a 4°C e crioprotetti prima del congelamento.

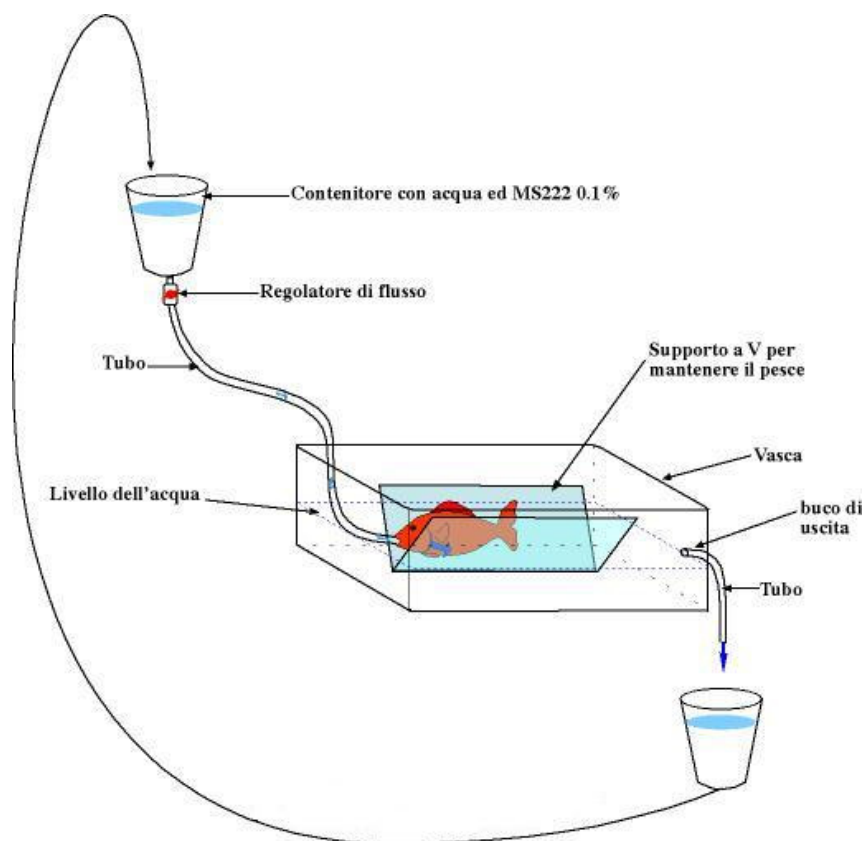
Dopo il taglio al criostato, i campioni sono stati sottoposti ad analisi immunohistochimica per l'FMRFa secondo lo schema di seguito riportato:

1. Passaggi in acqua distillata 2 x 5 min.

2. Passaggi in PBS 0.1M 2 x 10 min.
3. Incubazione in normal goat serum (Pierce) 1:50 per 20 min. in camera oscura a temperatura ambiente.
4. Si aspira il normal serum e si procede all'incubazione con antisiero anti-FMRFa (Phoenix) diluito 1:5000 in una soluzione contenente normal goat serum 1:100, Triton x-100 1% (Sigma) e albumina di siero di bovino (BSA, Sigma) a 4°C over night in camera umida.
5. Lavaggi in PBS-T, 4 x 5 min.
6. Incubazione con antisiero anti IgG di coniglio coniugato con fluoresceina (Pierce) 1:200 per 60 min. in camera oscura a temperatura ambiente.
7. Lavaggi in PBS-T, 4 x 5 min.
8. Incubazione con streptavidina coniugata con texas red (Pierce) 1:200 per 60 min. in camera oscura a temperatura ambiente.
9. Lavaggi in PBS-T, 4 x 5 min.
10. Montaggio con una soluzione PBS 0.1M pH7.4/Glicerolo nel rapporto di 1:1.

La streptavidina ha affinità per la biocitina e si legherà ad essa durante il procedimento. Come descritto nel procedimento, la streptavidina e l'anticorpo secondario presentano fluorocromi diversi. In questo modo, i sistemi di fibre in cui è avvenuta la migrazione della biocitina, e gli elementi immunoreattivi all'FMRFa avranno una marcatura di colore diverso nel momento in cui saranno osservati al microscopio ad epifluorescenza. Ciò sarà utile per discriminare, eventualmente, il sistema EBOS, evidenziato con la migrazione della biocitina, da quello del NT, rivelato mediante l'immunoistochimica per il tetrapeptide FMRFa.





Schema 1 Sistema per l'applicazione della biocitina in pesci.

### *Applicazione di cristalli di carbocianina (DiI/DiA)*

I traccianti lipofilici, tra cui DiI (1, 1' dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato, carbocianina lipofilica) e DiA (4,4'-diesaacileaminostiril-N-metilpiridin iodato, aminostirile lipofilica) (Fig. 8), sono tra quelli neuronali più diffusi; possono essere utilizzati in cellule vive e fissate. Essi non hanno una direzione preferenziale di diffusione per cui sono utilizzati sia come traccianti anterogradi che retrogradi.

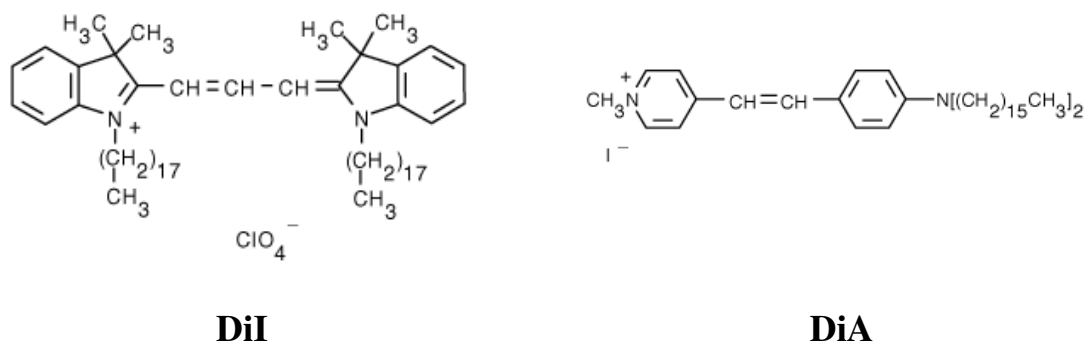
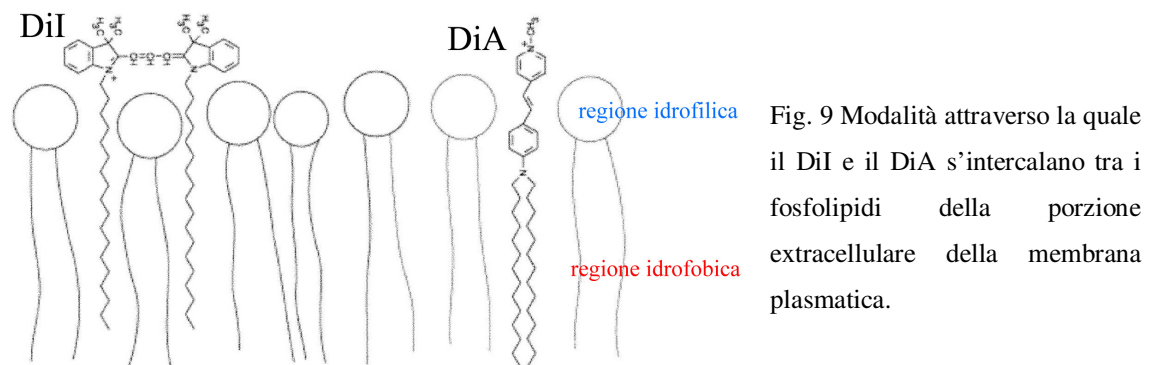


Fig. 8 Formula di struttura del DiI e del DiA.

La migrazione di tali coloranti nelle cellule avviene attraverso le membrane plasmatiche (Fig. 9), le quali rappresentano una via di passaggio efficace. Le cellule sono in grado di sopportare un'elevata concentrazione del colorante e la diffusione laterale del colorante all'interno della membrana assicura la colorazione della cellula intera, anche quando il colorante è applicato localmente. Queste proprietà hanno reso i coloranti a base di carbocianina particolarmente utili in neuroanatomia, anche per lo studio di percorsi neuronali particolarmente lunghi.



Dopo fissaggio in PFA al 4%, acido etilenediamminotetracetico (EDTA) 0,1% in PBS 0.1M pH 7.4, per 4-6 h, i cervelli sono stati utilizzati per l'applicazione del tracciante.

Nei Teleostei, cristalli di DiI e DiA (Molecular Probes, Invitrogen) sono stati applicati alla mucosa olfattiva, leggermente danneggiata meccanicamente, o al nervo olfattivo reciso mediante l'utilizzo di un ago. Prima dell'applicazione, l'encefalo, escluso il punto d'applicazione del tracciante, è stato ricoperto con gocce della soluzione di agarosio al 4% in modo da evitare che le sottili polveri del tracciante potessero contaminare altre aree encefaliche con il risultato di falsi positivi. Dopo l'applicazione, anche il punto di applicazione del tracciante è stato coperto con agarosio.

Per *Rana esculenta* è stato seguito il medesimo procedimento, con l'applicazione dei traccianti a diversi stadi di sviluppo. Cristalli di DiI sono stati direttamente applicati alla superficie della mucosa olfattiva,

leggermente danneggiata meccanicamente, o alla superficie del nervo olfattivo reciso con l'aiuto di un sottile ago.

Per quanto riguarda lo *Xenopus laevis*, per una marcatura anterograda, il DiI è stato applicato a vari campioni a diversi stadi con le stesse modalità di cui sopra. Gli stessi stadi sono anche stati utilizzati per la marcatura retrograda. In questo caso il tracciante è stato applicato dopo aver effettuato un taglio trasversale in corrispondenza della commessura anteriore e/o chiasma ottico. Il sito d'applicazione è stato accuratamente preparato riducendo al minimo il deterioramento del tessuto. Cristalli di DiI o di DiA, sono stati direttamente applicati alla superficie trasversale di taglio del telencefalo con l'aiuto di un sottile ago (Fig. 10).

In tutti i casi, i campioni sono stati conservati in fissativo a 4°C per 4/5 settimane. Il tempo d'incubazione tiene conto della velocità di migrazione del tracciante, in quanto un tempo di migrazione breve può dar origine a marcature incomplete. La velocità di migrazione dei traccianti lipofilici è di circa 500 µm a settimana.

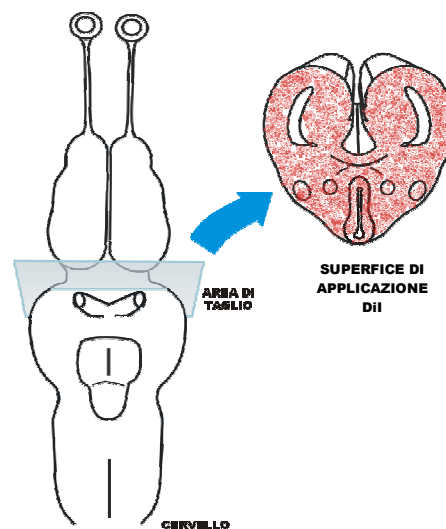


Fig. 10 Schema dell'applicazione di DiI per marcatura retrograda.

Trascorso il tempo di migrazione previsto, sono stati eseguiti diversi lavaggi in PBS 0.1M pH 7.4, ed i campioni sono stati inclusi in una

soluzione acquosa d'agarosio al 4% per il taglio al vibratomo. Sezioni orizzontali dello spessore di 30-80  $\mu\text{m}$  sono state immediatamente montate in PBS 0.1M pH 7.4, su vetrini portaoggetti per essere osservate e fotografate.

### ***Osservazione e fotodocumentazione***

Tutti i preparati ottenuti dalle procedure sperimentali sopra descritte sono stati osservati mediante l'utilizzo di un microscopio ottico e ad epifluorescenza Leica DMBL dotato di fotocamera digitale Canon Power Shot S50. Le immagini digitali sono state acquisite come JPEG files e migliorate in luminosità e contrasto utilizzando il programma Adobe Photoshop CS. Gli schemi grafici dei cervelli sono stati ottenuti in camera lucida. La successiva grafica e composizione delle foto è stata effettuata mediante il programma CorelDraw 12.

## RISULTATI

## TELEOSTEI

### *Analisi della distribuzione di materiale FMRFa-ir nell'encefalo del teleosteo Moenkhausia sanctaefilomenae.*

L'encefalo di questa specie ha bulbi olfattivi (OB) in stretta continuità con il pallio, di conseguenza essi presentano una condizione sessile.

Due nuclei di neuroni caratterizzano il sistema FMRFa-ir telencefalico. Si tratta di cellule immunoreattive (ir) presenti nella regione basale di ognuno dei OB che costituiscono il NOR (Fig. 11). Il loro numero appare piuttosto limitato, essendo non più di 8-9 per bulbo; tuttavia le loro dimensioni appaiono particolarmente grandi. Essi sono mediamente di circa 70  $\mu\text{m}$ , con le massime dimensioni registrate di circa 90  $\mu\text{m}$ . Essi, nelle sezioni sagittali, sono di forma ovoidale e orientati in senso antero-posteriore, mentre appaiono di forma tondeggiante nelle sezioni trasversali. Comparati con gli altri neuroni del bulbo non ir, essi sono mediamente quattro volte più grandi e la stessa relazione vale anche per i loro nuclei. La maggioranza di questi neuroni appare unipolare con l'unico prolungamento diretto posteriormente; mentre raramente qualcuno di loro appare bipolare. Le fibre emergenti sono anch'esse di dimensioni enormi (Fig. 11) e si dirigono verso la commessura anteriore (AC) dove, in seguito a decussazione, raggiungono il diencefalo (DIE) (Fig. 12). In questa regione, le suddette fibre sembrano terminare a livello del nucleo periventricolare ipotalamico (PH) e l'infundibolo posteriore (Fig. 13). Altri presunti campi terminali sono stati osservati a livello del mesencefalo (MES) (Fig. 14), in cui le fibre di grosso calibro diffondono nel tegmento del MES al di sotto del ventricolo ottico. Al di là del MES, anche se sporadicamente, alcune delle fibre raggiungono il rombencefalo (ROMB) dorsale (Fig. 15). Oltre che posteriormente, alcune grosse fibre si osservano lungo la base dei OB, fino a raggiungere il nervo olfattivo (NO) (Fig. 16) in cui si disperdono e

terminano molto prossimalmente.

Un altro gruppo di neuroni FMRFa-ir si rileva a livello del PH (Fig. 17). In questo caso si tratta di due gruppi di neuroni separati dal recesso infundibolare del III ventricolo. Essi sono circa un centinaio di neuroni il cui corpo cellulare appare di dimensioni normali, tra i 15 e i 20  $\mu\text{m}$ . La maggior parte di loro appare bipolare, ma sono presenti anche neuroni multipolari. Quelli bipolari si presentano allungati prevalentemente in senso laterale, cosicché in sezioni parasagittali sembrano tondeggianti. Le fibre di loro pertinenza sono molto più sottili se comparate con quelle emergenti dai neuroni giganti del bulbo olfattivo.

Le fibre di piccolo calibro hanno una distribuzione molto più estensiva rispetto a quelle di calibro maggiore. Esse si osservano in tutte le maggiori divisioni dell'encefalo. In particolare, presunte terminazioni sono presenti a livello dell'area mediana del setto (MSA) e nel pallio dorsale posteriore. Si tratta, però, di sole e poche fibre. Un fascio piuttosto consistente di fibre parte dai neuroni FMRFa-ir del PH e decorre lungo il telencefalo (TEL) basale, parallelamente, ma in senso opposto, alle fibre di grosso calibro. Esse penetrano nel bulbo olfattivo e, in parte, anche nel NO dove, però, terminano molto prossimalmente. Altre proiezioni di piccolo calibro in numero consistente terminano nell'infundibolo posteriore (Fig. 13), da cui alcune di esse invadono l'ipofisi. Altri presunti campi terminali si osservano a livello del tegmento mesencefalico (Fig. 14) e, anche se molto più raramente, lungo la regione superiore del tetto ottico al confine con la zona grigia periventricolare. Fibre di piccolo calibro sono presenti anche nei tori semicircolari, anche se non seguono una disposizione particolare, ma sono diffuse in tutta la sua estensione. Una presenza cospicua di fibre è presente anche nei tori laterali. Inoltre, un piccolo numero di fibre si dirige posteriormente fino a raggiungere il ROMB centrale e basale. Infine, alcune fibre raggiungono la retina (Fig. 18) attraverso il nervo ottico; esse

sono localizzate in prossimità dello strato plessiforme interno, al confine con lo strato delle cellule bipolari.

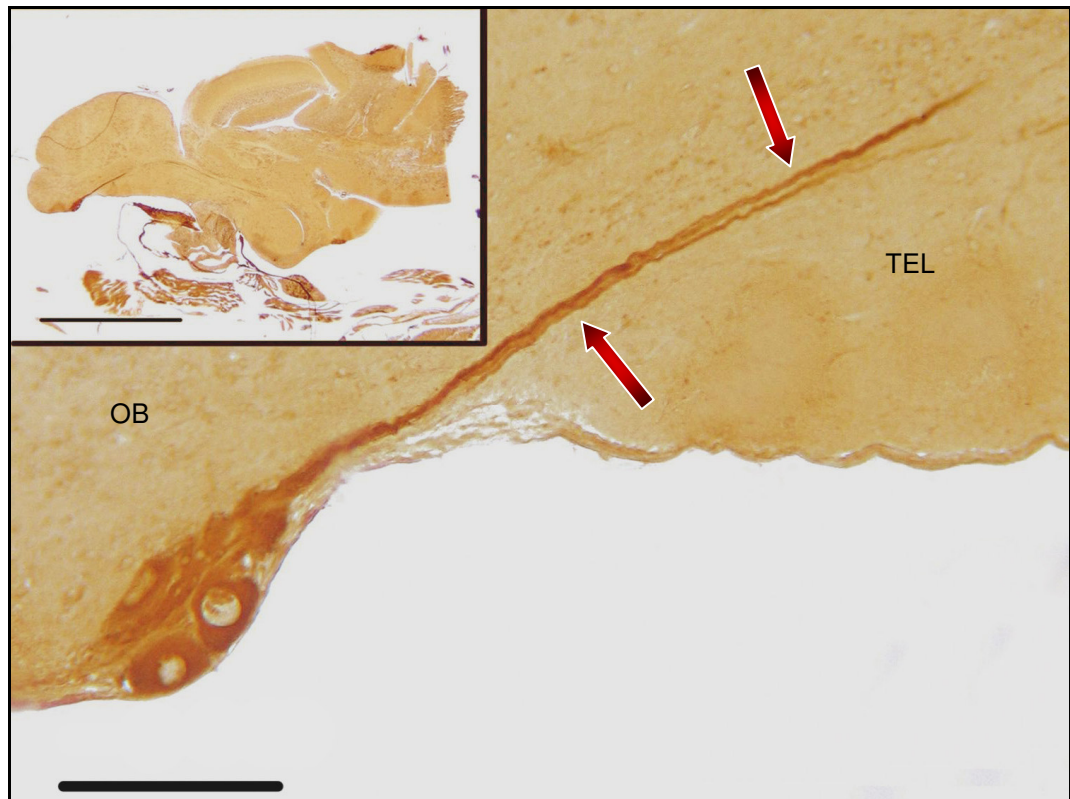


Fig. 11 Cellule ir del NT alla base dei bulbi olfattivi (OB). Le stesse costituiscono il NOR. Le frecce indicano le fibre di grosso calibro che si estendono nel telencefalo (TEL). Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.



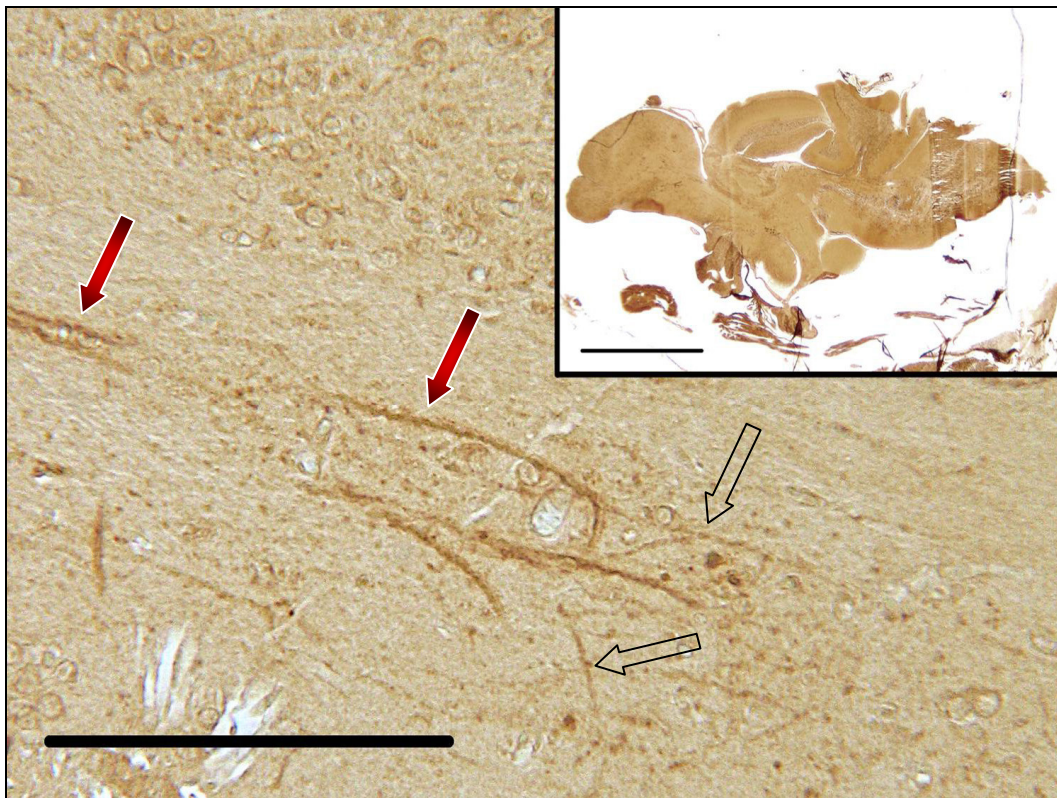


Fig. 12 Fibre di grosso calibro (frece rosse) e di piccolo calibro (frece vuote) nelle regioni del diencefalo. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

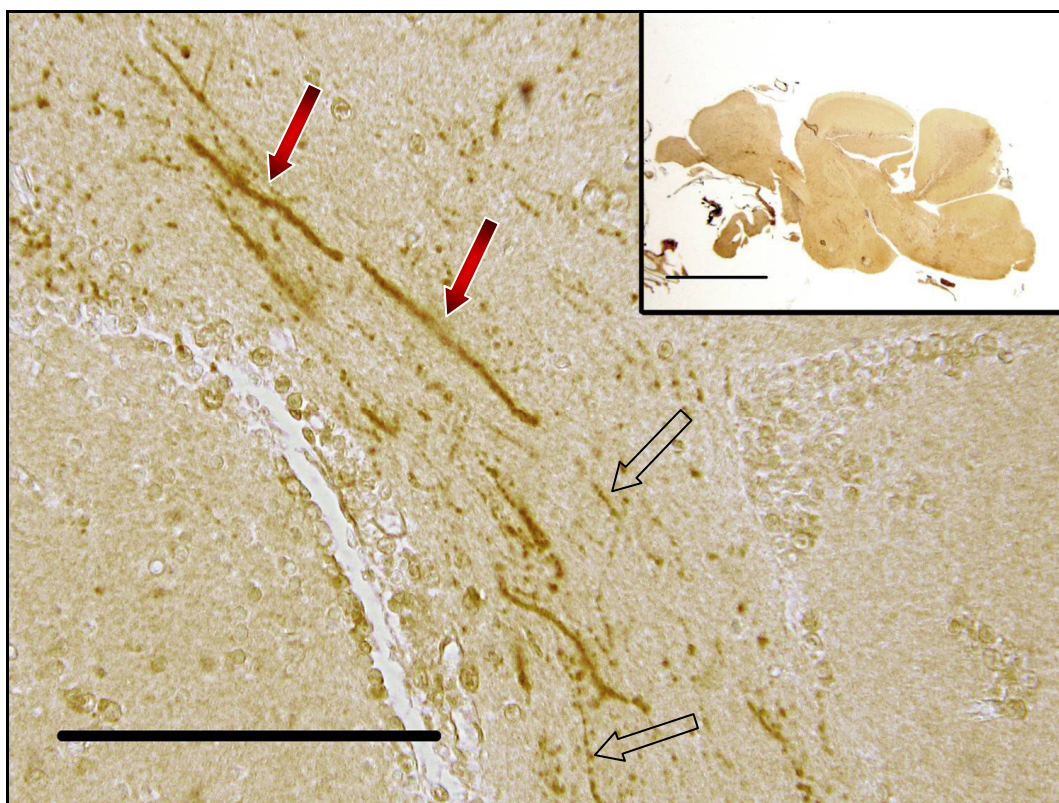


Figura 13 Fibre di grosso calibro (frece rosse) e di piccolo calibro (frece vuote) nelle regioni ipotalamiche. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

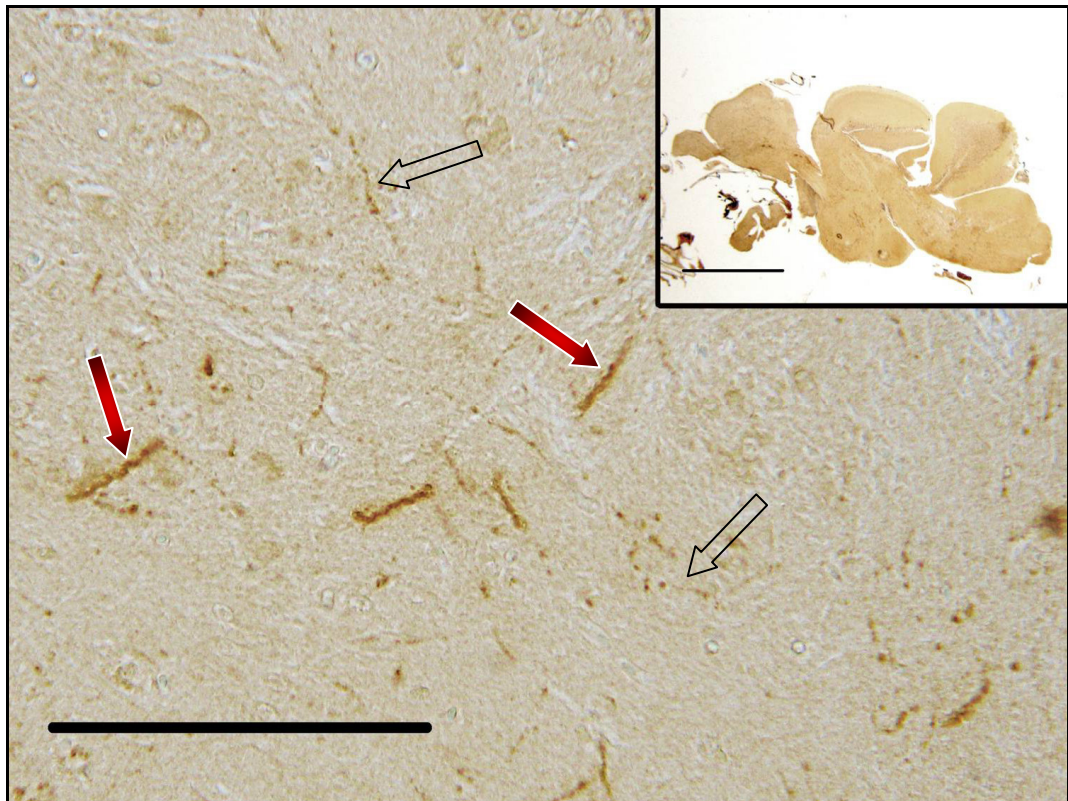


Fig. 14 Fibre di grosso calibro (frece rosse) e di piccolo calibro (frece vuote) nelle regioni del mesencefalo. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

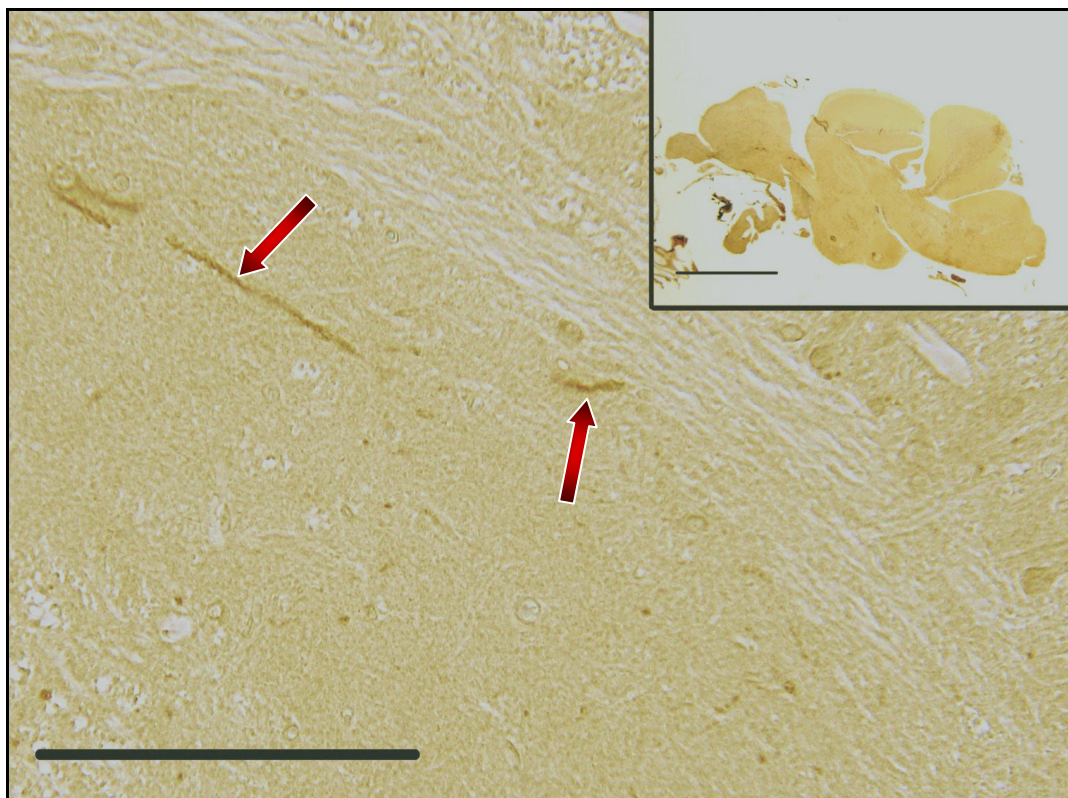


Fig. 15 Fibre di grosso calibro (frece rosse) nelle regioni del rombencefalo. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

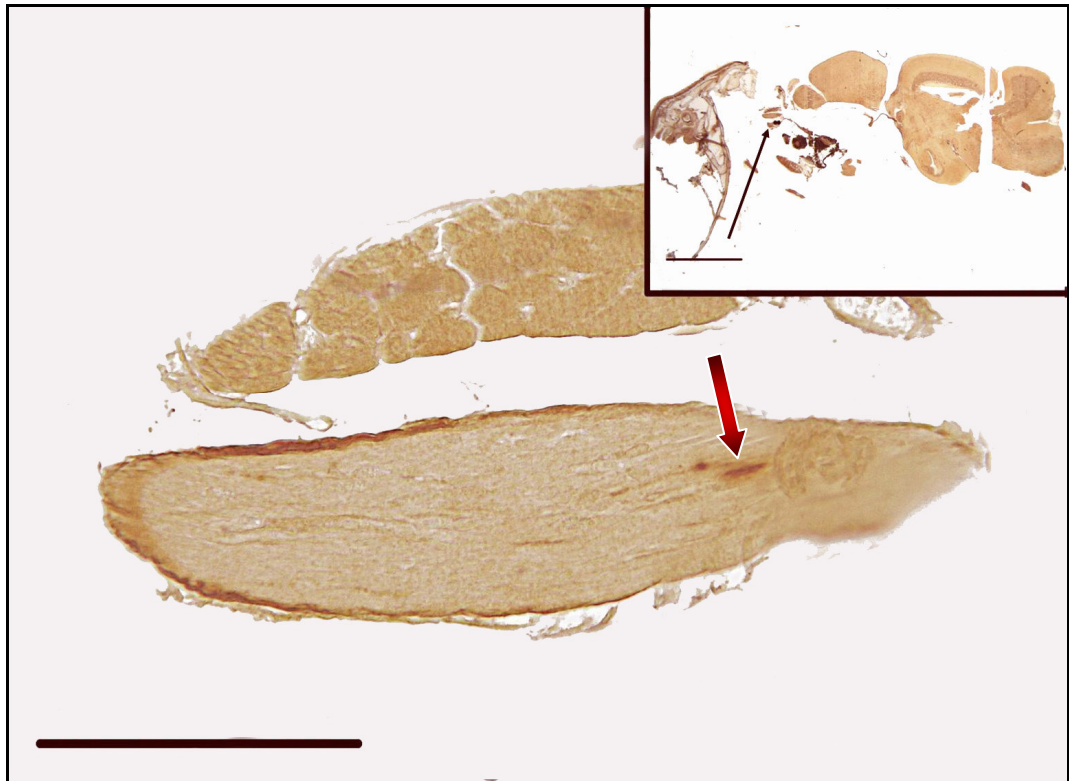


Fig. 16 Fibre di grosso calibro (freccia rossa) nel nervo olfattivo. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

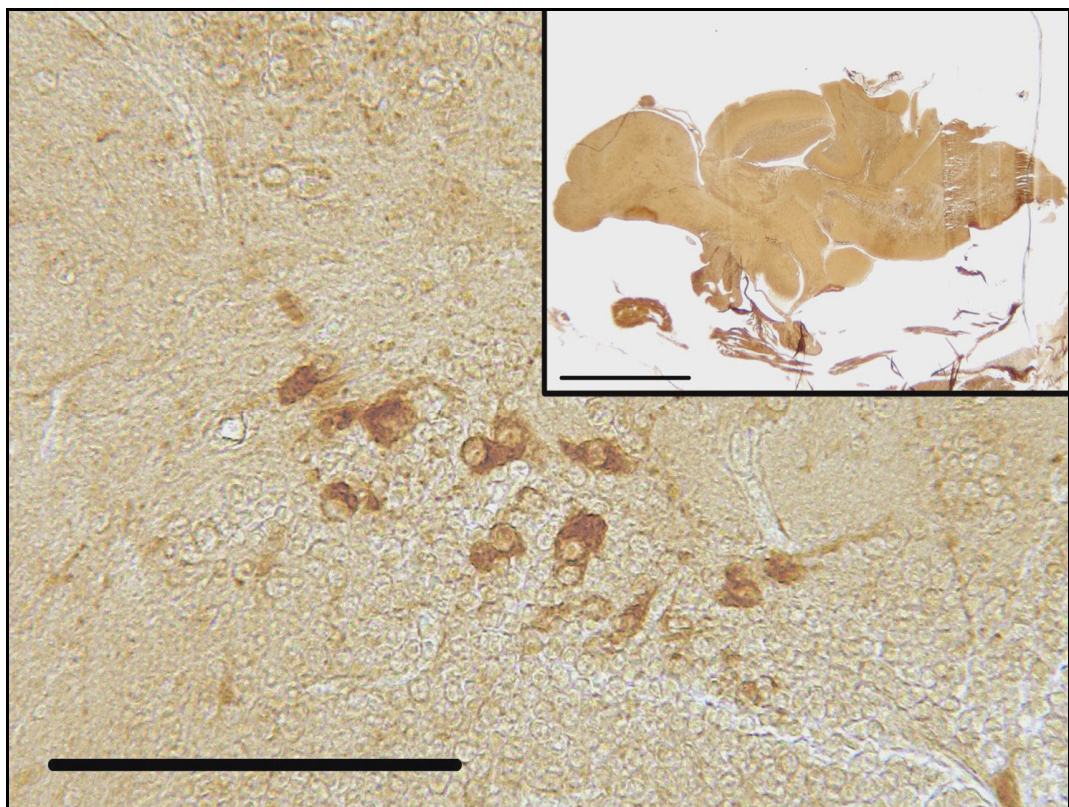


Fig. 17 Cellule ir del nucleo periventricolare ipotalamico. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

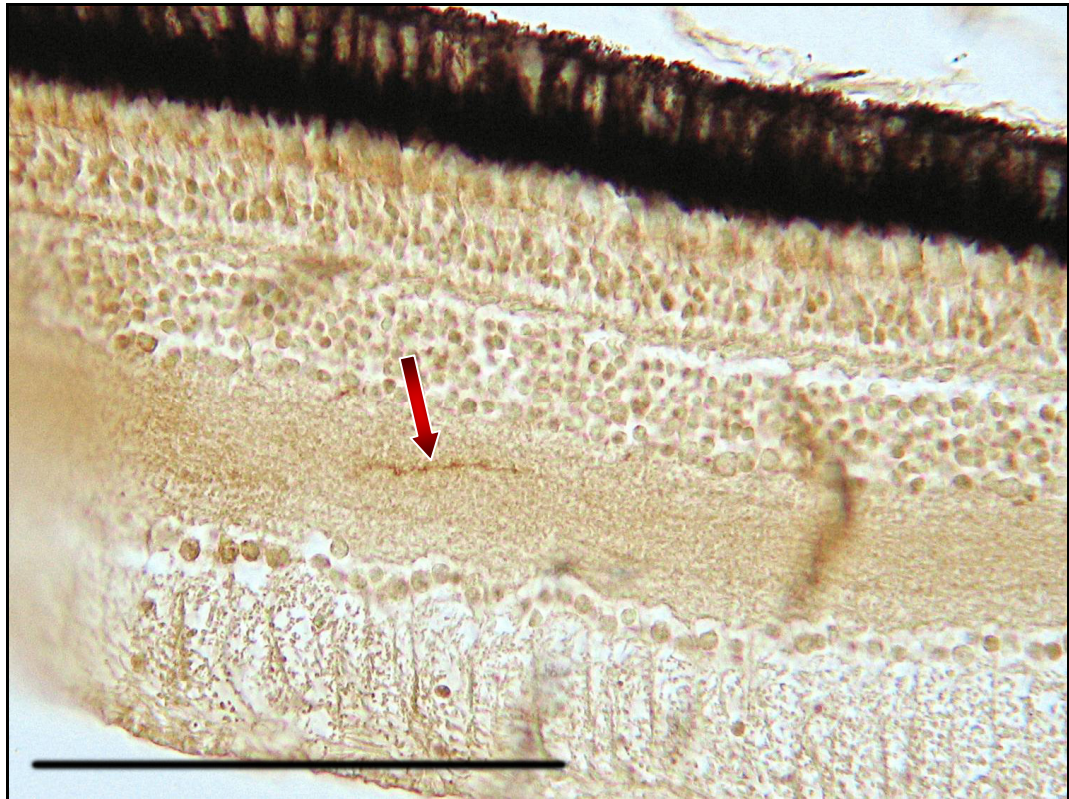


Fig. 18 Fibre nella retina (freccia rossa), in prossimità dello strato plessiforme interno. Scale bar 100  $\mu$ m.

*Applicazione cristalli di DiI/DiA alla mucosa olfattiva o al nervo olfattivo tranciato del teleosteo Moenkhausia sanctaefilomenae*

L'applicazione dei due traccianti in cristalli da risultati positivi e comparabili. Infatti, in seguito all'applicazione dei cristalli di tracciante alla mucosa olfattiva (OM) o sulla superficie del NO tranciato, risulta marcato unicamente il OB ipsilaterale (Fig. 19). Il pattern di distribuzione delle fibre ottenuto con l'applicazione al nervo tranciato o alla OM, risulta differente riguardo alla quantità d'elementi marcati e al loro numero. Tuttavia, le fibre raggiungono gli stessi distretti encefalici.

Elementi del sistema di fibre olfattive extrabulbari, sotto forma di un fascio compatto di fibre, attraversano il OB ipsilaterale (Fig. 20) in posizione medio basale (Fig. 21), percorrendo il TEL fino alla AC, dove decussano (Fig. 22). Da questo punto, parte delle fibre prosegue verso il OB controlaterale attraverso il TEL medio basale. Fibre singole si staccano dal fascio principale per proseguire fino al DIE sia ipsilaterale (Fig. 22) sia

controlaterale (Fig. 23). Inoltre, sono presenti fibre che probabilmente innervano anche il nucleo preottico. In ogni caso la lunghezza dei due cordoni, sia ipsi sia controlaterale, è simile come estensione posteriore. Tuttavia, nel lato ipsilaterale si notano fibre singole staccarsi dal gruppo principale per innervare il pallio (Fig. 24) e, a livello caudale, il DIE, mentre nella parte controlaterale esse sono più concentrate a livello palliale. Poche fibre raggiungono anche l'ipotalamo basale e il MES ipsilaterale (Fig. 25), mentre esse sono assenti nei restanti distretti encefalici. L'applicazione dei traccianti non ha messo in evidenza neuroni lungo il percorso analizzato.

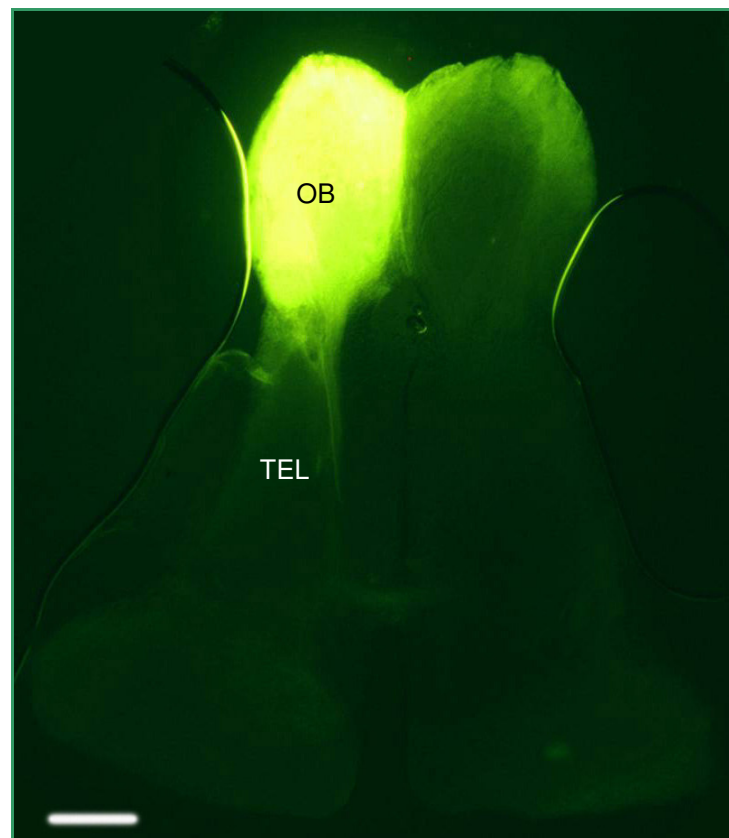


Fig. 19 Applicazione di cristalli di DiA alla mucosa olfattiva sinistra. In seguito all'applicazione del tracciante, risulta marcato unicamente il bulbo olfattivo (OB) ipsilaterale. Scale bar 100  $\mu$ m.

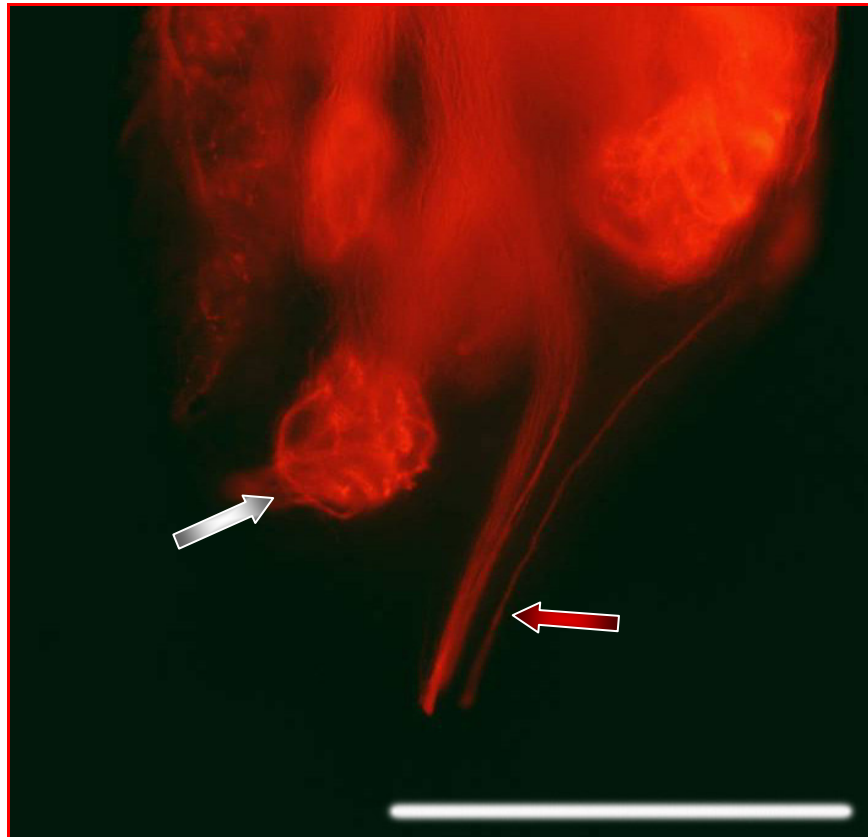


Fig. 10 Fascio di fibre EBOS che sfugge alla sinapsi con le cellule mitrali e oltrepassa il bulbo olfattivo (freccia rossa). La freccia grigia indica un glomerulo. Scale bar 100  $\mu$ m.

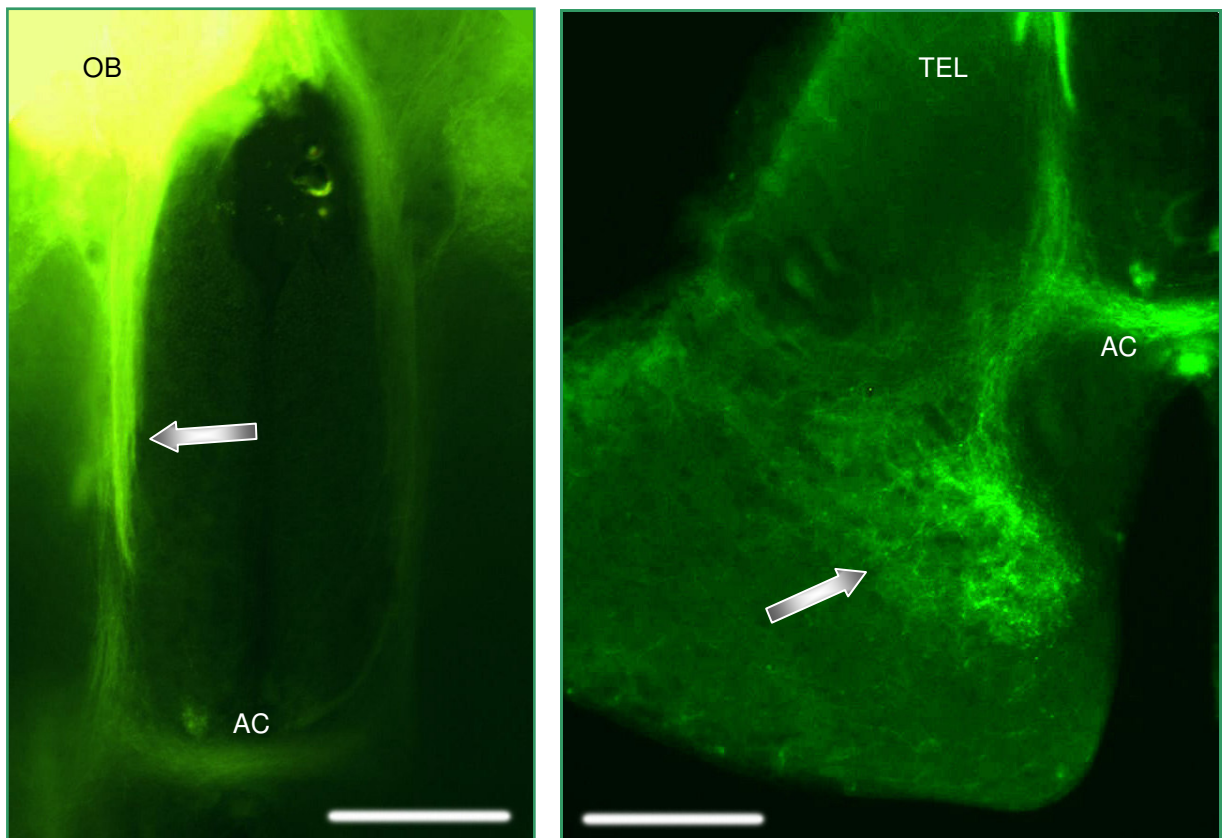


Fig. 21 (sinistra) Fascio di fibre EBOS attraversa il telencefalo (TEL) in posizione medio-basale (freccia). Fig. 22 (destra) Fibre EBOS nelle regioni del diencefalo ipsilaterale (freccia) in seguito a decussazione alla commessura anteriore (AC). OB, bulbo olfattivo. Scale bar 100  $\mu$ m.

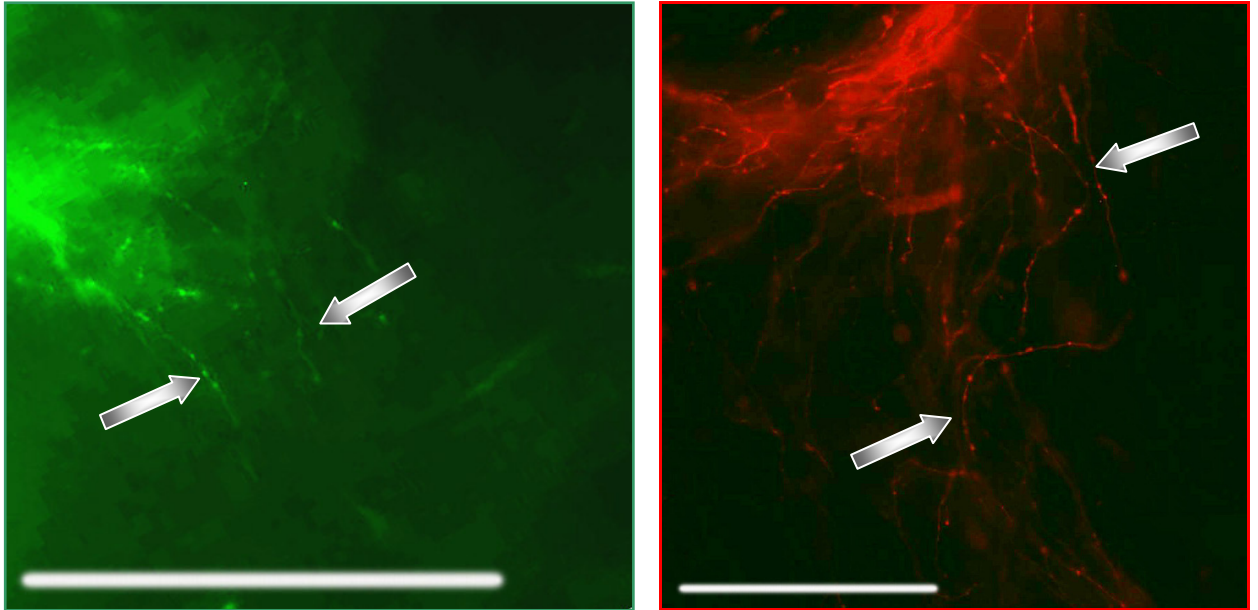


Fig.23 (sinistra) Fibre EBOS nelle regioni del diencefalo controlaterale (freccie). Fig. 24 (destra) Fibre EBOS nelle regioni del pallio ipsilaterale (freccie). Scale bar Fig. 23, 100  $\mu\text{m}$ ; Fig. 24, 50  $\mu\text{m}$ .

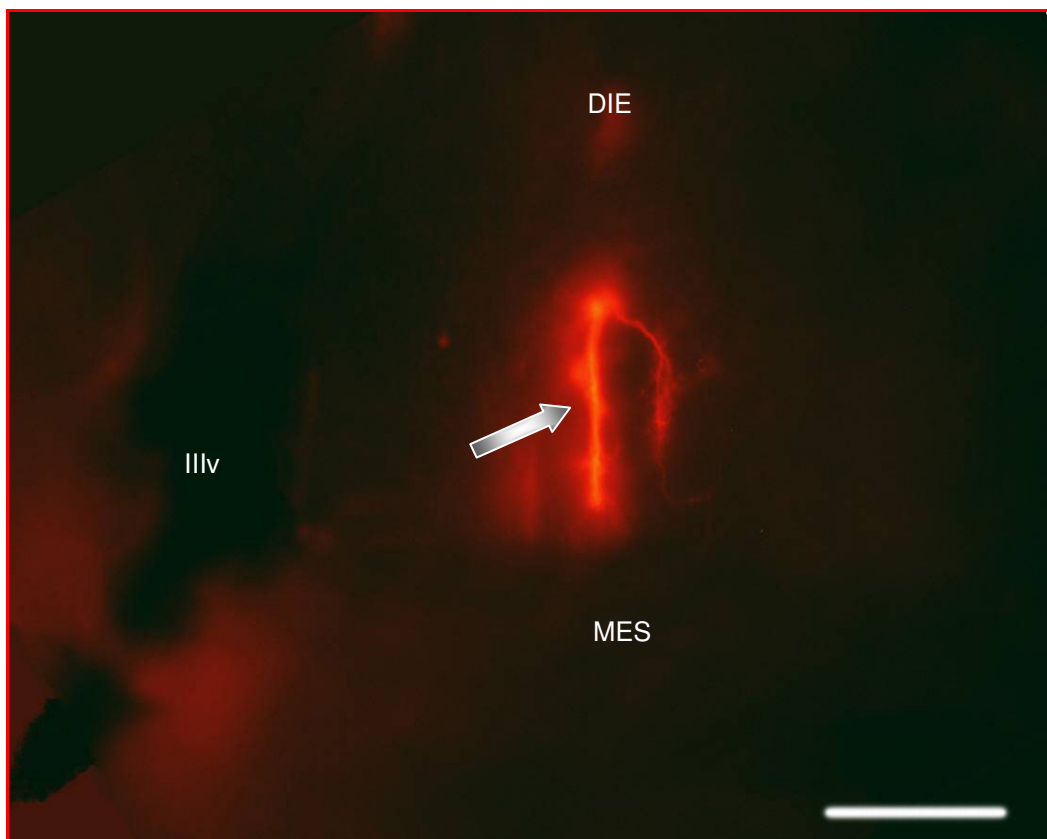


Fig. 25 Fascio di fibre EBOS (freccia) nelle regioni del mesencefalo (MES). DIE, diencefalo. IIIv, terzo ventricolo. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ .

*Moenkhausia sanctaefilomenae*: doppia marcatura con applicazione di biocitina alla camera olfattiva e immunostochimica per il peptide FMRFa. L'utilizzo della biocitina quale tracciante neuronale, ha dato risultati

sovrapponibili a quelli ottenuti mediante applicazione di traccianti lipofilici quali DiI e DiA. Difatti, il sistema di fibre rilevato dal tracciante in questione è paragonabile, in quanto ad estensione e numero di fibre, a quello ottenuto con i traccianti adoperati *post mortem*. Inoltre, la metodologia utilizzata è perfettamente compatibile con l'immunoistochimica per l'FMRFa.

In seguito ad applicazione di biocitina alla OM di campioni di Santafilomena, si osserva il NO e lo strato glomerulare del OB marcati (Fig. 26). Un fascio compatto di fibre EBOS attraversa il OB in posizione medio basale per invadere il TEL e raggiungere la AC (Fig. 27) dove si assiste a decussazione. Il pattern delle fibre nei restanti distretti encefalici è paragonabile a quanto descritto in precedenza per l'applicazione del DiI e DiA.

L'immunofluorescenza per il tetrapeptide FMRFa, rivela due principali nuclei encefalici, il NOR e il nucleo del PH, dal quale hanno origine due distinti sistemi di fibre come visti mediante le tecniche immunoistochimiche.

Nei campioni analizzati, si assiste ad una sovrapposizione delle fibre EBOS e del NT, ma in nessun caso si assiste a colocalizzazione di biocitina e materiale FMRFa-ir.



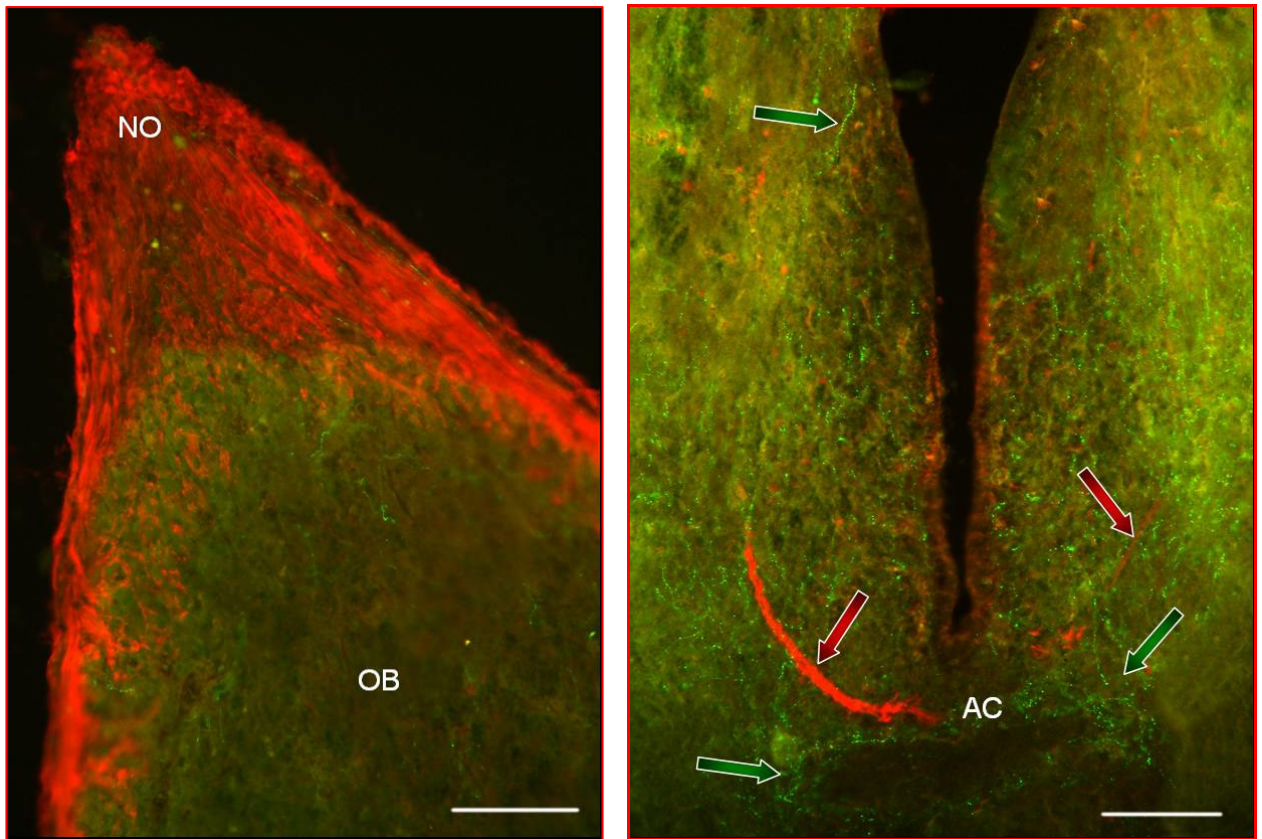


Fig. 26 (sinistra) Applicazione di biocitina alla mucosa olfattiva. La migrazione del tracciante si blocca allo strato glomerulare. NO, nervo olfattivo; OB, bulbo olfattivo. Fig. 27 (destra) Fibre EBOS (frece rosse) decussano alla commessura anteriore (AC). Esse condividono le stesse aree con fibre del nervo terminale (frece verdi). Scale bar 100  $\mu$ m.

### *Analisi della distribuzione di materiale FMRFa-ir nell'encefalo del teleosteo Paracheirodon innesi*

L'immunoistochimica per il tetrapeptide FMRFa ha messo in evidenza due distinte reti neuronali, differenziabili in base al calibro delle fibre stesse così come visualizzato per il *Moenkhausia sanctaefilomenae*.

La rete di fibre di calibro maggiore proietta da due gruppi di cellule FMRFa-ir presenti nella porzione ventrale, prossimale e distale dei OB (Fig. 28). Il gruppo più distale è in prossimità del cono di emergenza del complesso del NO. Il gruppo prossimale è, invece, posizionato quasi in corrispondenza del limite tra OB e TEL. Entrambi i gruppi sono caratterizzati da un numero esiguo di cellule ir (3 o 4), ma di notevoli dimensioni (circa 50-60  $\mu$ m) e allungati in senso antero-posteriore, con un nucleo decisamente più grande rispetto alle cellule non ir circostanti, e un

citoplasma fortemente ir. Il gruppo distale è in contatto con quello prossimale tramite tali spesse fibre ir che decorrono lungo la porzione ventrale del OB (Fig. 28) . Scarse fibre ir proiettano anteriormente alla OM, ma esse terminano nel primo tratto del NO (Fig. 29), mentre posteriormente, fibre di grosso calibro emergono dal gruppo di cellule ir prossimale, e attraversavano il TEL lungo la MSA (Fig. 30). Arrivate alla AC, si assiste alla decussazione della maggior parte di esse. Poi proseguono il loro percorso invadendo le regioni diencefaliche, proiettando verso il PH, verso regioni appartenenti al talamo ventrale e a quello dorsale. Non sono state rilevate altre fibre di tale spessore negli altri distretti encefalici.

L'immunoistochimica per l'FMRFa, ha messo in evidenza un gruppo di cellule ir appartenenti al PH. Esse sono molto più piccole rispetto a quelle bulbari (15-20  $\mu\text{m}$ ), così come le loro fibre. Da tale gruppo di cellule, un fascio lasso composto di numerose fibre, seguiva un percorso che, attraversando il TEL medio basale proiettava verso la regione postbulbare ventrale per diffondere nei OB. Altre fibre di piccolo calibro invadevano la regione ventrale dell'ipotalamo periventricolare, terminando in parte nella ghiandola pituitaria (Fig. 31) e altre, curvandosi, invadono la regione caudale dell'ipotalamo periventricolare. Piccole fibre sono anche presenti nel talamo dorsale.

Dal fascio principale diretto verso il TEL, un piccolo numero di fibre, si stacca per portarsi nel chiasma ottico e, attraverso il nervo ottico (Fig. 32), raggiungono la retina (Fig. 33). Tali fibre sono localizzate nello strato plessiforme interno, al confine con lo strato delle cellule bipolari.

Altre fibre FMRFa-ir di piccolo calibro si presentano nel tetto ottico, con un ordine non preciso, situate maggiormente al confine con la zona grigia periventricolare. Inoltre, esse sono presenti anche nei tori semicircolari; anche qui non seguono nessuno schema particolare, ma sono diffuse in tutta la sua estensione. Una presenza cospicua di fibre è presente anche nei

tori laterali e nel tegmento mesencefalico. Più posteriormente altre fibre ir si ritrovano, sparse anche nel ROMB, anche se in numero esiguo, mentre al confine tra cervelletto e la cresta cerebellari esse sono molto abbondanti.



Fig. 28 Cellule ir del nervo terminale (freccie). I due gruppi di cellule sono collegati da fibre ir. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .

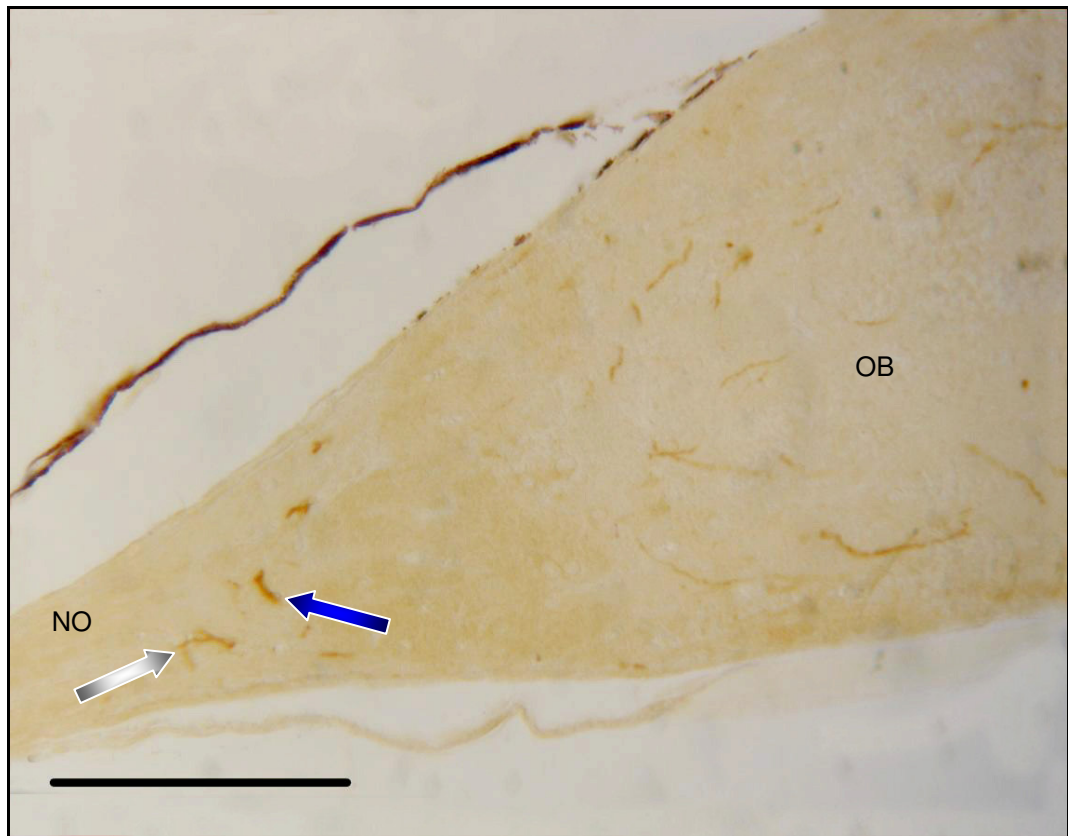


Fig. 29 Fibre di grosso calibro (freccia blu) e di piccolo calibro (freccia grigia) in prossimità del cono d'emergenza del nervo olfattivo (NO). OB, bulbo olfattivo. Scale bar 100  $\mu$ m.

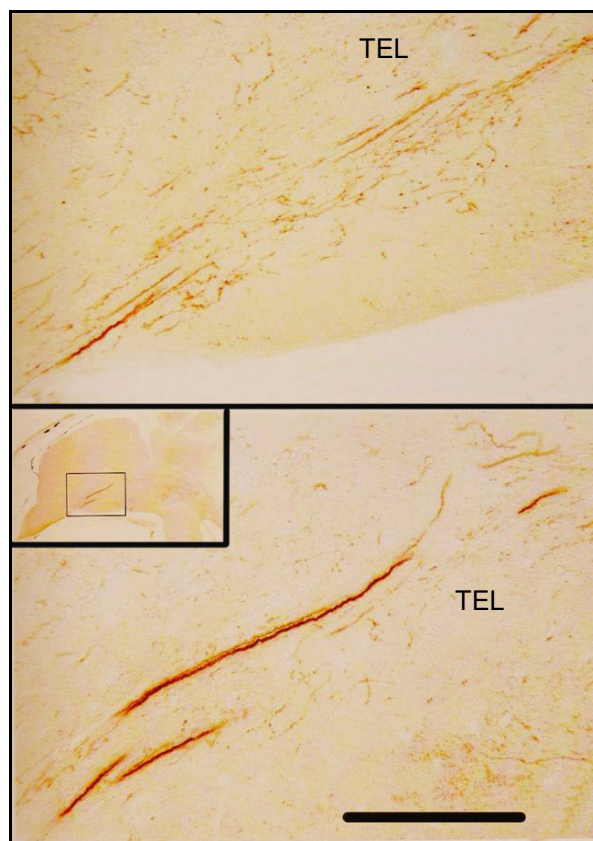


Fig. 30 Fibre di grosso calibro dai neuroni ir del nervo terminale, attraversano il telencefalo (TEL) per portarsi nelle regioni ipotalamiche. Scale bar 100  $\mu$ m.

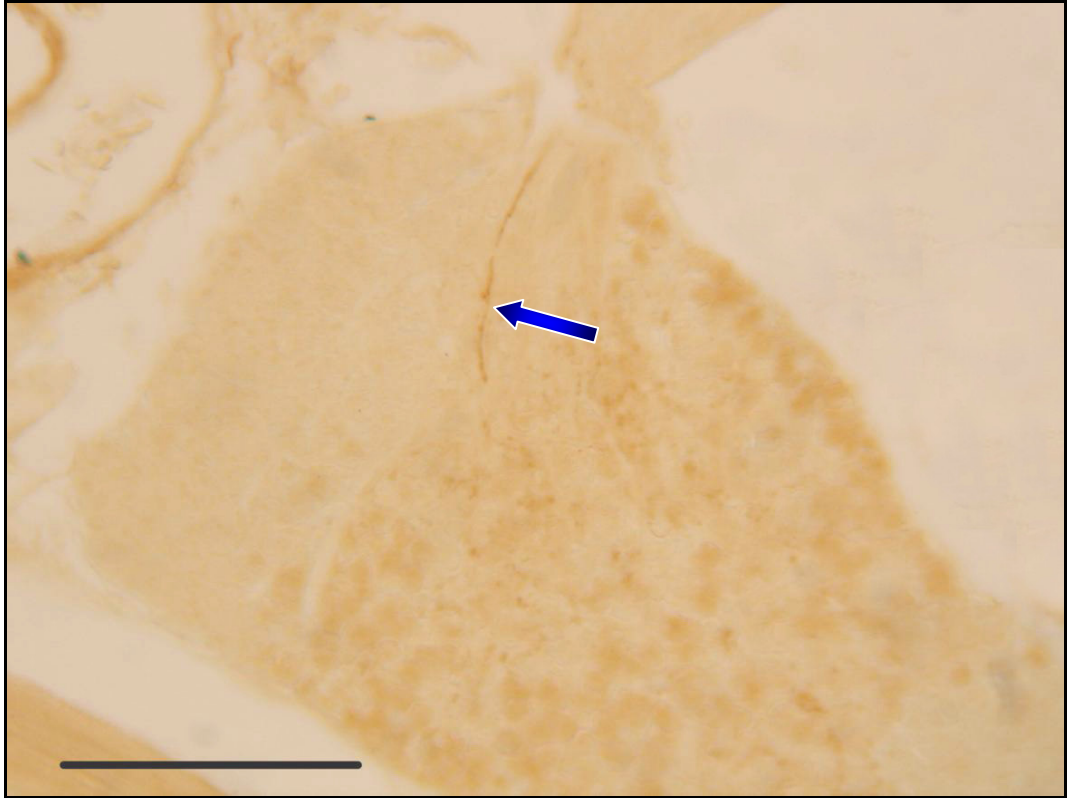


Fig. 31 Fibre ir (freccia) nella ghiandola pituitaria. Scale bar 100  $\mu$ m.

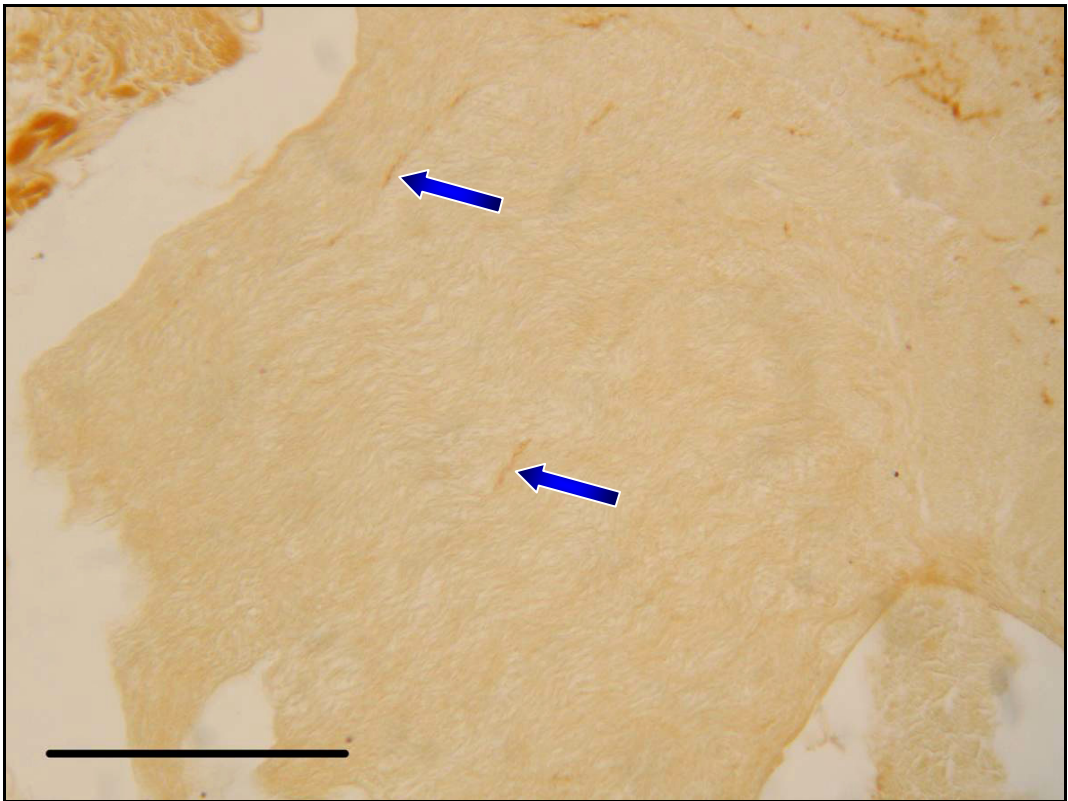


Fig. 32 Fibre ir (freccie) nel nervo ottico. Scale bar 100  $\mu$ m.

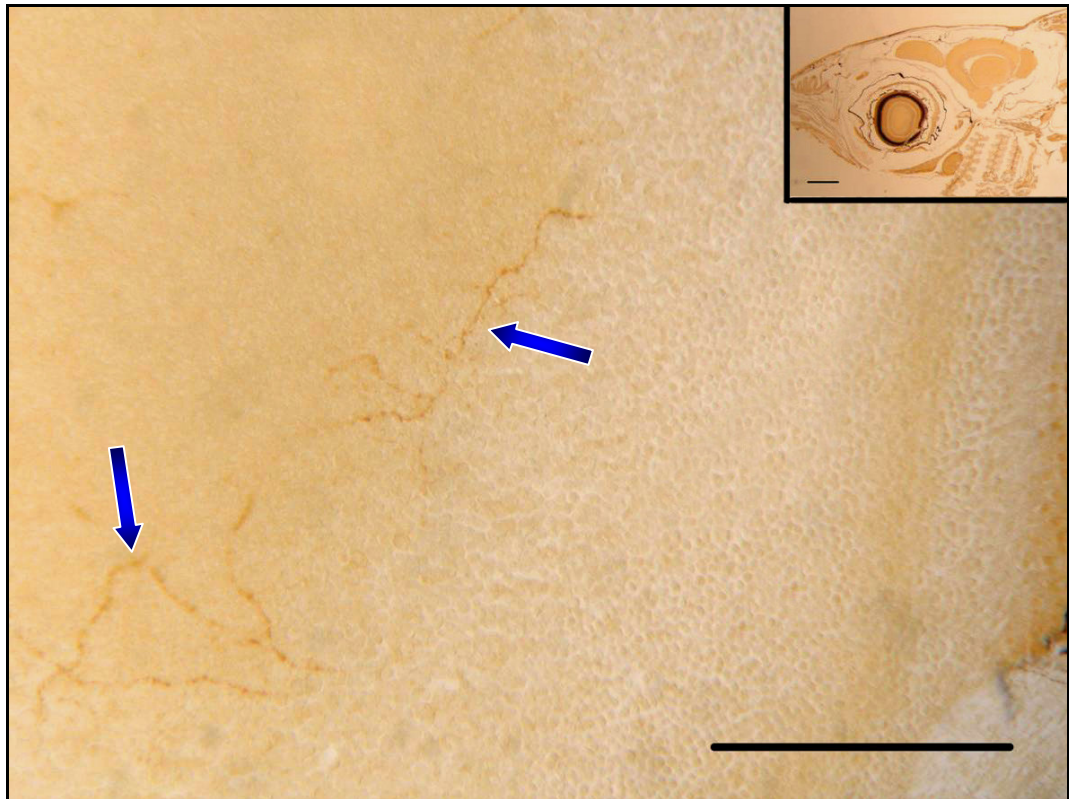


Fig. 33 Fibre ir (frecce) nello strato plessiforme interno della retina. Scale bar 100  $\mu$ m, inserto 1 mm.

*Applicazione cristalli di DiI/DiA alla mucosa olfattiva del teleosteo  
Paracheirodon innesi*

L'approccio tecnico utilizzato è risultato piuttosto soddisfacente, in quanto in seguito all'applicazione dei due traccianti alla OM o alla superficie del NO tranciato, si marcava unicamente il bulbo olfattivo ipsilaterale (Fig. 34). In aggiunta, l'utilizzo del DiI e del DiA, dava risultati comparabili. Il pattern visualizzato in questa specie, ricalca quello ottenuto in *Moenkhausia sanctaefilomenae*: un fascio compatto di fibre attraversava il OB ipsilaterale in posizione medio basale, percorrendo il TEL (Fig. 35) fino alla AC, dove decussata (Fig. 36). Dalla AC, parte delle fibre proseguiva verso il OB controlaterale attraverso il TEL medio basale. Tuttavia, la quantità di fibre marcate nelle regioni palliali e diencefaliche, sia ipsi che controlaterale, era inferiore a quella riscontrata in *Moenkhausia sanctaefilomenae*.

L'applicazione dei traccianti non ha messo in evidenza neuroni lungo il percorso analizzato.

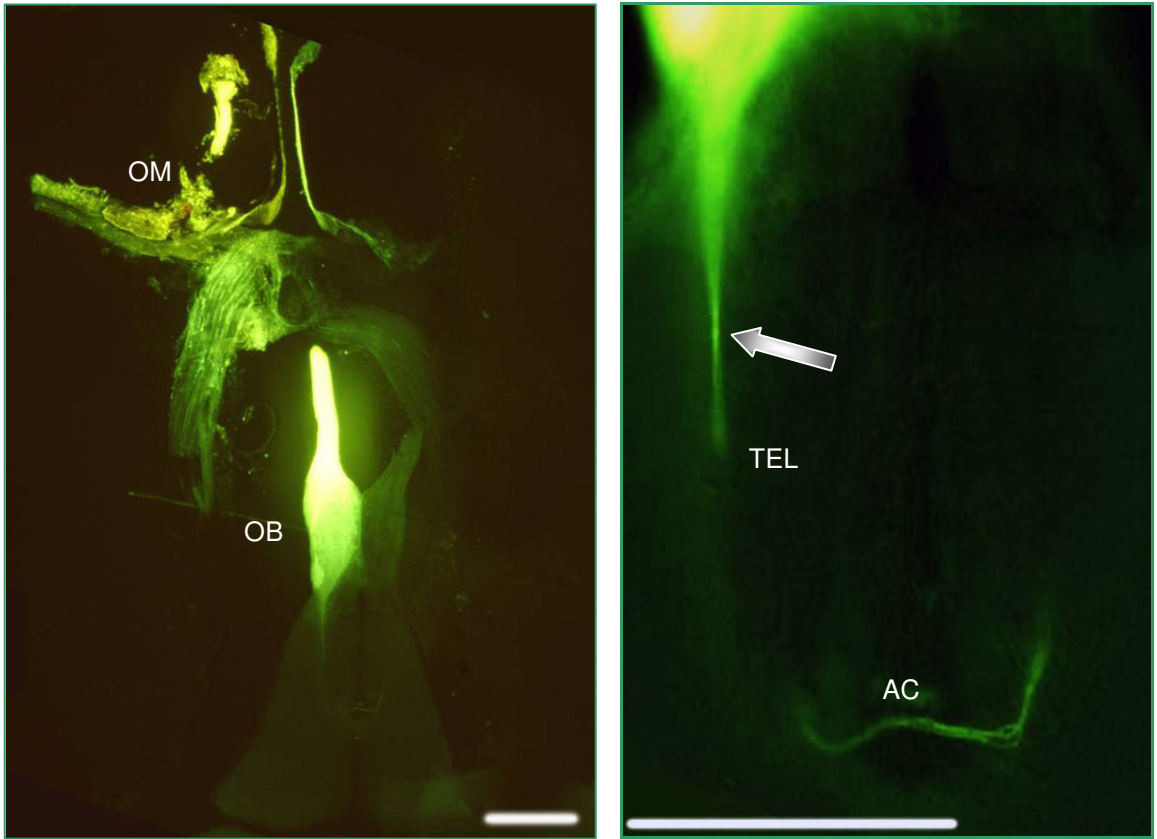


Fig. 34 (sinistra) Applicazione di cristalli di DiA alla mucosa olfattiva (OM) sinistra. In seguito all'applicazione del tracciante, risulta marcato unicamente il bulbo olfattivo (OB) ipsilaterale. Fig. 35 (destra) Fasci di fibre EBOS attraversano il telencefalo (TEL) in posizione medio basale. Scale bar 100  $\mu$ m.

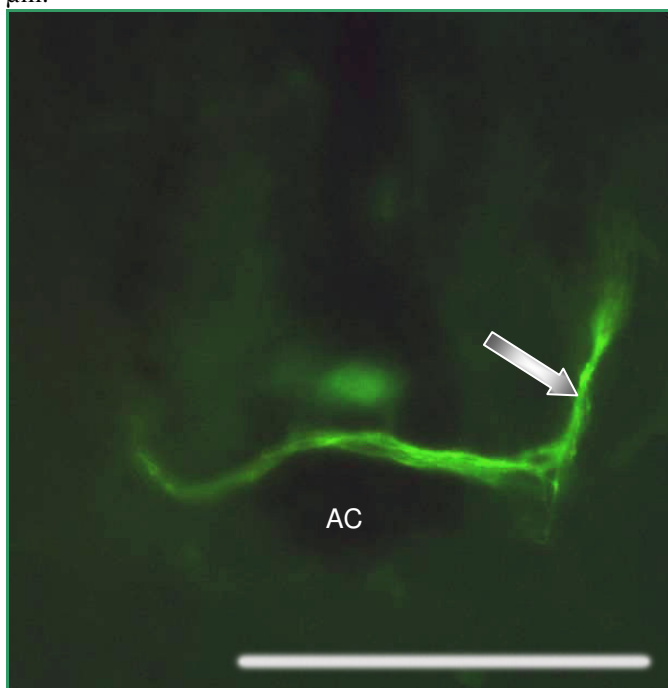


Fig. 36 Fibre EBOS decussano alla commessura anteriore (AC) per portarsi nella regione controlaterale. Evidenti le fibre che si portano verso il bulbo olfattivo controlaterale (freccia). Scale bar 100  $\mu$ m.

*Analisi della distribuzione di materiale FMRFa-ir nell'encefalo del teleosteo Astyanax fasciatus mexicanus*

La specie in questione presenta OB sessili. Ciascun bulbo è caratterizzato dalla presenza di cellule FMRFa-ir. Nel OB il NOR è posto in posizione ventrale, in prossimità del cono di emergenza del complesso NO/NT (Fig. 37).

Il NOR è caratterizzato da un cospicuo numero di cellule ir, in media 10 per nucleo, equamente ripartite tra cellule di dimensioni superiori e inferiori a 40  $\mu\text{m}$ . Come già visto per le specie in precedenza trattate, i neuroni ir mostrano un orientamento antero-posteriore, forma allungata e citoplasmi ir ben marcati. Si riscontrano, all'interno del nucleo, sia cellule unipolari sia bipolari.

Da ciascuna cellula unipolare parte una fibra di grosso calibro che percorre la zona ventrale del OB, proiettandosi posteriormente. Dalle cellule bipolari emergono due grosse fibre, una rivolta anteriormente ed una posteriormente.

Dalle osservazioni si evince che le fibre dirette posteriormente, ben evidenti e di grosso calibro, attraversano la regione telencefalica terminando nel DIE, presso la regione dell'infundibolo. Così come per le altre specie analizzate, si assiste a decussazione di tali fibre a livello della AC (Fig. 38).

Anche in *Astyanax fasciatus mexicanus* è presente un gruppo di neuroni ir appartenenti al PH (Fig. 39). Essi sono di dimensioni ridotte (15-20 $\mu\text{m}$ ) e in numero paragonabile alle altre specie analizzate. Da tali neuroni hanno origine fibre di piccolo calibro che sono presenti in tutti i distretti encefalici. Infatti, dal PH si dirigono verso la regione anteriore, dove invadono, numerose, i OB e il cono di emergenza del complesso NO/NT. Sono presenti in numero cospicuo nelle regioni telecefaliche, quali quelle palliali e della MSA. Ancora, fibre di piccolo calibro dal PH invadono il



tetto ottico, le regioni talamiche ed ipotalamiche così come il tegmento mesencefalico. Sono presenti anche nell'infundibolo e nella ghiandola pituitaria.

La loro presenza si riscontra anche nel ROMB, anche se il loro numero è inferiore rispetto alle altre regioni encefaliche descritte.

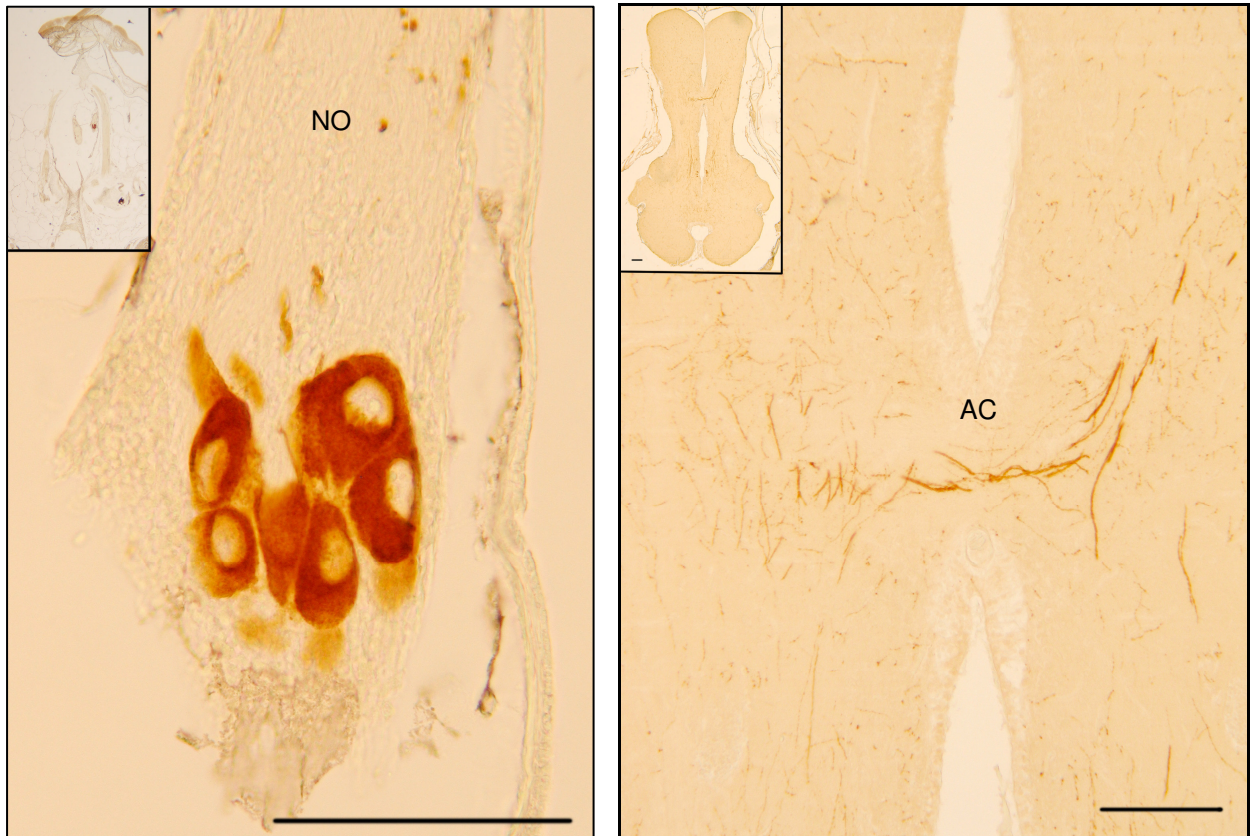


Fig. 37 (sinistra) Cellule ir del nervo terminale in prossimità del cono di emergenza del nervo olfattivo (NO). Fig. 38 (destra) Le fibre ir si estendono nel telencefalo in posizione ventrale e decussano alla commessura anteriore (AC). Scale bar 100  $\mu$ m.

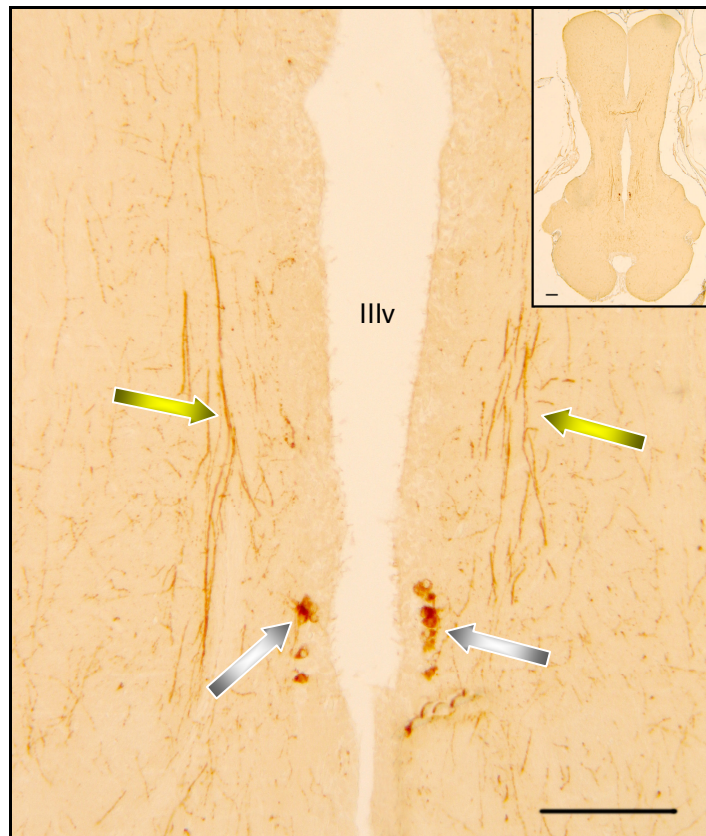


Fig. 39 Fibre ir nelle regioni ipotalamiche (freccie gialle). Le freccie grigie indicano le cellule ir del nucleo periventricolare ipotalamico. Scale bar 100  $\mu$ m.

*Applicazione cristalli di DiI/DiA alla mucosa olfattiva del teleosteo  
Astyanax fasciatus mexicanus*

Anche per questa specie l'approccio tecnico utilizzato è risultato soddisfacente con risultati comparabili (Fig. 40). Infatti, l'applicazione dei due tipi di traccianti ha messo in evidenza un fascio compatto di fibre che oltrepassa il OB in posizione medio basale (fig. 41). Lo stesso percorre il TEL nella stessa posizione fino ad arrivare alla AC dove si assiste a decussazione nella regione controlaterale (Fig. 42). Per quanto concerne le regioni palliali e diencefaliche, sia ipsi sia contro, il pattern di fibre è simile a quello riscontrato in *Paracheirodon innesi*.

In seguito all'applicazione dei traccianti, non sono stati osservati neuroni marcati lungo il percorso analizzato.

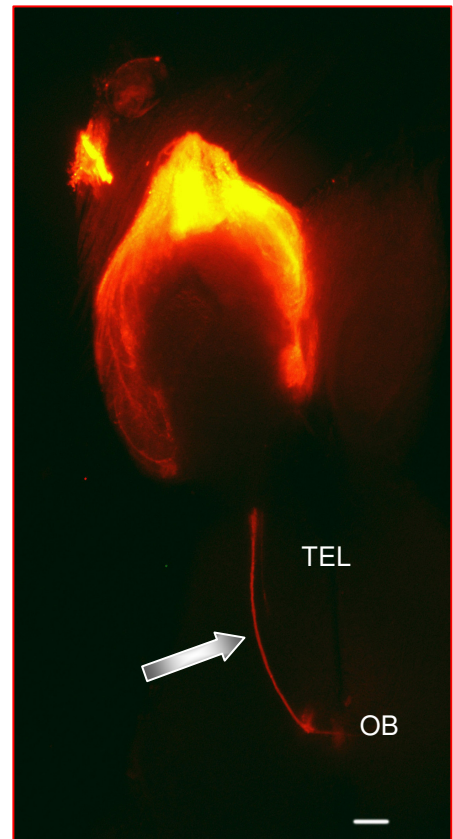
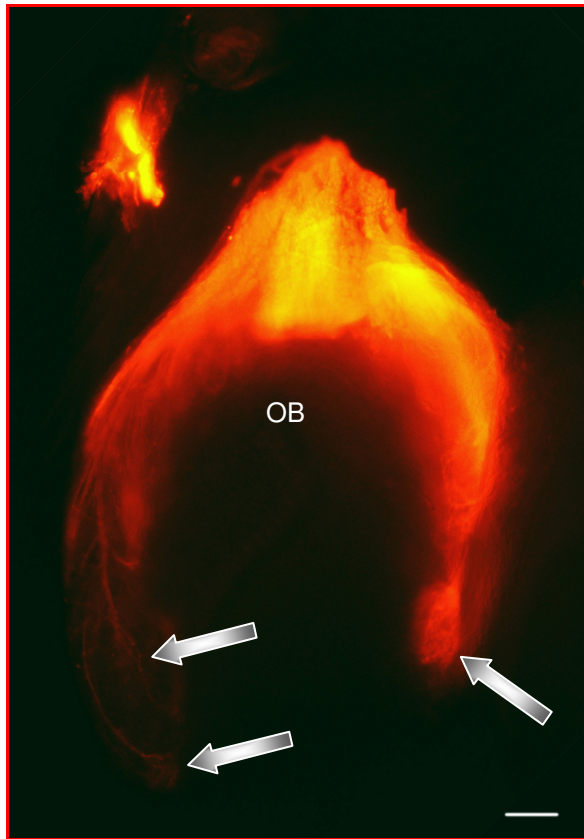


Fig. 40 (sinistra) Applicazione di cristalli di DiI alla mucosa olfattiva. Evidente la marcatura dello strato glomerulare del bulbo olfattivo (OB). Visibili glomeruli marcati (freccie grigie). Fig. 41 (destra) Il fascio EBOS (freccia) oltrepassa il bulbo olfattivo e percorre il telencefalo (TEL) in posizione ventro-mediale, per decussare alla commessura anteriore (AC). Scale bar 50  $\mu$ m.

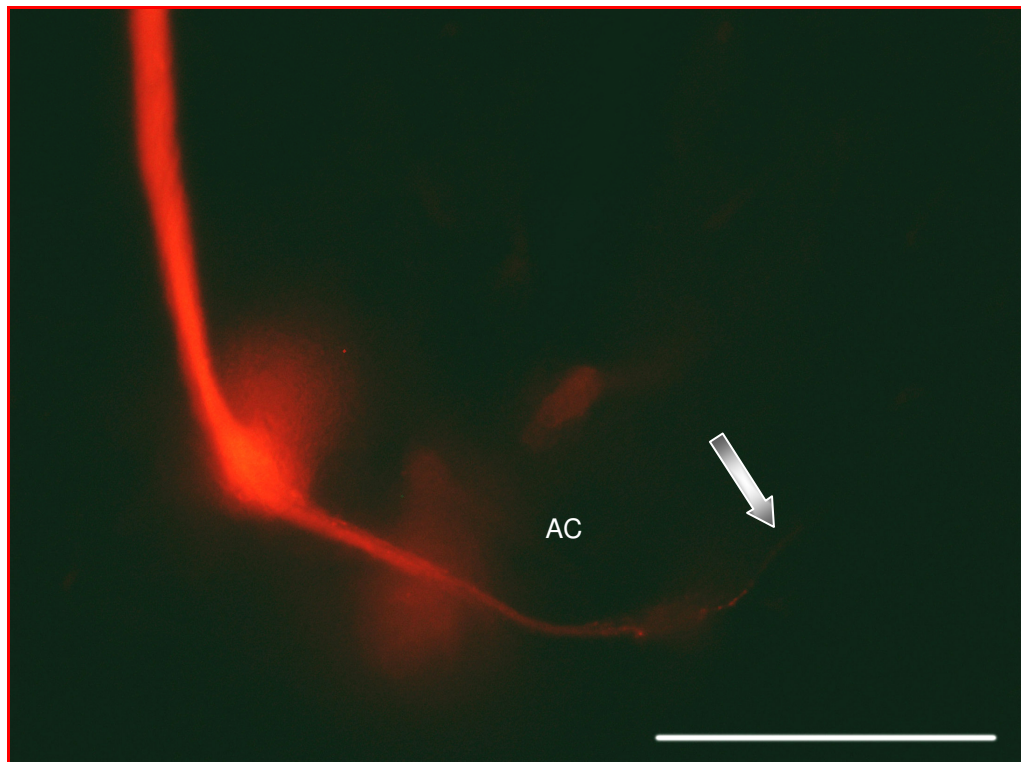


Fig. 42 Fibre del fascio EBOS alla commessura anteriore (AC). La freccia indica le fibre che proiettano al telencefalo controlaterale. Scale bar 50  $\mu$ m.

*Astyanax fasciatus mexicanus*: doppia marcatura con applicazione di biocitina alla camera olfattiva e immunistochemica per il peptide FMRFa.

L'applicazione della biocitina alla OM di esemplari di *Astyanax fasciatus mexicanus*, ha permesso la marcatura del sistema di fibre olfattive extrabulbari così come avvenuto tramite l'utilizzo di DiI e DiA. Infatti, anche mediante l'impiego di tale tracciante è possibile rilevare un fascio compatto di fibre che oltrepassa il OB ipsilaterale in posizione medio basale. Lo stesso percorre il TEL (Fig. 43) nella medesima posizione fino alla AC, dove si assiste a decussazione (Fig. 44). Il pattern delle fibre, in definitiva, è sovrapponibile a quello ottenuto con i traccianti lipofilici.

Nei campioni di questa specie, l'immunofluorescenza per l'FMRFa ha dato risultati paragonabili a quelli ottenuti con l'immunistochemica. L'utilizzo della biocitina non ha influenzato in alcun modo la metodologia adoperata.

Allo stesso modo come in *Moenkhausia sanctaefilomenae*, le fibre FMRFa-ir e quelle evidenziate mediante biocitina, condividono le stesse aree encefaliche, con una sovrapposizione areale, ma in nessun caso sussiste colocalizzazione.

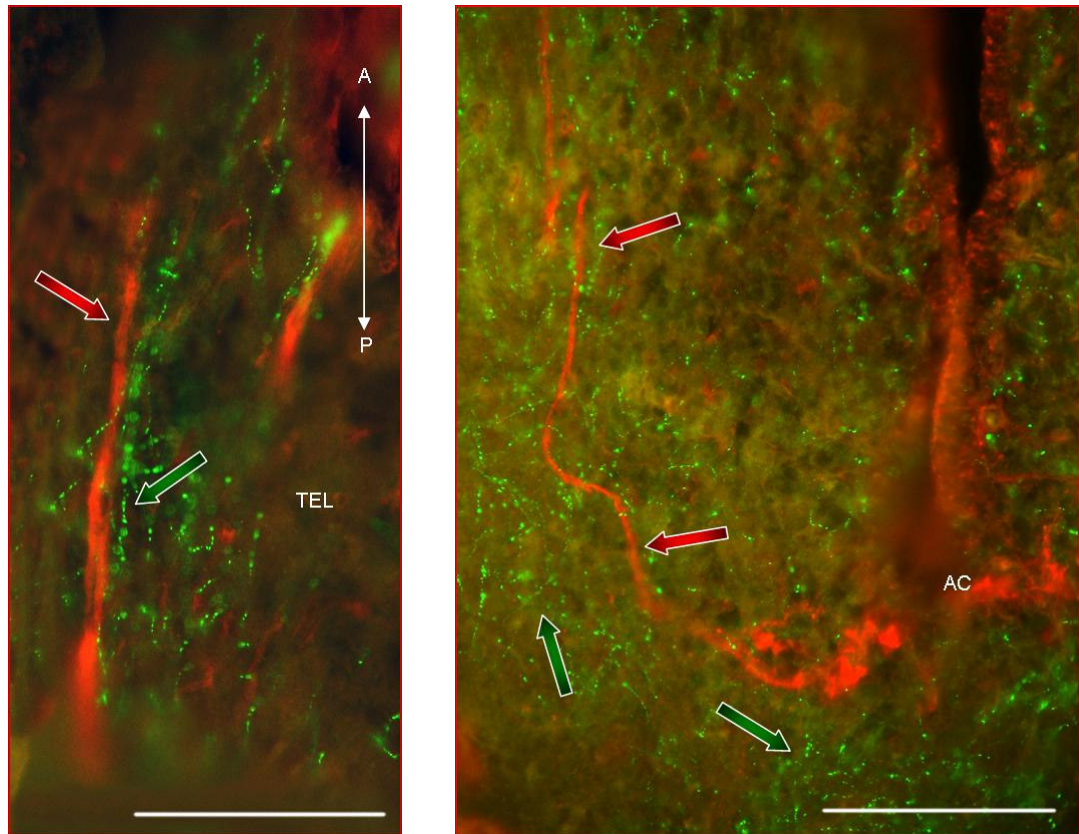


Fig. 43 (sinistra) Applicazione di biocitina alla mucosa olfattiva. Il fascio di fibre EBOS (freccia rossa) decorre parallelamente alle fibre del nervo terminale (freccia verde) lungo la porzione medio-basale del telencefalo (TEL). A, anteriore; P, posteriore. Fig. 44 (destra) Fibre EBOS (freccie rosse) condividono le stesse aree con fibre del nervo terminale (freccie verdi) ma non si assiste a colocalizzazione. AC, commessura anteriore. Scale bar 100  $\mu$ m.

### *Analisi della distribuzione di materiale FMRFa-ir nell'encefalo del teleosteo *Carassius auratus**

*Carassius auratus* presenta i OB pedunculati e mostra vari piccoli aggregati di cellule FMRFa-ir che sono localizzati nel OB stesso, in posizione ventro-mediale (Fig. 45); talvolta, essi costituiscono dei piccoli gangli. La forma di queste cellule appare prevalentemente affusolata ed esse sono orientate secondo la direzione d'allungamento del nervo, in senso antero-posteriore. Il più consistente raggruppamento di neuroni FMRFa-ir si trova all'ingresso del NO, nella parte ventrale del OB. Essi sono di forma prevalentemente sferica, in qualche caso bipolari. E' interessante notare l'ordine di grandezza variabile del corpo cellulare tra le cellule di uno stesso aggregato. Le cellule conteggiate appaiono in numero particolarmente elevato, circa 65 in media per ciascun bulbo. Il valore

medio dimensionale è circa 15  $\mu\text{m}$ , con un minimo di 7  $\mu\text{m}$  ed un massimo di 40  $\mu\text{m}$ .

Le proiezioni di tali cellule (Fig. 46) sono presenti lungo i tratti olfattivi, dai quali raggiungono il TEL basale, decussano in prossimità della AC e raggiungono il DIE.

Nuclei FMRFa-ir si ritrovano in prossimità del PH. Da qui ha origine un sistema di fibre ir che invade tutti i distretti encefalici con una distribuzione che non si discosta da quanto riscontrato nelle altre specie analizzate. Tuttavia, in questa specie le fibre che hanno origine dal gruppo di neuroni bulbari e quelle che hanno origine dal gruppo di neuroni del PH, non sono caratterizzate da calibro differente.

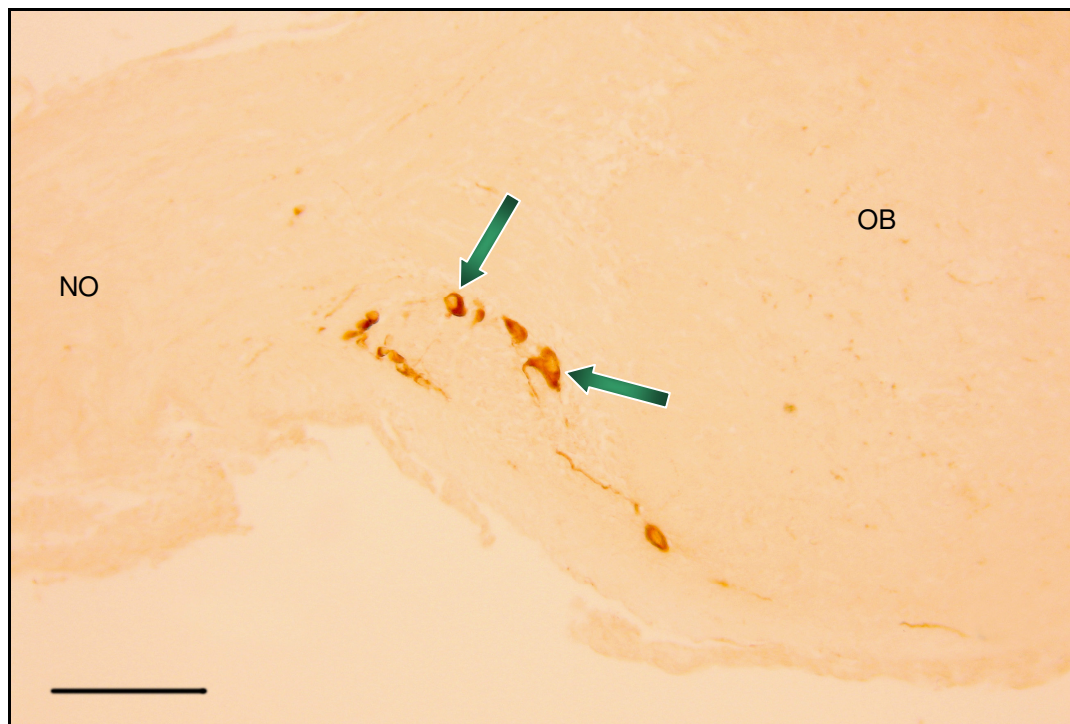


Fig. 45 Cellule ir nel bulbo olfattivo (OB) (freccie). NO, nervo olfattivo. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .

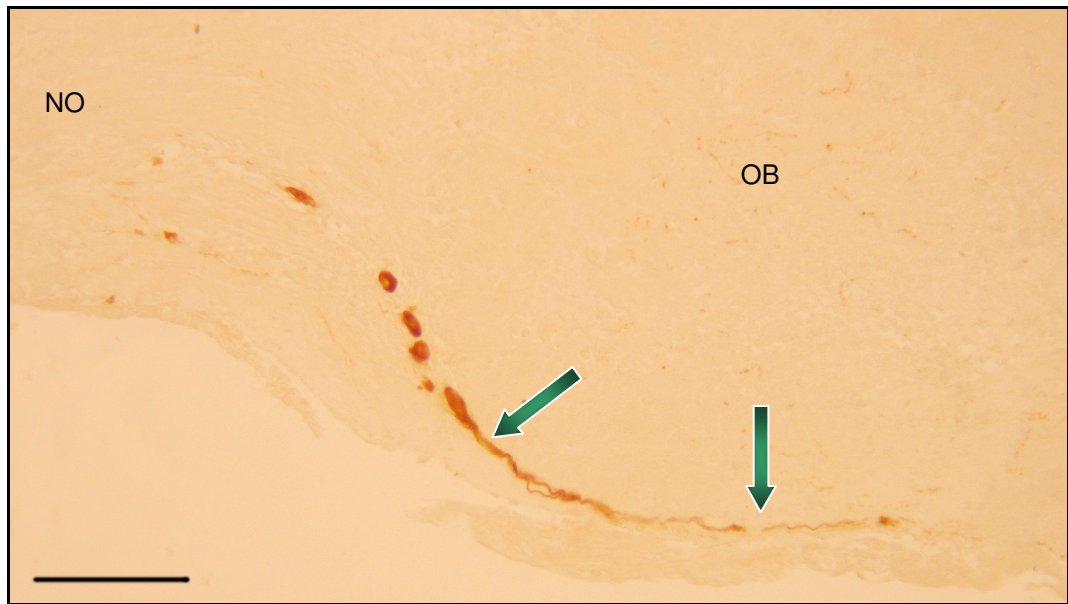


Fig. 46 Fibre del nervo terminale si estendono lungo la porzione medio-basale del telencefalo per raggiungere le regioni del diencefalo. Scale bar 100  $\mu$ m.

*Applicazione cristalli di DiI/DiA alla mucosa olfattiva del teleosteo  
Carassius auratus*

Il pattern di fibre rivelato tramite l'applicazione dei traccianti utilizzati è simile a quello delle specie analizzate in precedenza: un fascio compatto di fibre oltrepassava il OB in posizione medio basale per decorrere il TEL fino al AC (Fig. 47). A questo livello si assiste a decussazione delle fibre nella parte controlaterale. Così come nel caso del *Paracheirodon innesi* e di *Astyanax fasciatus mexicanus*, le fibre nelle regioni palliali e diencefaliche sono in quantità inferiore rispetto a quelle riscontrate in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Fig. 48 e 49).

L'applicazione dei due tipi di traccianti non ha messo in evidenza neuroni lungo il percorso analizzato.

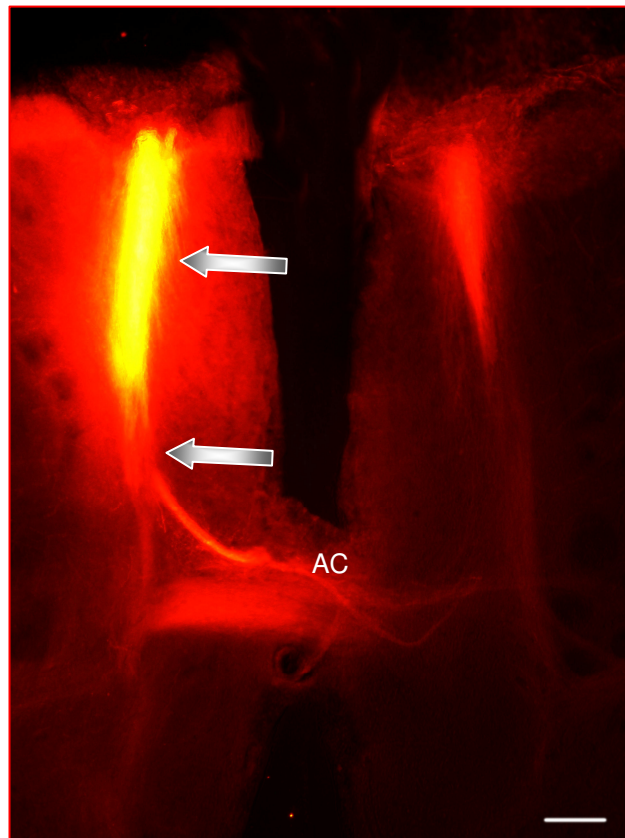


Fig. 47 Fascio di fibre EBOS (frece) attraversa il telencefalo (TEL) in posizione medio basale per decussate alla commessura anteriore (AC). Scale bar 100  $\mu$ m.

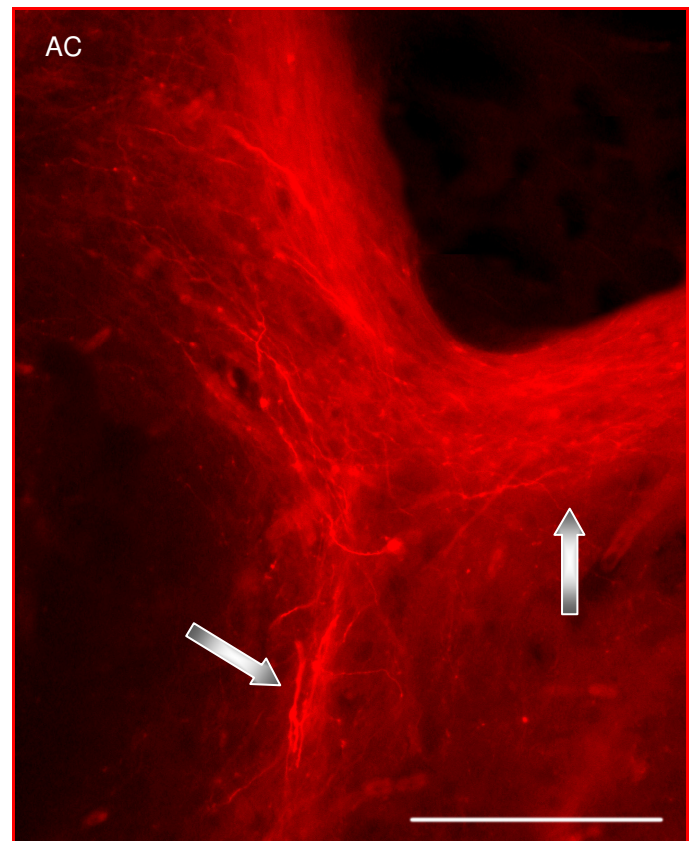
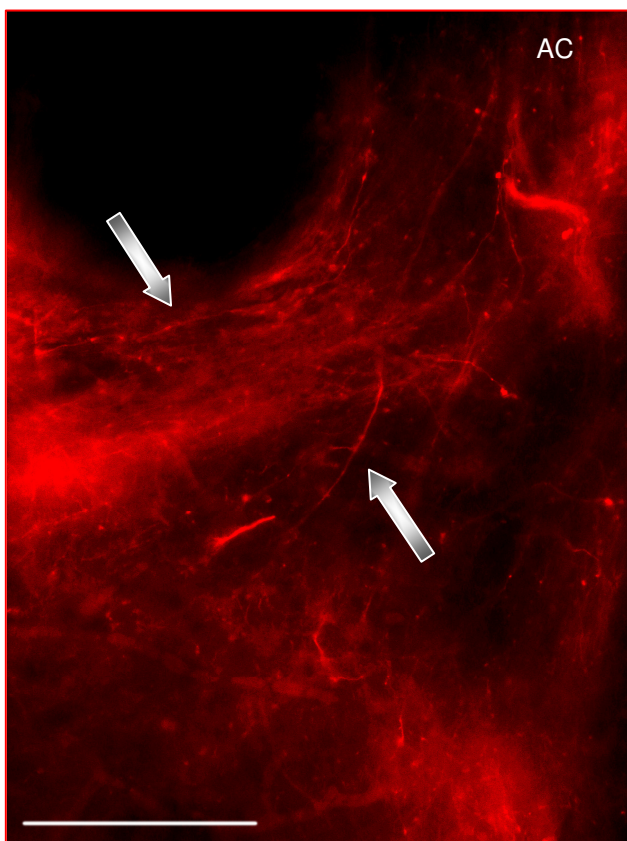


Fig. 48 (sinistra) Fibre del fascio EBOS (frece) invadono il diencefalo ipsilaterale. Fig. 49 Fibre del fascio EBOS invadono il diencefalo controlaterale (frece). AC, commessura anteriore. Scale bar 100  $\mu$ m.



*Carassius auratus*: doppia marcatura con applicazione di biocitina alla camera olfattiva e immunistochemica per il peptide FMRFa.

In seguito all'applicazione di biocitina alla OM di *Carassius auratus* (Fig. 50), si osserva un fascio compatto di fibre che supera i OB in posizione medio basale, percorre i tratti olfattivi per poi invadere il TEL nella medesima posizione (Fig. 51). Da qui, il fascio raggiunge la AC dove decussa per portarsi poi nelle regioni diencefaliche. Il pattern di fibre segue poi quanto riportato in seguito all'applicazione dei traccianti lipofilici.

L'immunofluorescenza per l'FMRFa rivela la presenza di due principali gruppi di cellule, quelli localizzati in ciascun OB e quello di pertinenza del PH. Da qui hanno origine fibre ir che presentano lo stesso pattern di distribuzione visto per l'immunistochemica per l'FMRFa.

Anche nel *carassius*, i sistemi di fibre messi in evidenza con i due diversi metodi, sono caratterizzati da una discreta sovrapposizione, condividendo le stesse aree encefaliche. In nessun caso si riscontra colocalizzazione di biocitina e materiale FMRFa-simile.

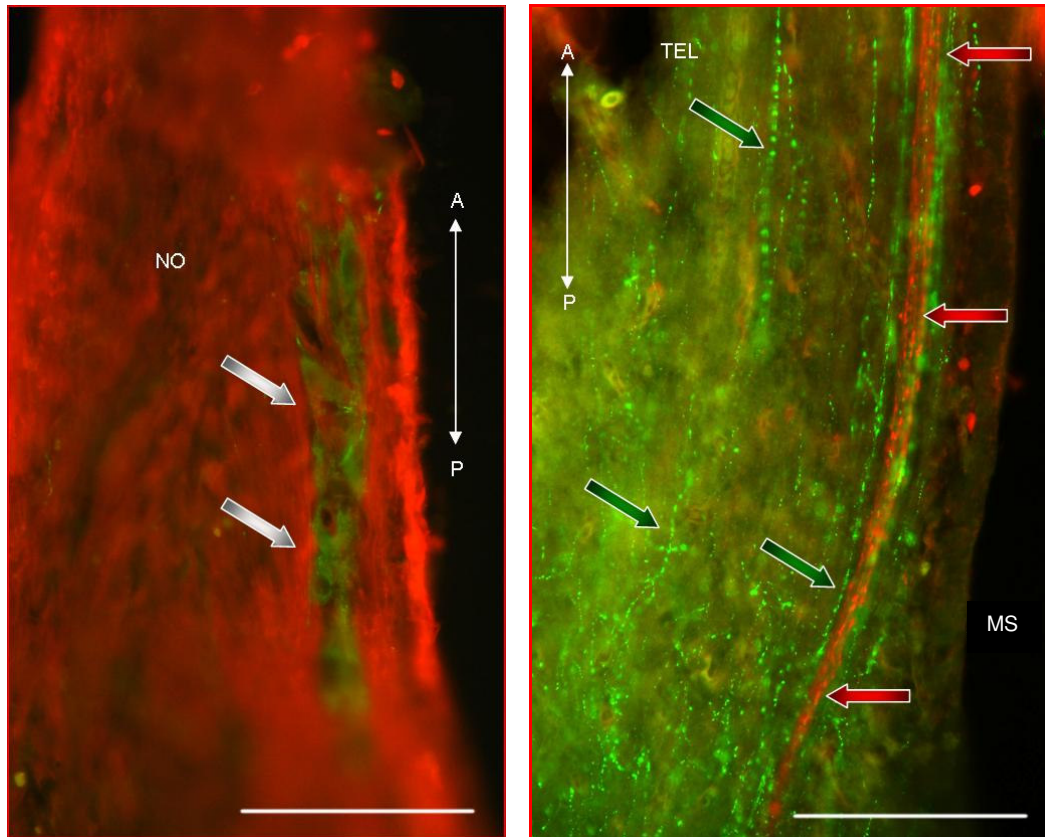


Fig. 50 (sinistra) Neuroni FMRFa-ir del nervo terminale (freccie) nel nervo olfattivo (NO) completamente marcato dalla biocitina. I neuroni non hanno incorporato il tracciante. Fig. 51 (destra) Fascio di fibre EBOS (freccie rosse) che decorre parallelamente alle fibre del nervo terminale (freccie verdi). MS, setto mediano. Scale bar 100  $\mu$ m.

## ANFIBI

*Rana esculenta*: applicazione tracciante DiI alla mucosa olfattiva o al nervo tranciato durante lo sviluppo.

Il primo stadio di sviluppo in cui è stato possibile applicare con successo la tecnica è il 26 (tavola di sviluppo di Witschi, 1956). Negli stadi precedenti, le strutture olfattive erano troppo piccole per applicare correttamente il tracciante. Il complesso olfattivo/vomeronasale, che contiene le fibre dell'EBOS, appare, in tutti i campioni, fortemente marcato, così come lo strato glomerulare dei OB principali e accessori. Posteriormente, fibre singole e in fasci compatti, oltrepassano chiaramente i OB principali invadendo il cervello. Maggiori differenze riscontrate, analizzando differenti stadi di sviluppo, riguardano il numero delle fibre EBOS, la loro estensione nel cervello e, in alcuni casi, differenti target (Fig. 52).

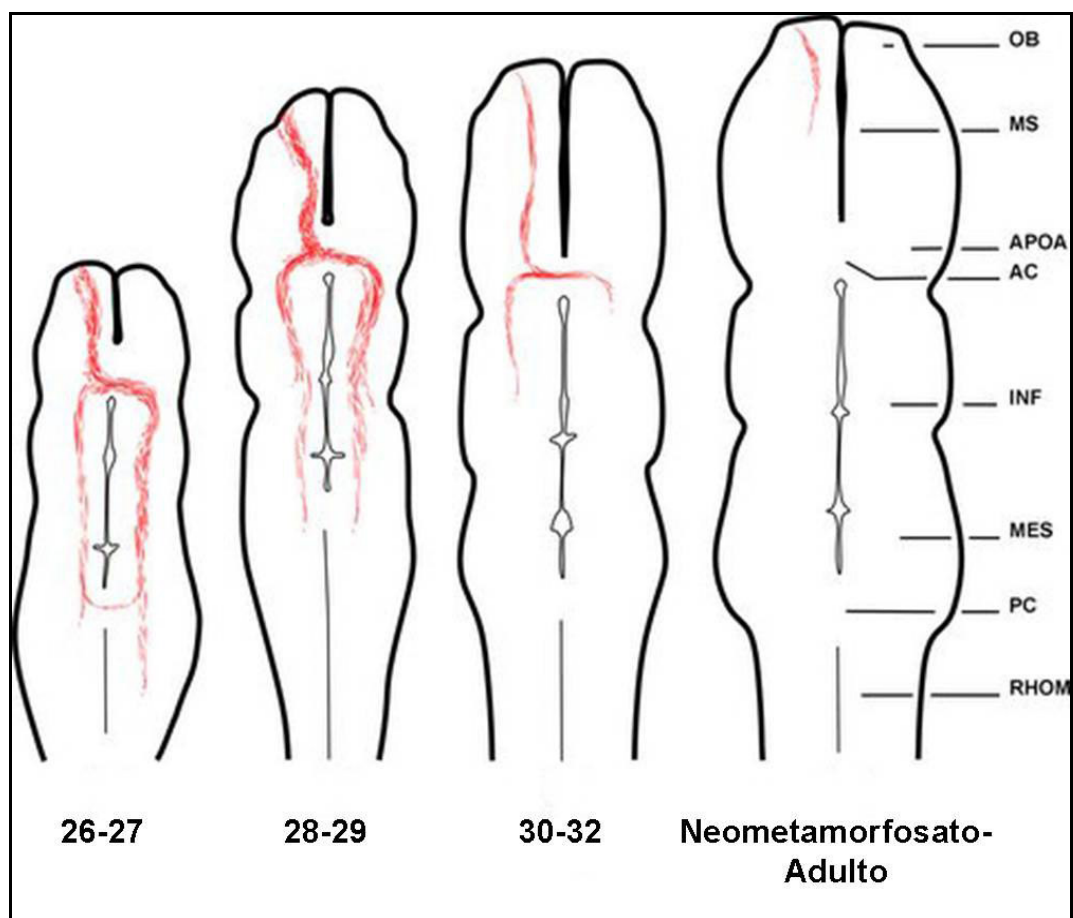


Fig. 52 Prospetto delle estensioni dell'EBOS durante lo sviluppo in *Rana esculenta*.

### ***Stadio 26-27***

Nello stadio 26-27, nonostante fosse marcato il OB principale ipsilaterale, alcune fibre marcate del NO innervano i glomeruli controlaterali. Nella parte posteriore, le fibre oltrepassavano il OB ipsilaterale (Fig. 53) ed emergevano a livello della sua regione mediolaterale, come singole fibre o raggruppate in 3-4 fasci compatti (Fig. 54). Tutti questi elementi, convergendo medialmente, continuano lungo il TEL medio-basale fino alla AC (Fig. 55). Alcune fibre, lasciato il ramo telencefalico mediale, girano lateralmente e terminando a livello della MSA. Solo raramente alcune fibre sono state viste in una sezione più dorsale del TEL mediale. Un'interessante caratteristica dell'EBOS lungo il suo corso telencefalico, è la ramificazione delle fibre, che aumenta il numero totale di fibre che proietta posteriormente. Tale fenomeno è presente anche in altre aree del cervello, ma molto meno frequente. Procedendo posteriormente, la maggior parte delle fibre, singole od organizzate in fasci, decussa a livello della AC raggiungendo la parte controlaterale, mentre alcune di esse girano lateralmente ad innervare il pallio posteriore ipsilaterale. In entrambe le parti dell'encefalo, le fibre corrono a livello caudale fino alla AC, dove esse si spargono parzialmente e, circondando il recesso preottico (POR) (Fig. 55), alcune di esse innervano il nucleo preottico ipsilaterale. Il numero di tali fibre incrementa progressivamente durante l'ontogenesi. Le fibre dell'EBOS continuano posteriormente come singole fibre e fasci compatti nella parte controlaterale (Fig. 56), mentre solo singole fibre procedono lungo la parte ipsilaterale. Inoltre il loro numero è maggiore nella regione controlaterale. Procedendo in posizione ventrolaterale nel DIE, poche fibre lasciano il ramo principale per raggiungere l'infundibulo, mentre parte d'esse, passando attraverso il talamo, continuano caudalmente e spargendosi nel MES. Da qui, alcune fibre controlaterali raggiungono la parte ipsilaterale a livello della AC. Fibre EBOS, anche se in numero

scarso, si osservano anche nel ROMB (Fig. 55). Nonostante l'ammontare di fibre, si osservano alcuni neuroni marcati, ma solo negli stadi 26, 27 e 28. Tali neuroni sono localizzati nel TEL anteriore basale, dietro il ventricolo del TEL basale ipsilaterale e appaiono in sezioni in cui era visibile anche l'EBOS. Essi erano molto pochi, circa 20, con morfologia circolare o allungata in senso antero-posteriore.

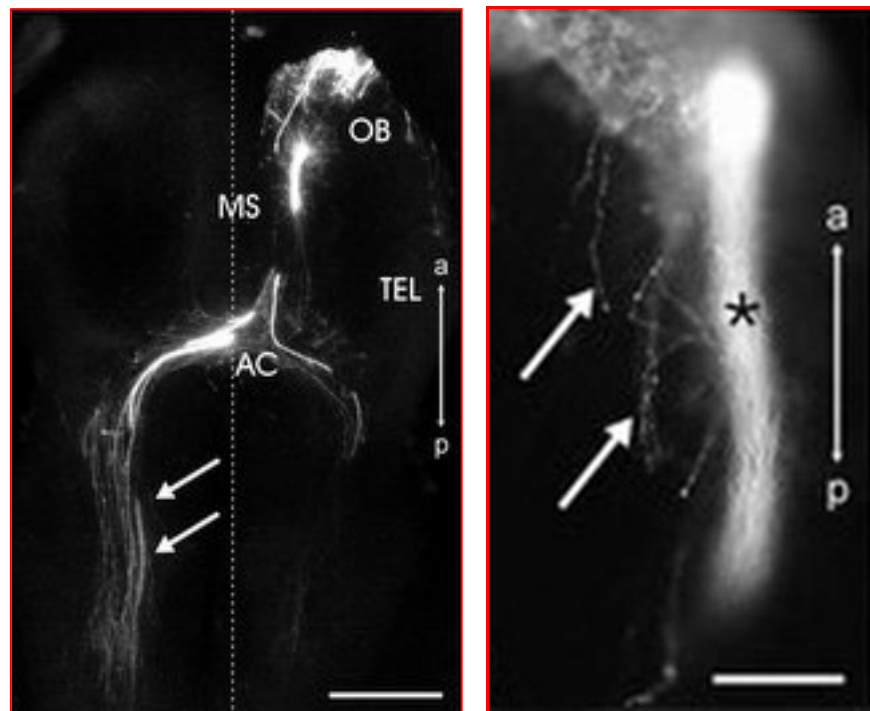


Fig. 53 (sinistra) Applicazione DiI alla mucosa olfattiva (OM) destra di un girino allo stadio 26. In seguito al trattamento è marcato il solo bulbo olfattivo (OB) ipsilaterale. TEL, telencefalo; MS, setto mediano; AC, commessura anteriore; a, anteriore; p, posteriore. Le frecce indicano il ramo di fibre che invade la porzione controlaterale. Fig. 54 (destra) Particolare della Fig. 53. L'EBOS oltrepassa il bulbo olfattivo sotto forma di fasci di fibre (asterisco) o singole fibre (frecce). a, anteriore; p, posteriore. Scale bar Fig. 53, 200  $\mu$ m; Fig. 54, 50  $\mu$ m.

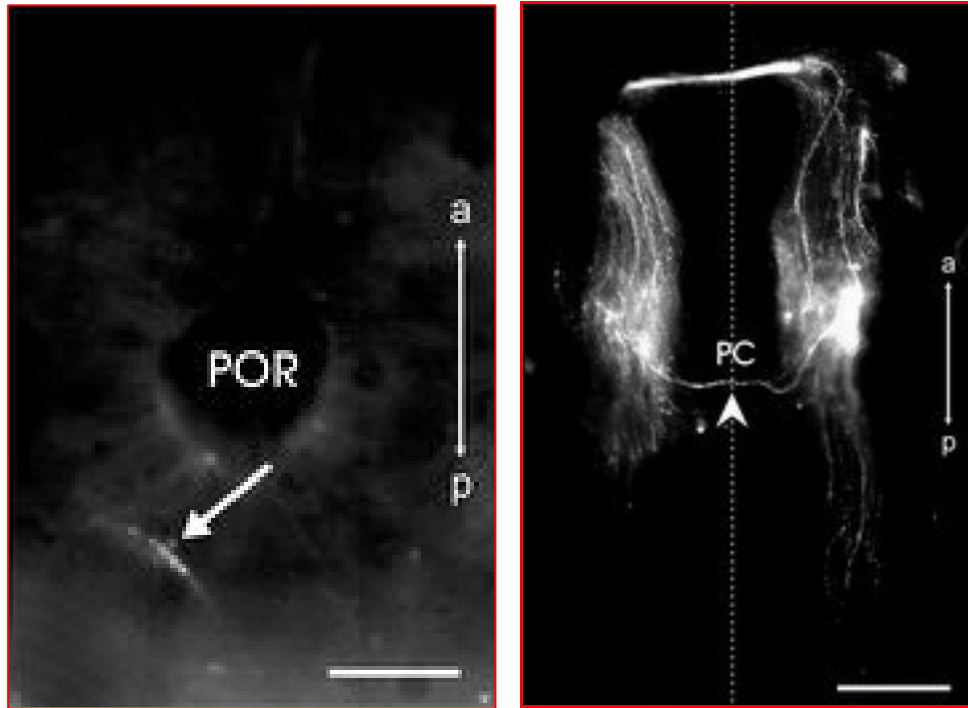


Fig. 55 (sinistra) Girino allo stadio 26. Fibre EBOS circondano il recesso preottico (POR). Fig. 56 (destra) Girino allo stadio 26. Fibre EBOS, in seguito a decussazione alla commessura posteriore (PC) si estendono alle regioni del rombencefalo. a, anteriore; p, posteriore. Scale bar 200  $\mu$ m.

### ***Stadio 28-31***

Dallo stadio 28 al 31, è presente una rete di fibre meno estesa dopo l'applicazione del tracciante (Fig. 57). A livello anteriore, il sistema sembra essere simile a quello degli stadi precedenti. Tuttavia, i fasci di fibre osservati a livello caudale rispetto ai OB, appaiono più sottili rispetto a quelli degli stadi precedenti (Fig. 57A). Anche il numero delle fibre singole che oltrepassano il OB sono ridotte nel numero. Comunque, poche fibre oltrepassano i OB a livello laterale: esse decorrono la parete laterale del TEL, terminando nella sua parte laterale. Solo singole fibre, e pochi fasci, si ritrovano dopo la AC (Fig. 57B). Esse invadono il talamo e l'ipotalamo. Interessante notare che a questo stadio il nucleo preottico appare innervato sia nella sua parte ipsilaterale, che in quella controlaterale. L'ammontare di fibre e la loro estensione ai due lati dell'encefalo, posteriormente alla AC, al contrario dei precedenti stadi di

sviluppo studiati, appare abbastanza equivalente, dal momento che le fibre non si estendono fino al MES (Fig. 57C).

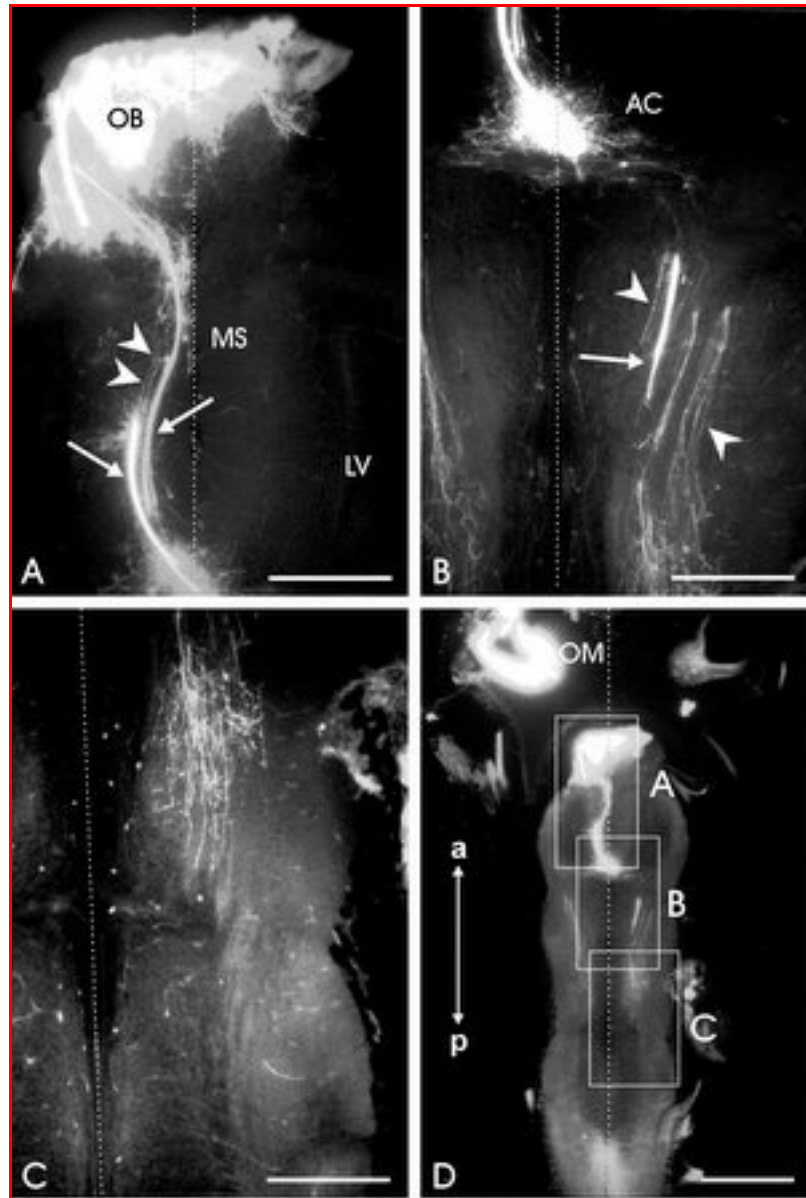


Fig. 57 Girino allo stadio 28. Il fascio EBOS che oltrepassa il bulbo olfattivo (OB) appare più sottile rispetto agli stadi precedenti (A, D). In seguito a decussazione, pochi fasci (freccia) e, in maggior parte, singole fibre (teste di freccia) si estendono nelle regioni del diencefalo (B). Le fibre del sistema EBOS raggiungono al massimo le regioni talamiche ed ipotalamiche. OM, mucosa olfattiva; MS, setto mediano; LV, ventricolo laterale; AC, commessura anteriore. Scale bar A-C, 150  $\mu$ m; D, 500  $\mu$ m

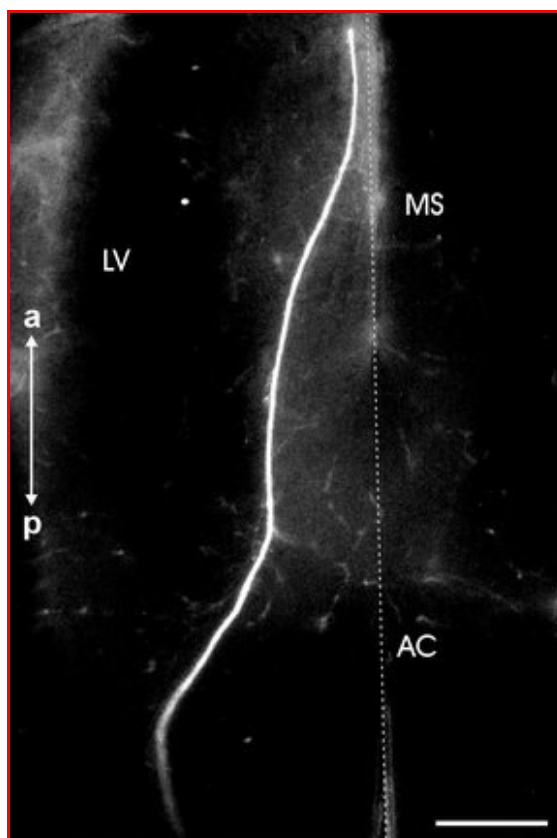


Figura 11 Girino allo stadio 30. Evidente la regressione del sistema di fibre. Il fascio è più sottile rispetto agli stadi precedenti. L'EBOS raggiunge al massimo le regioni diencefaliche. Scale bar 500  $\mu$ m.

### *Stadio metamorfosato – adulto*

Nei campioni metamorfosati, il sistema di fibre mostra alcune rimarcabili differenze rispetto agli stadi precedenti, dal momento che si verifica una ulteriore riduzione generale del sistema di fibre (Fig. 58). Infatti, le fibre marcate non terminano oltre il talamo, diminuendo ovunque in numero, mentre anche la porzione di fibre che decussa a livello della AC era notevolmente diminuita, rendendo quindi più consistente il gruppo di fibre ipsilaterale. Non si osservano fibre marcate in altre regioni del cervello.

Un'ulteriore riduzione del sistema di fibre si osserva nei campioni adulti. Non si osservano fasci di fibre e solo fibre singole oltrepassano i OB terminando il loro percorso prima della AC nella MSA (Fig. 59).



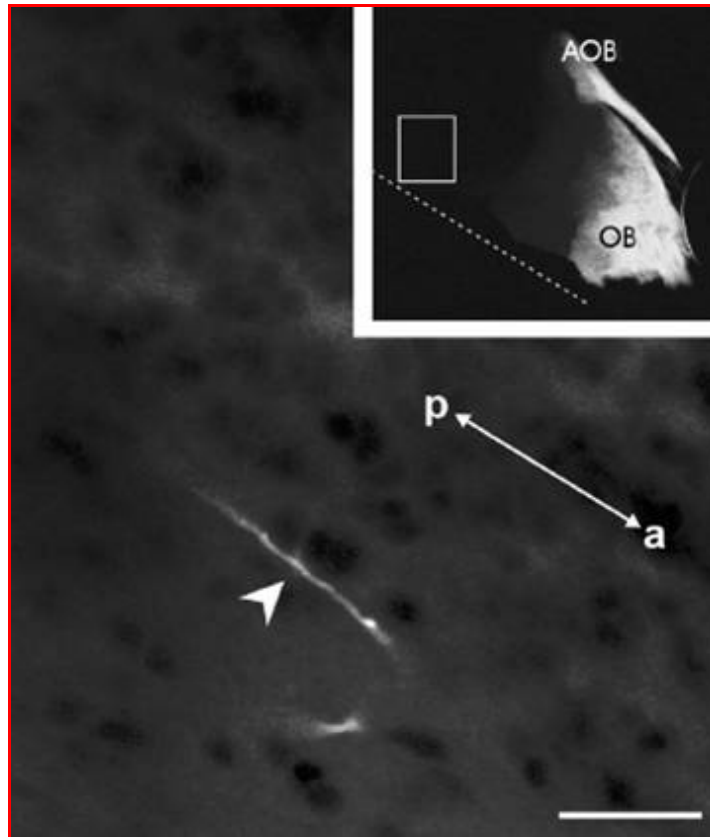


Fig. 59 Rana adulta. Presenti poche o singole fibre in prossimità dell'area mediana del setto. Scale bar 200  $\mu\text{m}$ .

*Rana esculenta*: doppia marcatura con applicazione di biocitina alla camera olfattiva e immunostochimica per il peptide FMRFa

L'applicazione *in vivo* del tracciante neuronale biocitina in campioni di *Rana esculenta* durante lo sviluppo, ha messo in evidenza un sistema di fibre che oltrepassa i OB (Fig. 60). In seguito alla migrazione, risulta marcato unicamente il NO e il OB ipsilaterale. Il pattern di fibre che oltrepassano i OB è variabile, in relazione allo stadio di sviluppo analizzato. In ogni modo, la distribuzione delle fibre marcate con biocitina è perfettamente sovrapponibile a quella ottenuta con l'utilizzo del DiI per quanto concerne estensione, quantità e campi terminali.

L'utilizzo della biocitina non ha minimamente influenzato l'immunofluorescenza per il peptide FMRFa. I dati ottenuti da tale procedimento rispecchiano i risultati presenti nel lavoro di D'Aniello et al. (1996).

I tutti gli stadi di sviluppo analizzati (Fig. 60-63), i due sistemi oggetto di studio condividono le stesse aree encefaliche. È presente sovrapposizione delle fibre marcate; tuttavia, in nessun campione e in nessuno stadio di sviluppo, è presente colocalizzazione di biocitina e materiale FMRFa-ir.

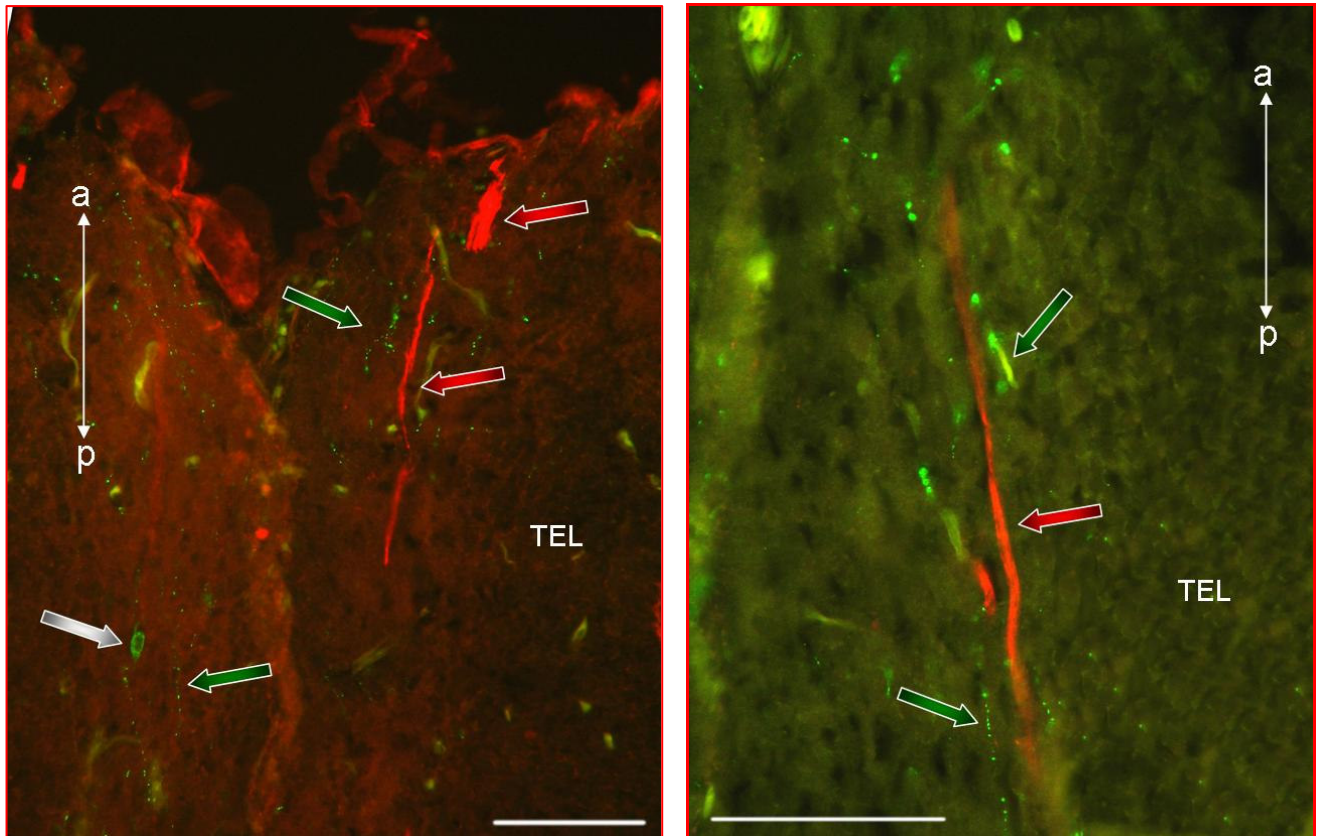


Fig. 60 (sinistra) Girino allo stadio 26. Fibre EBOS (freccie rosse) rivelate in seguito all'applicazione di biocitina alla mucosa olfattiva destra. Presenti fibre (freccie verdi) e neuroni (freccia grigia) appartenenti al nervo terminale. TEL, telencefalo; a, anteriore; p, posteriore. Fig. 61 (destra) Girino allo stadio 28. Fibre EBOS (freccia rossa) condividono le stesse aree con fibre del nervo terminale (freccie verdi). TEL, telencefalo; a, anteriore; p, posteriore. Scale bar 100 µm.

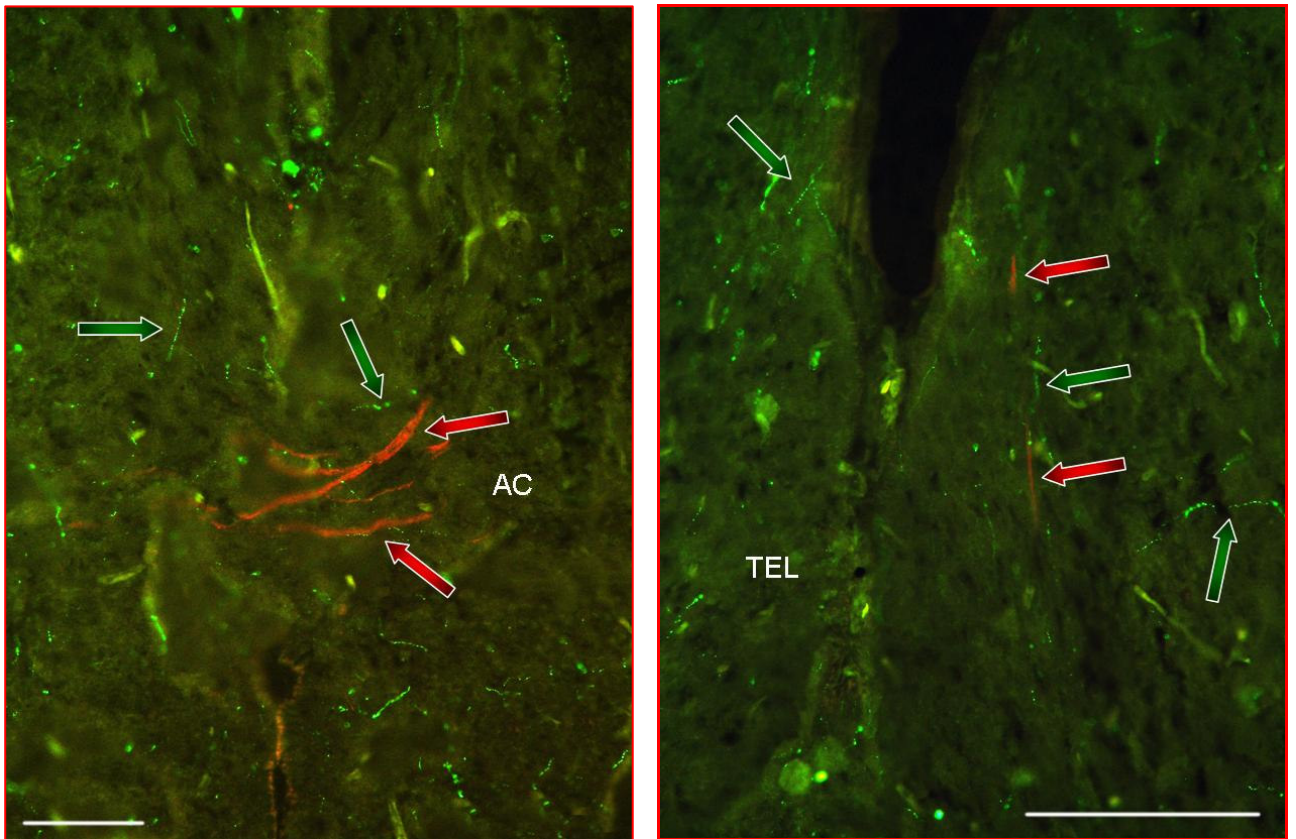


Fig. 62 (sinistra) Girino stadio 30. Fibre EBOS (freccette rosse) e fibre del nervo terminale (freccette verdi) in prossimità della commessura anteriore (AC). Fig. 63 (destra) Fibre EBOS (freccette rosse) e fibre del nervo terminale (freccette verdi) nell'area mediana del setto. Dalle figure si evince che non è presente colocalizzazione. Scale bar 100  $\mu$ m.

### *Rana esculenta: immunoistochimica per la PCNA*

#### **Stadio 25-26**

In questo stadio, l'encefalo appare morfologicamente ben sviluppato. Infatti, sono abbastanza riconoscibili le principali aree. La componente olfattiva, invece, è in attiva morfogenesi (Fig. 64): la OM è costituita solo da epitelio sensoriale con ciglia molto brevi. Non sono presenti elementi ghiandolari. L'organo vomeronasale non è ancora abbozzato e le coane sono aperte.

L'attività PCNAasica, a livello dell'encefalo, si distribuisce prevalentemente a ridosso dei ventricoli. Tuttavia, l'attività non è circoscritta al neuroepitelio, ma si ritrovano nuclei ir anche nel parenchima, anche se l'intensità dell'immunopositività diminuisce nel momento in cui

ci si allontana dal neuroepitelio stesso. Nei ventricoli telencefalici, l'attività è principalmente localizzata nella regione basale e mediale del ventricolo.

Il POR, a questo stadio dello sviluppo, è poco ir.

Procedendo in senso antero-posteriore, nuclei ir si ritrovano nella regione del DIE. Nessun nucleo ir si ritrova nelle abenule. Nell'ambito del terzo ventricolo, l'immunoreattività presenta una diversa distribuzione: a livello dorsale (nucleo talamico anteriore) e basale (talamo ventrale) si ritrovano nuclei ir a ridosso del neuroepitelio e nel parenchima, mentre nella regione mediale, i nuclei ir sono presenti solo a ridosso del ventricolo. L'ipotalamo ventrale presenta una forte intensità, con nuclei ir sia nel parenchima sia nel neuroepitelio. Nell'infundibulo, l'immunoreattività presenta lo stesso pattern generale descritto in precedenza, ma l'intensità della stessa risulta inferiore rispetto agli altri distretti encefalici. Nuclei ir si ritrovano anche a livello del midollo. Da notare che nuclei ir si ritrovano prevalentemente nel IV ventricolo.

I nervi olfattivi appaiono scarsamente ir. Nell'ambito dell'epitelio olfattivo, l'attività PCNAasica non è limitata unicamente alle regioni basali in quanto nuclei ir sono presenti anche a livello apicale con alcuni di essi che sporgono nel lume della mucosa (Fig. 65). Comunque, le cellule ir sono soprattutto localizzate nella porzione basale dell'epitelio. Da rilevare che i nuclei ir sono concentrati principalmente nella zona interna ed esterna della mucosa, mentre al centro sono scarsi.

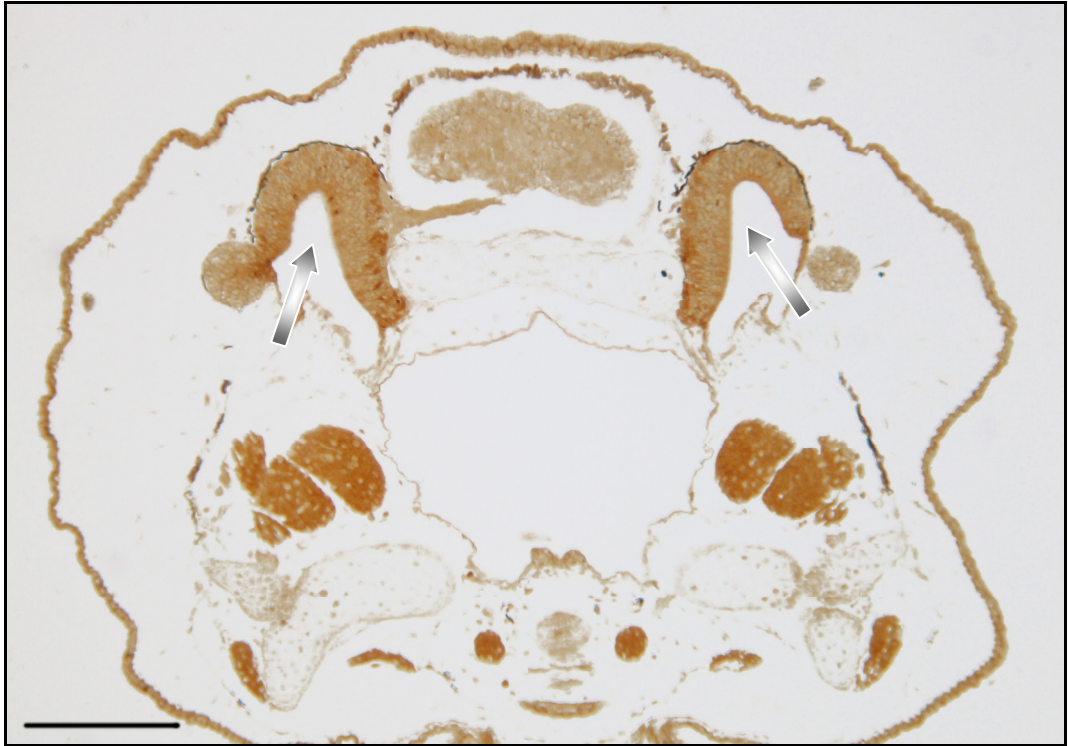


Fig. 64 Girino allo stadio 25. Evidenti i primi processi di invaginazione (frece). Scale bar 100  $\mu$ m.

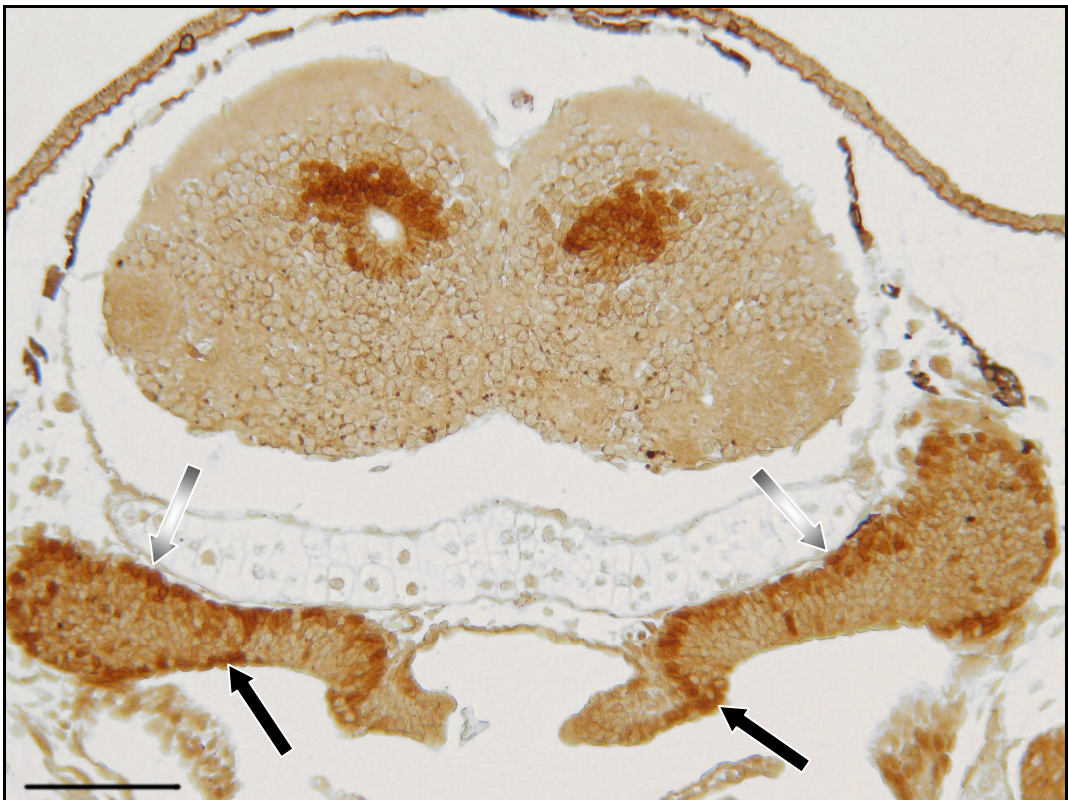


Fig. 65 Girino allo stadio 26. L'immunoreattività alla PCNA è localizzata a livello basale (frece grigie) ed apicale (frece nere). Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio 27-28***

Il grado di differenziamento dell'encefalo ha assunto quasi le caratteristiche dell'adulto. Infatti, rispetto allo stadio precedente, i diversi distretti encefalici sono maggiormente distinguibili.

La morfogenesi della componente olfattiva procede con l'inizio della formazione dell'organo vomeronasale (Fig. 66). Difatti, è ben distinguibile un diverticolo che si spinge internamente a formare la struttura. Come nello stadio precedente, la mucosa presenta solo aree sensoriali, a parte il tubulo della narice e delle coane che sono non sensoriali. Non si evidenziano ghiandole all'interno. Le ciglia dell'epitelio olfattivo sono più sviluppate e aumentate di dimensioni. Le coane sono aperte.

L'attività PCNAasica segue ancora il pattern di distribuzione visto nello stadio precedente, con nuclei a ridosso del neuroepitelio e nel parenchima. Come nello stadio precedente, si ritrovano nuclei ir nel TEL a ridosso dei ventricoli, nel DIE a livello del nucleo talamico anteriore e posteriore. Un'intensa immunoreattività è presente anche a livello del MES. È evidente la stratificazione del tetto ottico.

Dato differente rispetto allo stadio precedente, è l'intensa immunopositività a livello dell'infundibolo. Anche qui, i nuclei ir seguono il pattern descritto in precedenza, con cellule ir a ridosso del ventricolo e nel parenchima.

Nell'ambito dell'epitelio olfattivo, la distribuzione dei nuclei ir segue un pattern paragonabile allo stadio 25. Infatti, le cellule ir sono prevalentemente concentrate nella parte basale rispetto a quella apicale. Ciò non toglie, che nella regione apicale siano presenti nuclei ir, anche se più rari.

In prossimità del diverticolo (abbozzo del vomeronasale), la presenza di nuclei ir si fa più cospicua. La forte attività proliferativa indica la formazione di una nuova struttura, il vomeronasale (Fig. 66).

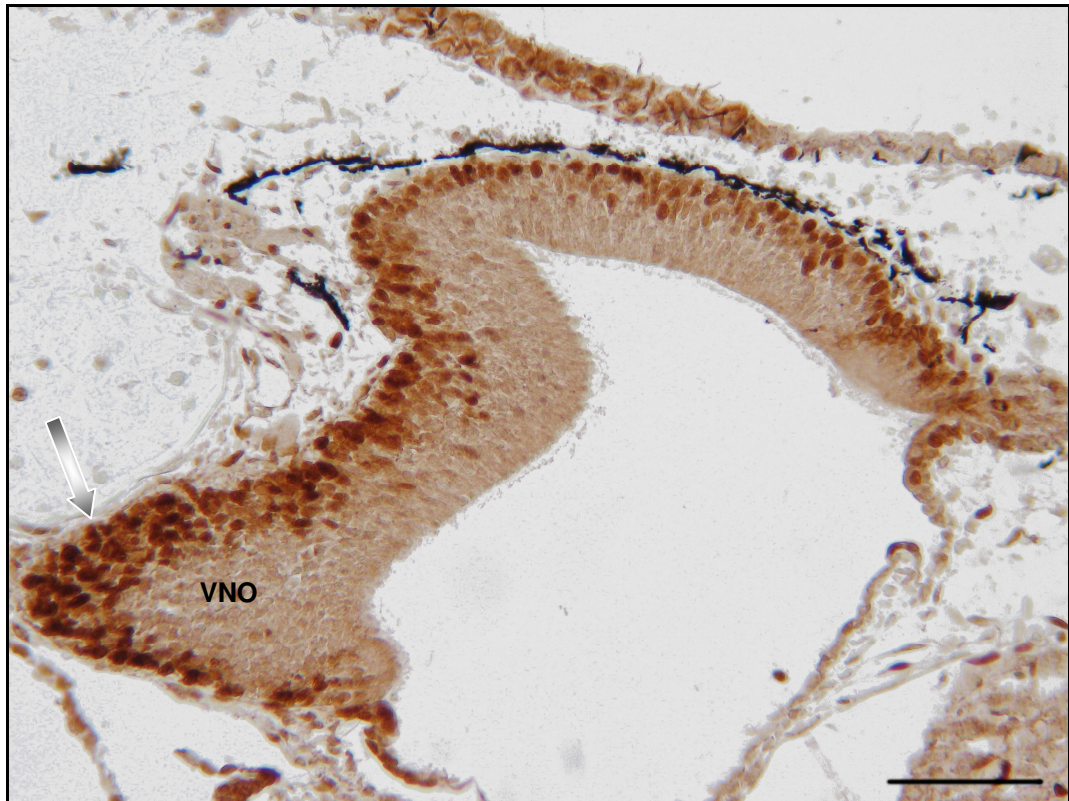


Fig. 66 Girino allo stadio 27. Formazione dell'organo vomeronasale (VNO). Intensa attività immunoreattiva (freccia) in prossimità del diverticolo di neo-formazione. Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio 29-30***

La morfologia dell'encefalo presenta delle caratteristiche paragonabili a quelle dello stadio precedente. Tuttavia, le dimensioni sono maggiori.

La morfogenesi della componente olfattiva prosegue con la formazione del vomeronasale. In questo stadio, l'organo di Jacobson ha quasi raggiunto le sue dimensioni finali (Fig. 67). Presenti anche microvilli a ricoprire l'epitelio sensoriale della struttura. Chiaro ed evidente il collegamento tra l'organo stesso e la camera olfattiva.

Nell'ambito dell'organo olfattivo, è possibile distinguere una regione non sensoriale, respiratoria, costituita da un epitelio olfattivo più sottile rispetto a quello sensoriale. La componente respiratoria presenta una regione confinante con la porzione sensoriale ed, inoltre, una porzione che forma una cavità posizionata dorsalmente al vomeronasale (Fig. 67). Le ciglia dell'epitelio sensoriale della mucosa sono maggiormente differenziate e

presentano dimensioni maggiori rispetto a quelle presenti nello stadio precedente. Da rilevare la presenza di ciglia anche sull'epitelio respiratorio, di dimensioni ridotte rispetto a quelle dell'epitelio sensoriale. Non sono ancora presenti elementi ghiandolari.

Complessivamente, si può osservare una diminuzione dell'attività PCNAAsica in tutto l'encefalo rispetto allo stadio precedente. Solo determinate aree conservano una certa immunoreattività. Infatti, nel TEL, la localizzazione dei nuclei ir è circoscritta al neuroepitelio e le cellule ir nel parenchima sono molto rare. L'attività presenta un'intensità paragonabile a quella dello stadio precedente. I nuclei sono principalmente localizzati nella zona centrale e ventrale del ventricolo; nella zona dorsale invece è ridotta. Forte ed evidente, è anche l'immunoreattività nella MSA. Nuclei ir sono presenti anche a livello del POR.

Spostandosi posteriormente, a livello del DIE, l'attività presenta un pattern così descritto: nella zona dorsale, a livello del nucleo talamico anteriore, è presente una forte attività, come riscontrata nello stadio precedente; nella porzione centrale (talamo ventrale), il numero di cellule ir diminuisce e ancor di meno si ritrovano nella regione dell'ipotalamo ventrale. Le abenule sono prive di attività PCNAAsica.

La regione infundibolare presenta, invece, una forte attività: infatti, cellule ir sono localizzate a ridosso del ventricolo e nel parenchima dell'infundibolo.

L'attività è presente anche a livello del MES. L'immunopositività è rilevata a ridosso del ventricolo del tetto ottico, anche se in numero maggiore nella sua porzione centrale.

A ridosso del ventricolo mesencefalico, gli elementi PCNA immunoreattivi (PCNA-ir) sono cospicui, presenti a ridosso del neuroepitelio e nel parenchima prossimale del tegmento dorsale. Rari sono i nuclei a livello del tegmento ventrale.



Nel ROMB, rari nuclei sono presenti a ridosso del IV ventricolo.

Anche in questo stadio dello sviluppo, l'attività PCNAasica è localizzata principalmente a livello basale dell'epitelio olfattivo, sia sensoriale sia respiratorio. Da constatare, in ogni modo, che il numero di cellule ir nella porzione sensoriale, localizzate in posizione mediale e apicale, è maggiore rispetto allo stadio 27. Nell'ambito della mucosa, l'attività è molto più accentuata a livello dorso-laterale.

Anche nell'ambito del vomeronasale, l'immunoreattività è principalmente localizzata nella zona basale. Il numero di elementi ir è maggiormente presente nella regione interna dell'organo rispetto a quella esterna.

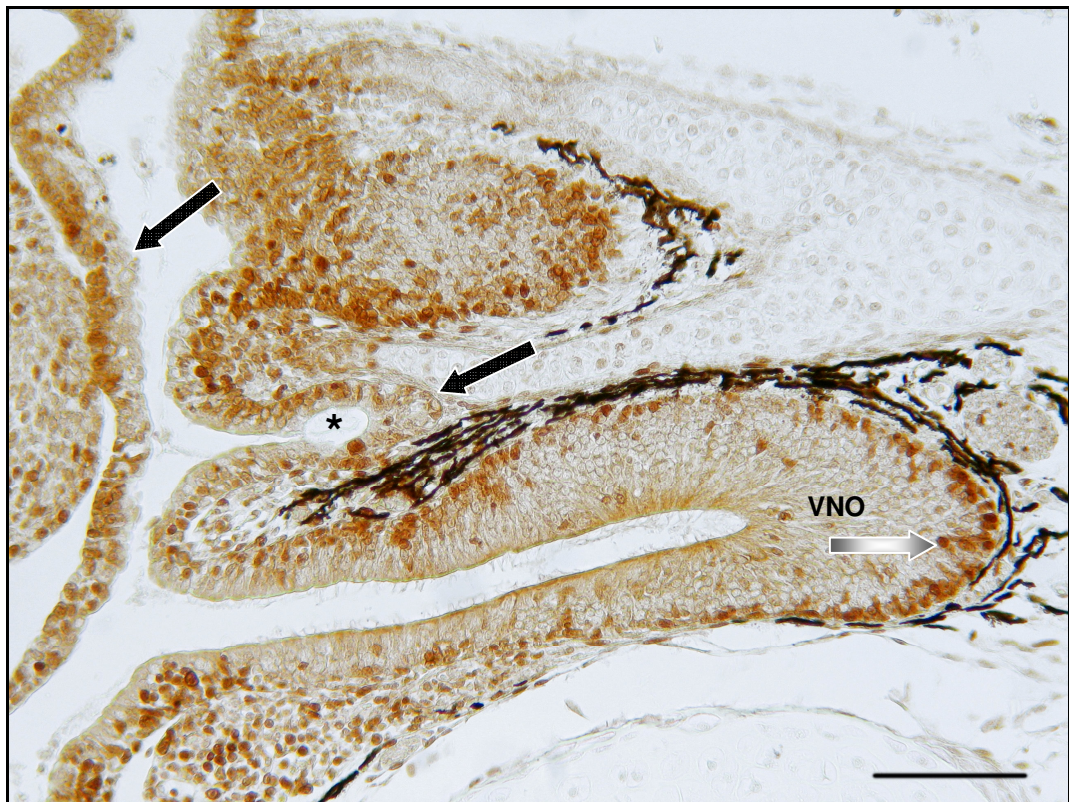


Fig. 67 Girino allo stadio 29. Il vomeronasale (VNO) ha quasi raggiunto la sua struttura definitiva. L'attività immunoreattiva in questo organo è principalmente localizzata a livello basale (freccie grigie). Le freccie nere indicano l'epitelio respiratorio. L'asterisco indica l'epitelio respiratorio in posizione dorsale al vomeronasale. Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio 31-32***

La morfologia dell'encefalo in questo stadio di sviluppo è molto simile a quella dello stadio 29. Le dimensioni stesse non sembrano aver subito variazioni.

Evento particolare nell'ambito della componente olfattiva, è la comparsa di elementi ghiandolari, le ghiandole di Bowmann (Fig. 68). Esse sono localizzate maggiormente nella porzione dorsale della OM. Nella porzione anteriore della mucosa gli elementi ghiandolari presentano dimensioni e numero ridotto rispetto a quelle localizzate nella porzione posteriore. A livello dell'apertura delle narici sono assenti ghiandole differenziate.

La morfologia dell'organo olfattivo ha quasi assunto la sua struttura definitiva. Le coane sono aperte, il vomeronasale è ben sviluppato, localizzato in posizione ventrale rispetto alla OM. Esso è chiaramente costituito da una porzione sensoriale, ad epitelio più spesso, e da una porzione non sensoriale, ad epitelio sottile. Anche la OM è costituita da un epitelio sensoriale, più spesso, ed un epitelio respiratorio, il quale si ripiega ventralmente formando una cavità posizionata tra il vomeronasale e la regione sensoriale della OM. Le ciglia della porzione sensoriale della mucosa sono ripiegate su se stesse, e sembrano di dimensioni simili a quelle dello stadio 29. Nell'epitelio respiratorio, le ciglia sono ben sviluppate e non ripiegate, di dimensioni inferiori rispetto a quelle della porzione sensoriale.

Nel vomeronasale, invece, i microvilli sono maggiormente localizzati nella regione sensoriale e rari in quella non sensoriale.

Tutti gli elementi dell'organo olfattivo sono in collegamento tra loro, compreso il vomeronasale.

In generale, il numero degli elementi ir nell'encefalo decresce rispetto allo stadio precedente. Nuclei ir si riscontrano all'altezza dei OB accessori, nella regione dorsale e mediale dei ventricoli telencefalici. Procedendo in

senso antero-posteriore, i nuclei ir sono localizzati maggiormente nelle porzioni ventrali e mediali dei ventricoli del TEL. Solo pochi nuclei sono localizzati nella zona dorso-laterale del neuroepitelio del TEL.

A questo stadio il POR è ancora marcato con un'intensità ed un numero di elementi ir paragonabili a quelli dello stadio 29.

Nel DIE si osservano pochissime cellule ir nella zona del terzo ventricolo, nella zona dorsale del neuroepitelio (talamo dorsale), con altre cellule ir in posizione mediale; assenti invece in posizione ventrale. L'area preottica presenta ancora una forte attività riguardo allo stadio di sviluppo analizzato.

Nell'ipotalamo ventrale, i nuclei ir sono molto rari, mentre nella regione infundibolare, si osservano poche cellule ir a ridosso del neuroepitelio ventrale e mediale del ventricolo, rare nella zona dorsale della stessa cavità. Sporadicamente, sono presenti nuclei ir in prossimità del nucleo talamico posteriore.

Nel MES sono presenti cellule ir nella parte dorsale del ventricolo, in prossimità del tegmento mesencefalico dorsale. Il loro numero è ridotto rispetto allo stadio 29. Nel tetto ottico sono visibili gruppi di cellule ir nella parte dorsale e ventrale del ventricolo ottico. Anche qui il loro numero è inferiore rispetto allo stadio precedente.

Nel midollo allungato non si osservano elementi PCNA-ir.

L'epitelio olfattivo presenta ancora elementi ir. L'attività PCNA-sica e la sua distribuzione, rimangono sostanzialmente invariati rispetto allo stadio precedente.

I nuclei ir, infatti, sono principalmente localizzati a livello basale dell'epitelio olfattivo, sia sensoriale sia respiratorio (Fig. 68). Cellule ir sono anche presenti nelle zone mediali e apicali dell'epitelio olfattivo (Fig. 68), ma il loro numero è inferiore rispetto allo stadio 29.

Da notare che, nell'ambito della OM, gli elementi PCNA-ir sono principalmente localizzati nella regione ventrale.

Le ghiandole di Bowman presentano attività PCNAasica, circoscritta alle zone basali e laterali dell'elemento ghiandolare.

Nel vomeronasale sono presenti cellule ir nelle zone basali dell'epitelio sensoriale. Nelle regioni non sensoriali dell'epitelio del vomeronasale gli elementi ir sono più rari.

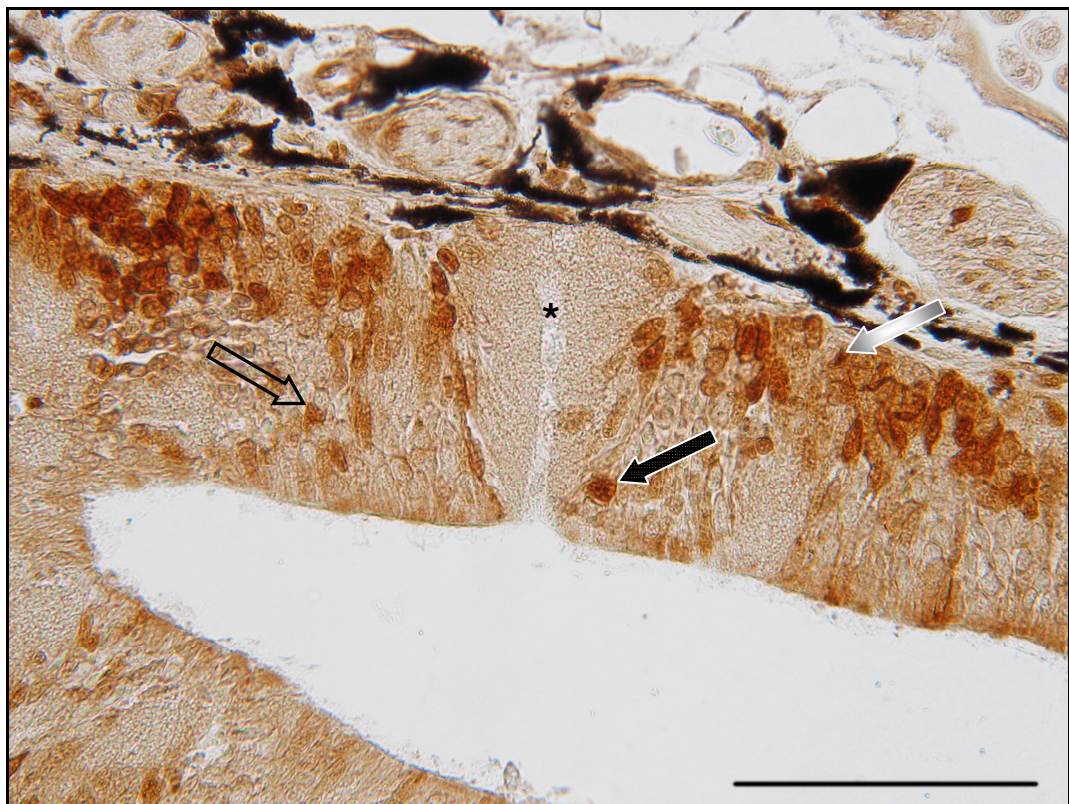


Fig. 68 Girino allo stadio 31. Formazione delle ghiandole di Bowman (asterisco). L'attività immunoreattiva è localizzata a livello basale (freccia grigia), mediale (freccia vuota) e apicale (freccia nera) dell'epitelio olfattivo. Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio 33***

Lo stadio di sviluppo analizzato corrisponde ad un girino prossimo alla metamorfosi. Il cervello ha ormai raggiunto la sua morfologia finale ed è leggermente aumentato di dimensioni rispetto allo stadio precedente. I diversi nuclei encefalici hanno ormai preso forma.

L'organo olfattivo ha quasi raggiunto la sua struttura definitiva, anche se l'attività PCNAasica è ancora presente (Fig. 69). La sua morfologia non si discosta molto da quella riscontrata nello stadio 31. Presente, quindi, una camera olfattiva con epitelio sensoriale e ghiandole di Bowman, un epitelio respiratorio, più sottile rispetto al sensoriale, in posizione dorsale rispetto al vomeronasale, e l'organo di Jacobson in posizione ventrale rispetto alla OM (Fig. 69).

Anche in questo stadio, gli elementi ghiandolari della regione anteriore della mucosa risultano di dimensioni inferiori rispetto a quelle della regione posteriore.

Il vomeronasale presenta una morfologia leggermente diversa da quella vista in precedenza. Infatti, la componente sensoriale diminuisce di dimensioni a favore della porzione non sensoriale.

Le ciglia della porzione sensoriale della OM, sono ben sviluppate, ripiegate e agglutinate tra di loro. Questo particolare era scarsamente presente nello stadio 31 e assente in quelli precedenti.

Invece, le ciglia della porzione respiratoria, sono ben evidenti e sviluppate, non ripiegate e/o agglutinate tra loro. Presentano una morfologia paragonabile a quanto visto prima.

I microvilli dell'organo vomeronasale, sembrano aumentare di numero e appaiono più sviluppati.

L'attività immunoreattiva decresce ulteriormente rispetto a quanto visto precedentemente. Solo alcuni nuclei encefalici sono ancora in attiva proliferazione.

Nella parte anteriore e posteriore del TEL, l'attività PCNAasica ha un pattern non dissimile da quello osservato nello stadio 31. Importante rilevare la presenza di forte attività PCNAasica nella MSA e nel POR.

Nel DIE, sono visibili pochi nuclei ir in prossimità del nucleo talamico anteriore e del nucleo talamico posteriore. Poche cellule ir sono individuate nella parte mediale del ventricolo infundibolare.

Come nello stadio precedente, nel MES si osserva un piccolo gruppo di cellule nella zona dorsale del ventricolo, all'altezza del tegmento dorsale. Nel tetto ottico, l'attività PCNAasica rilevata negli stadi precedenti, diminuisce. Sono visibili solo poche cellule, maggiormente localizzate nella zona ventrale del ventricolo ottico.

Nel ROMB l'attività è assente.

Nonostante si tratti di un girino prossimo alla metamorfosi, l'immunoreattività verso la PCNA è ancora ben evidente nell'organo olfattivo (Fig. 69). Infatti, a livello dell'apertura delle coane, l'attività PCNAasica è molto forte, intensificandosi in modo particolare nella regione ventrale della mucosa.

Il pattern di distribuzione dell'attività PCNAasica nell'ambito dell'epitelio olfattivo non subisce variazioni: nell'epitelio sensoriale è presente un forte addensamento delle cellule ir in posizione basale, ma, come per gli altri stadi, sono presenti nuclei ir anche in posizione apicale e mediale. In quello respiratorio sono, invece, principalmente presenti a livello basale.

Procedendo in senso anteriore, la situazione varia: infatti, è la regione dorsale della mucosa a presentare un'immunopositività maggiore. Più avanti, ancora, la situazione diviene equivalente per entrambe le regioni, dorsale e ventrale.

Nell'organo vomeronasale, l'attività è sempre in misura maggiore presente a livello basale e, nella porzione sensoriale, anche a livello mediale e apicale, con nuclei che si affacciano nel lume dell'organo stesso. Da notare, comunque, che l'attività ir è preponderante nella porzione sensoriale.

Le ghiandole di Bowman sono ben sviluppate e mostrano attività PCNAasica a livello basale e laterale.

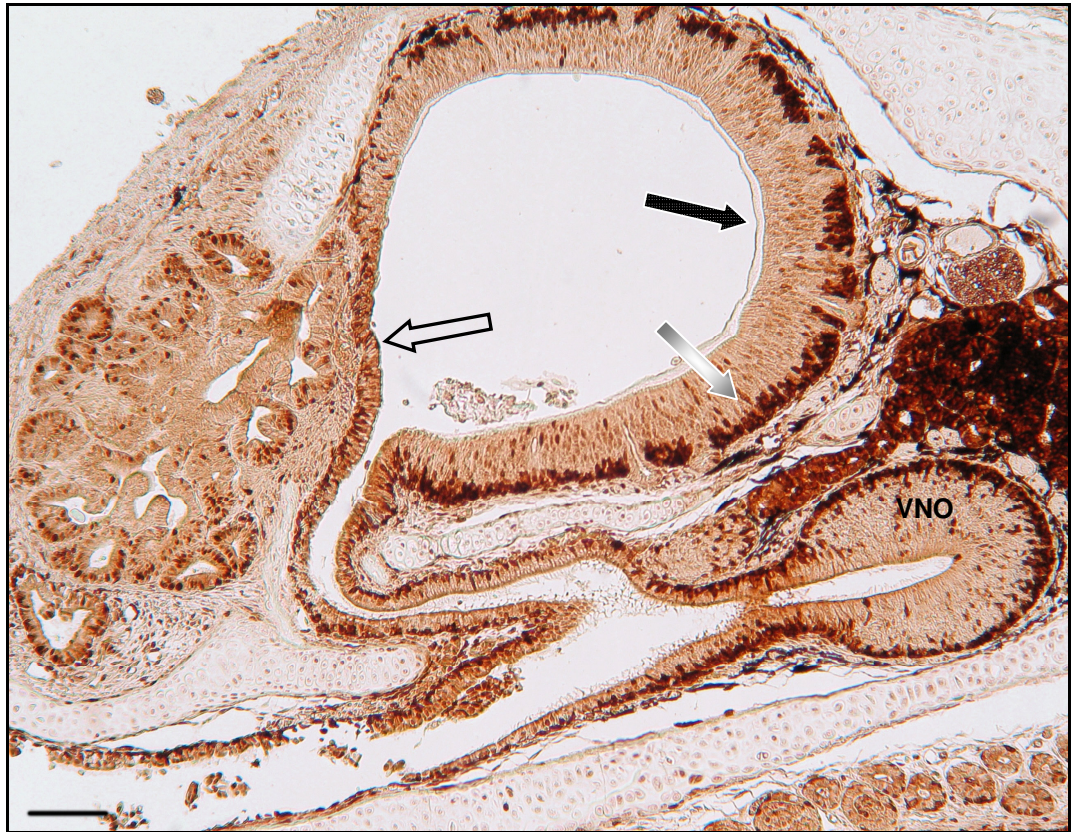


Fig. 69 Girino allo stadio 33. L'organo olfattivo ha quasi raggiunto la sua struttura definitiva. È presente un epitelio sensoriale, più spesso (freccia nera), un epitelio respiratorio, più sottile (freccia vuota) e l'organo vomeronasale (VNO). Nonostante si tratti di un girino prossimo alla metamorfosi, l'attività immunoreattiva è ancora presente (freccia grigia). Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio metamorfosato***

In questo stadio, il cervello è ormai simile nella forma a quello dello stadio adulto. Le dimensioni sono, logicamente, inferiori.

Morfologicamente la componente olfattiva non subisce sostanziali variazioni rispetto allo stadio precedente (Fig. 69 e 70). Le strutture generali sono ormai definite. Si assiste solo ad un modellamento della struttura. Le coane sono aperte e il collegamento tra gli elementi dell'organo olfattivo è sempre presente. Le ghiandole sono definite e sono presenti anche quelle unicellulari. Le ciglia nelle regioni delle coane sono di dimensioni inferiori e si presentano disposte uniformemente lungo tutto l'epitelio. Procedendo in senso anteriore, nella regione sensoriale, le ciglia assumono delle caratteristiche particolari, in quanto sono più lunghe,

ripiegate ed agglutinate tra loro. Le ciglia della regione respiratoria e dell'organo vomeronasale, invece, non subiscono modificazioni.

Nonostante si tratti di uno stadio successivo alla metamorfosi, l'attività proliferativa è ancora presente.

Infatti, nel TEL, a livello dei OB accessori, le cellule ir sono localizzate principalmente a ridosso del ventricolo, con alcune rare nel parenchima. Procedendo posteriormente, il pattern di distribuzione e il numero delle cellule ir non cambia rispetto allo stadio precedente. Il POR è molto ir. Il numero di cellule ir nella MSA, invece, diminuisce. Nel DIE si osservano nuclei ir a livello del nucleo del letto della AC. La regione dell'infundibolo è marcata: sono ancora presenti nuclei ir, in numero certamente inferiore rispetto al 33. Qualche cellula ir si osserva a livello del nucleo talamico anteriore e pochissime nel nucleo talamico posteriore. Nel MES, a livello dei nuclei istmici si notano cellule all'altezza del tegmento dorsale. Si osservano cellule ir anche nel ventricolo del tetto ottico. Procedendo posteriormente, nel ROMB si notano poche cellule ir a ridosso del IV ventricolo. Poche cellule si osservano anche nel midollo allungato.

Nell'ambito dell'organo olfattivo, l'attività proliferativa è ancora presente (Fig. 70). In quanto ad intensità e a numero di elementi ir, non si notano differenze con lo stadio 33. L'immunoreattività è presente in tutti gli elementi, sensoriale, respiratorio e vomeronasale. Il pattern è simile a quello dello stadio precedente.





Fig. 70 Stadio neometamorfosato. L'organizzazione dell'organo olfattivo ha raggiunto la sua struttura definitiva. Presenti una regione sensoriale (freccia nera) un epitelio respiratorio (freccia vuota) e l'organo vomeronasale (VNO). È presente ancora attività immunoreattiva alla PCNA (freccie grigie) in quanto l'organo olfattivo deve accrescersi ulteriormente per far fronte all'accrescimento corporeo dell'animale. Scale bar 100  $\mu$ m.

*Xenopus laevis*: applicazione traccianti neuronali (DiI e biocitina) alla camera olfattiva o al nervo tranciato durante lo sviluppo.

L'utilizzo dei due traccianti neuronali alla OM o al nervo tranciato dei vari stadi di sviluppo fino alla metamorfosi, ha dato gli stessi risultati. Il tracciante neuronale DiI, appare rosso brillante. La stessa colorazione si ottiene incubando le sezioni dei campioni trattati con biocitina, con texas red. Da qui in poi per la colorazione ottenuta con biocitina dovrà intendersi texas red. Nonostante ciò, l'applicazione del DiI evidenzia meglio il sistema di fibre.

I traccianti applicati nella camera olfattiva colorano pesantemente la OM. Anche le fibre olfattive primarie provenienti dai neuroni olfattivi e dirette ai OB, risultano tutte positive. Inoltre, si può discernere una serie di fibre singole o in gruppi che attraversa a livello caudale i OB per invadere il TEL.

Sono di seguito descritti i risultati ottenuti a partire dai OB in girini a diversi stadi dello sviluppo larvale, raggruppati quando non sono evidenti differenze eclatanti tra loro.

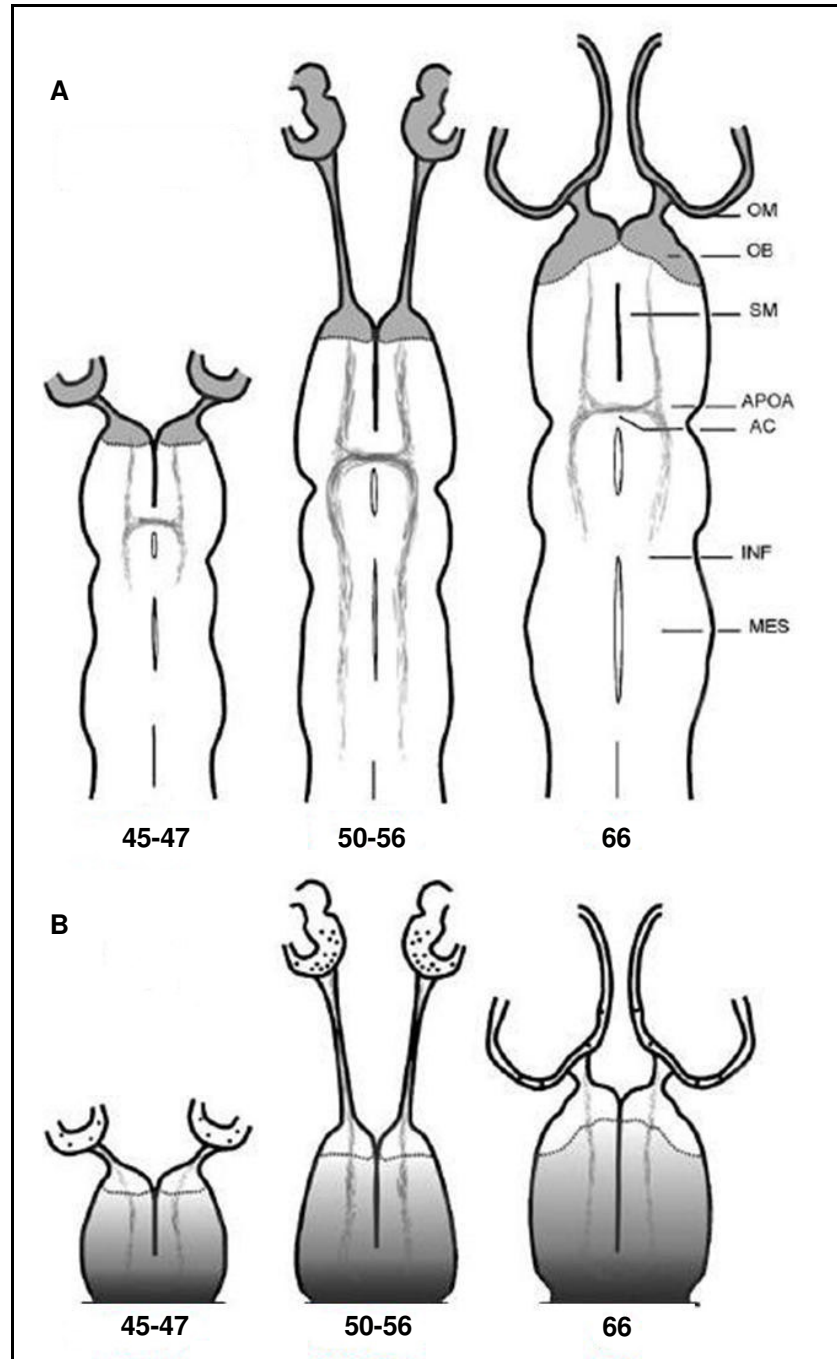


Fig. 71 A: prospetto delle estensioni dell'EBOS durante lo sviluppo in *Xenopus laevis*. B: sistema di marcatura retrograda con applicazione di tracciante alla commessura anteriore. OM, mucosa olfattiva; OB, bulbo olfattivo; SM, setto mediano; APOA, area preottica anteriore; AC, commessura anteriore; INF, infundibulo; MES, mesencefalo.

### ***Stadio 45-47***

Alcuni fasci di fibre e molte fibre singole, attraversano i OB seguendo un percorso medio-basale. Tali fasci di fibre sono abbastanza compatti e sottili, continuando il loro percorso, a livello ventro-mediale, nel TEL. Essi raggiungono la AC dove diffondono e circondano il POR. Alcune fibre decussano a livello della AC e raggiungono la parte controlaterale. Non si osservano fibre oltre questa area, né a livello ipsi né controlaterale.

### ***Stadi 50-56***

In seguito all'applicazione dei traccianti, si rileva una rete di fibre più estesa. L'applicazione dei traccianti alla superficie del NO tranciato, rivela alcuni corpi cellulari in posizione postbulbare, nel TEL basale. Come negli stadi precedenti, molti fasci di fibre sono localizzati nella parte medio-ventrale del TEL estendendosi lungo il setto mediano, fino all'area preottica. La maggior parte delle fibre decussa a livello della AC e alcune di esse terminano nell'infundibolo ventrolaterale controlaterale. La stessa zona ipsilaterale è raggiunta dalle fibre non decussanti.

Molte fibre, includendo alcune osservate in prossimità della commessura postoptica, corrono fino al tegmento mesencefalico. Solo poche di tali fibre raggiungono il ROMB sia ipsi che contro.

### ***Stadio 66***

Lo stadio, corrispondente ad un neometamorfosato, presenta alcune differenze rispetto agli stadi analizzati precedentemente. Infatti, si assiste ad una generale riduzione nella distribuzione del sistema di fibre osservato. Le fibre marcate raggiungono al massimo il DIE, con una concentrazione maggiore nel talamo e nell'ipotalamo, sia a livello ipsilaterale che controlaterale. D'altra parte, la distribuzione del sistema di fibre appariva molto simile a quello osservato negli stadi 45-47.

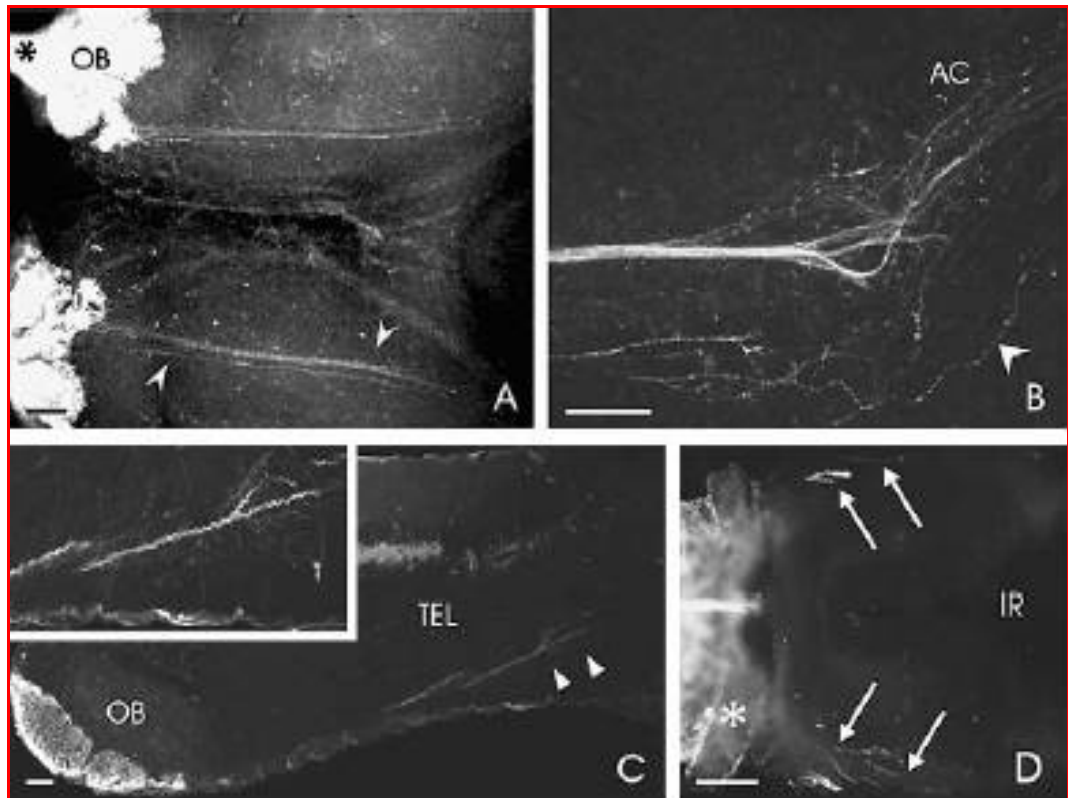


Fig. 72 Applicazione di DiI alla mucosa olfattiva durante lo sviluppo. L'EBOS oltrepassa i bulbi olfattivi (A, girino stadio 54) e attraversa il telencefalo in posizione medio-basale (C, girino stadio 51) per decussare alla commessura anteriore (C, girino stadio 47) con terminazioni nelle regioni di encefaliche (D, stadio 53).

*Xenopus laevis*: applicazione di cristalli di DiI a livello della commessura anteriore durante lo sviluppo.

In seguito all'applicazione di cristalli di DiI alla porzione caudale del TEL, si notano molte fibre marcate diffondere nell'intero TEL. In tutti i casi di marcatura retrograda, non è stato mai possibile osservare positività nello strato glomerulare dei OB. Invece, le fibre proseguivano nel NO e raggiungevano la OM dove erano marcati i neuroni recettoriali olfattivi.

### **Stadi 45-47**

Alcune fibre positive nel TEL, incrociano i OB nella parte medio-basale e percorrono il NO lungo la porzione medio-basale. Esse raggiungono la OM, dove pochi neuroni olfattivi risultano marcati (Fig. 73A e B). Essi apparivano allungati senza una precisa distribuzione all'interno della mucosa. Un altro gruppo di cellule marcato dopo l'applicazione retrograda

del tracciante, si presenta all'esterno della parte medio-basale della OM. Questa associazione di neuroni si osserva solo allo stadio 47.

### ***Stadio 50-56***

Il pattern ottenuto in questo stadio in seguito all'applicazione del tracciante, era molto simile a quello osservato negli stadi precedenti. Tuttavia, in proporzione all'aumentato numero di fibre marcate all'interno del NO (Fig. 73D), si osserva un aumento del numero di neuroni olfattivi colorati (Fig. 73C). In sezioni orizzontali, i neuroni olfattivi marcati appaiono concentrati nella parte prossimale della OM.

### ***Stadio 66***

Le fibre olfattive marcate che attraversavano i OB e il numero dei neuroni olfattivi colorati è meno numeroso rispetto a quello di tutti gli stadi studiati.

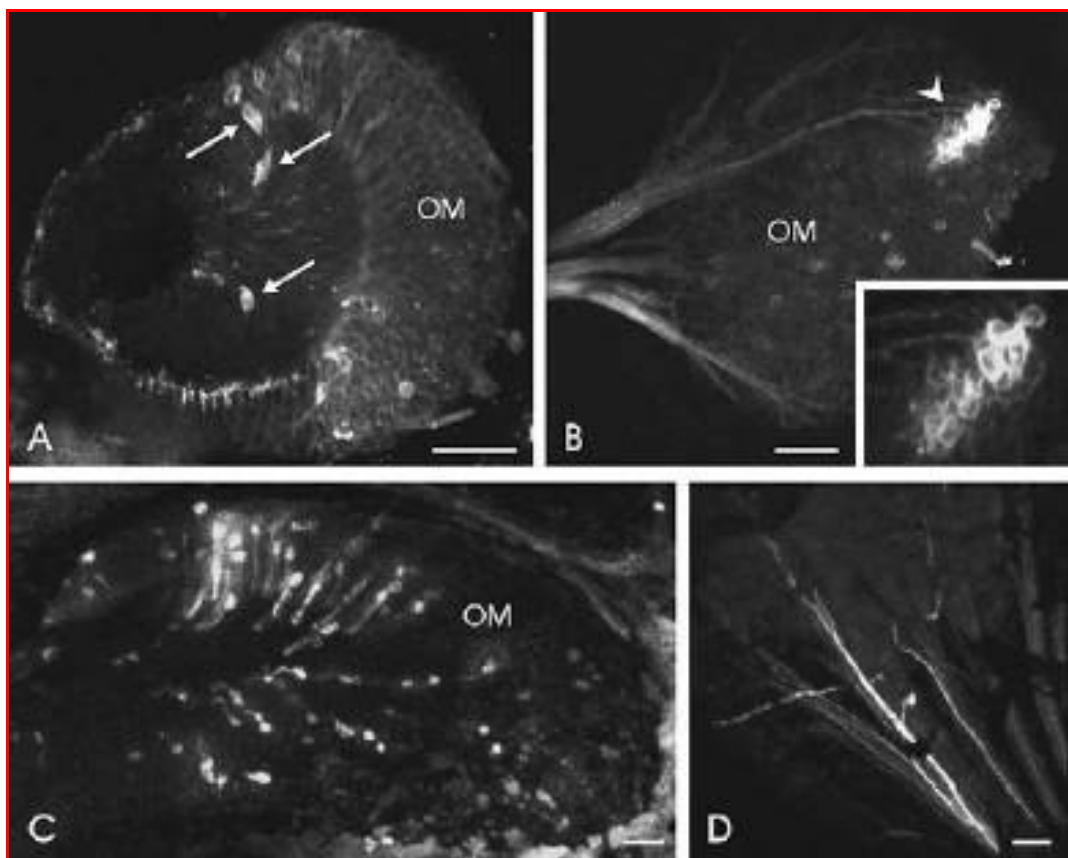


Fig. 73 Applicazione di traccianti alla commessura anteriore. Il numero delle cellule aumenta durante lo sviluppo (C, girino stadio 54). A-B: girino stadio 47. D, nervo olfattivo in cui sono visibili le fibre EBOS rivelate attraverso marcatura retrograda. Scale bar 50  $\mu$ m.

*Xenopus laevis: doppia marcatura con applicazione di biocitina alla camera olfattiva e immunoistochimica per il peptide FMRFa.*

In uno stadio 53, che rappresenta uno di quelli in cui il sistema di fibre olfattive extrabulbari è più sviluppato, i sistemi rilevati dall'applicazione della biocitina e dall'immunoistochimica per l'FMRFa mostrano sovrapposizioni areali a livello del NO/vomeronasale, TEL e DIE. Tuttavia, nessuna fibra o cellula mostra una doppia positività contemporaneamente al tracciante e all'immunoistochimica (Fig. 74).

Lunghe fibre e corpi cellulari FMRFa-ir si distinguono all'interno del NO. L'applicazione della biocitina, mette in evidenza tutto il resto delle fibre del NO e il relativo strato glomerulare. In sezione orizzontale, immediatamente dietro ai OB, si ritrovano spesso alcuni glomeruli ectopici anch'essi raggiunti normalmente dal tracciante. Le fibre FMRFa-ir attraversano questi glomeruli senza mostrare alcuna connessione con essi.

Posteriormente ai OB, si osservano abbondanti fibre marcate con biocitina e raggruppate in fasci compatti che raggiungono il TEL medio-basale. A questo livello sono presenti anche le fibre FMRFa-ir. Esse sono prevalentemente ventrali alle fibre marcate con biocitina. I fasci compatti di fibre marcate con biocitina raggiungono la AC seguendo un percorso ventro-mediale. In questa regione diffondono intorno al POR. Alcune fibre decussano portandosi nella regione controlaterale, mentre altre si portano posteriormente senza decussazione. A questo livello, il sistema FMRFa-ir è ricco in neuroni e fibre che, anche in questo caso sono distinte da quelle marcate dal tracciante.

La sovrapposizione dei sistemi rilevati mediante l'applicazione della biocitina e dall'immunoistochimica per l'FMRFa nelle stesse aree del cervello, senza alcuna colocalizzazione, si riscontra in tutti gli stadi di sviluppo esaminati. Per quanto riguarda il sistema FMRFa-ir, durante lo sviluppo si assiste ad un graduale e generico aumento degli elementi ir nel

cervello e, parallelamente, ad una diminuzione di fibre e neuroni nella componente olfattiva.

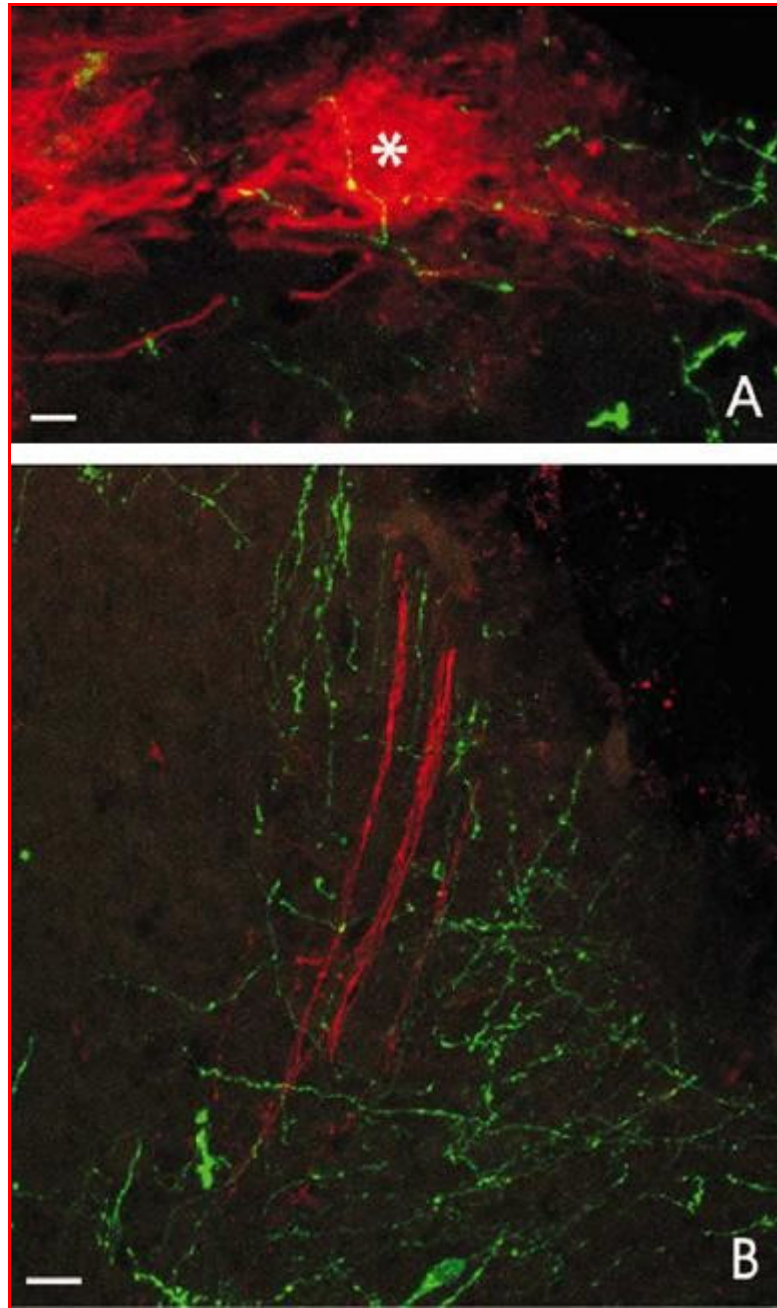


Fig. 74 Doppia marcatura biocitina – FMRFa. In tutti gli stadi di sviluppo analizzati, il sistema EBOS non era colocalizzato con il nervo terminale (B). In A fibre del nervo terminale attraversano i glomeruli e non fanno sinapsi con le cellule mitrali. Scale bar A, 10  $\mu$ m; B, 20  $\mu$ m.

*Xenopus laevis: immunoistochimica per la PCNA*

***Stadio 33-34***

Questo stadio corrisponde ad un embrione prima della schiusa, la quale avviene allo stadio 38 circa. L'encefalo è poco sviluppato e le diverse aree non appaiono ben distinte. Il placode olfattivo è costituito da ammassi di cellule omogenee senza strutture differenziate. La maggior parte dei neuroni PCNA sono generalmente ir in tutti i tessuti presenti nella sezione. Nell'encefalo la maggior parte dei nuclei presenta una diversa intensità dell'immunoreattività. In particolare, quelli più intensamente colorati si dispongono intorno alle cavità neuroepiteliali primordiali; i nuclei localizzati perifericamente presentano un'intensità inferiore. Più distalmente alcuni nuclei, ma molto pochi in proporzione alle altre regioni, sono negativi. Tuttavia, nuclei intensamente colorati si notano anche molto distanti dal neuroepitelio. I placodi olfattivi e ottici presentano tutti i nuclei PCNA-ir senza alcuna zonazione, ma quelli con diversa intensità dell'immunoreazione sono casualmente mescolati. Durante gli stadi successivi la situazione resta piuttosto statica, fatta eccezione per una tendenza dei nuclei encefalici ad addossarsi ai ventricoli.

***Stadio 37-38***

L'encefalo presenta un maggior grado di differenziamento, pur restando le diverse aree encefaliche largamente indeterminate. Il placode olfattivo non progredisce rispetto agli stadi precedenti. Esso non è ancora invaginato, ma appare come un'unica massa cellulare tondeggiante.

I nuclei PCNA-ir dell'encefalo cominciano ad assumere un'organizzazione decisamente stratificata nel cervello, per cui essi si concentrano intorno ai ventricoli e perdono gradualmente l'immunoreattività spostandosi lontano da essi. Il fenomeno, però, si presenta molto disomogeneo, in quanto possono essere presenti nuclei con una reattività molto intensa alla stessa



distanza dal ventricolo di nuclei in cui l'immunocolorazione è più debole o assente. Parallelamente, nuclei PCNA-ir addossati al neuroepitelio possono presentare una diversa intensità di colorazione. A livello dorsale il cervello è più sottile, e tutti i nuclei presentano positività, mentre nella regione infundibolare i nuclei più distanti del neuroepitelio hanno già perso l'attività PCNASica. Anche nel ROMB, i nuclei più positivi sono strettamente addossati al ventricolo e complessivamente meno numerosi rispetto alle regioni più anteriori del cervello.

Tutti i nuclei del placode olfattivo sono ir, alcuni con maggiore intensità altri meno. Lo stesso accade per gli altri tessuti visibili nella sezione.

Gli stadi successivi vedono una lieve progressione nello sviluppo con la tendenza dei nuclei PCNA-ir ad organizzarsi maggiormente in prossimità dei ventricoli encefalici. Il placode olfattivo comincia ad invaginarsi (Fig. 75), mentre l'attività PCNASica tende a concentrarsi a livello basale (stadio 39).



Fig. 75 Girino allo stadio 39. Processo di invaginazione per la formazione della camera olfattiva. Scale bar 200  $\mu$ m.

## *Stadio 42*

Il livello di differenziamento dell'encefalo ha quasi raggiunto la morfologia tipica dell'adulto, anche se complessivamente è molto più piccolo. La OM si presenta molto invaginata medialmente; inoltre, è presente una camera aggiuntiva nettamente distinta dalla cavità principale, ma in collegamento con essa che rappresenta il primordio dell'organo vomeronasale.

L'attività nell'encefalo diventa nettamente ristretta alla regione neuroepiteliale. Tuttavia, vi sono aree in cui l'immunoreattività è molto più abbondante sia riguardo al numero delle cellule complessive sia con riferimento all'intensità. Nel TEL il ventricolo ancora in divisione appare uniformemente circondato da nuclei PCNA-ir organizzati in più strati. Raramente, si osservano cellule positive lontano dai ventricoli e questa risulterà una regola generale valida per tutte le aree del cervello. A livello diencefalico intorno al POR del terzo ventricolo appaiono vari strati di nuclei ir; laddove l'area preottica non presenta positività. Più posteriormente anche l'infundibolo appare circondato da uno strato molto spesso di cellule PCNA-ir, mentre il ventricolo talamico e la regione abenulare mostrano una positività più blanda. I ventricoli mesencefalici si presentano uniformemente circondati da uno spesso strato di neuroni PCNA-ir, mentre il loro numero è più limitato a livello del ROMB.

La OM presenta attività PCNAAsica generalizzata. Tuttavia, la camera principale presenta una maggiore quantità di nuclei PCNA-ir in prossimità delle regioni basali e meno verso il lume. Il primordio dell'organo vomeronasale, per contro, mostra cellule più intensamente ir e omogeneamente distribuite per tutto l'organo. Le cellule della retina positive alla PCNA tendono ad accumularsi intorno alla regione più prossima al cristallino e in prossimità del punto di emergenza del nervo ottico. Le altre aree della retina non hanno alcun nucleo ir. Il cristallino, con un aspetto stratificato, mostra le cellule PCNA-ir più intense

organizzate in una fascia circolare che tocca la parte in cui inizia la retina e nella quale sono concentrate le sue cellule PCNA-ir. Da qua spostandosi verso la parete del cristallino che guarda il fondo del globo oculare, si osserva come le cellule PCNA-ir perdono gradualmente l'immunoreattività.

Gli stadi successivi vedono un progressivo incremento del numero complessivo di cellule PCNA-ir nell'encefalo, che tendono a sistemarsi più strettamente addossate ai ventricoli. La camera olfattiva cresce in dimensioni. In alcuni campioni dello stadio 50 si osserva la formazione di un nuovo diverticolo nella parte laterale della camera principale.



Fig. 76 Girino stadio 42. Formazione dell'organo vomeronasale (VNO). MC, camera mediale. Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio 52***

L'encefalo ha ormai raggiunto la sua connotazione definitiva dal punto di vista della morfologia generale.

Le varie aree dell'encefalo, sono ormai nettamente distinguibili; tuttavia, molti dei nuclei encefalici sono ancora lontani dall'assetto strutturale dell'adulto.

Il cervello si è molto allungato in senso antero-posteriore, cosicché i nervi olfattivi appaiono molto lunghi.

La OM si presenta più articolata, con un evidente primordio della camera laterale la quale origina dalla principale.

L'attività PCNASica nell'encefalo si presenta molto segregata in prossimità dei ventricoli e organizzata in multistrati. Il numero di cellule PCNA-ir è molto più abbondante rispetto alle aree precedenti in tutte le zone dell'encefalo.

I ventricoli telencefalici mostrano un maggior numero di cellule nella loro regione basale.

Nel DIE, l'attività PCNASica è abbondantissima in prossimità del POR e nel ventricolo talamico, mentre la regione epitalamica presenta solo raramente qualche nucleo PCNA-ir.

Nell'infundibulo il numero di cellule PCNA-ir è elevatissimo e anche i ventricoli mesencefalici sono circondati da molti nuclei PCNA-ir intensamente immunoreattivi; anche se con una maggiore concentrazione basale e dorsale. A livello dei ventricoli romboencefalici l'attività PCNASica sembra maggiormente segregata a livello basale e dorsale con una fascia intermedia in cui sono assenti cellule PCNA-ir.

Gli organi olfattivi presentano tutti un'attività PCNASica molto spinta, ma principalmente localizzata nelle regioni basali delle mucose.

Gli stadi successivi sono caratterizzati da una generale diminuzione dell'attività PCNASica e da un progressivo differenziamento delle camere della OM con la tendenza alla ramificazione.

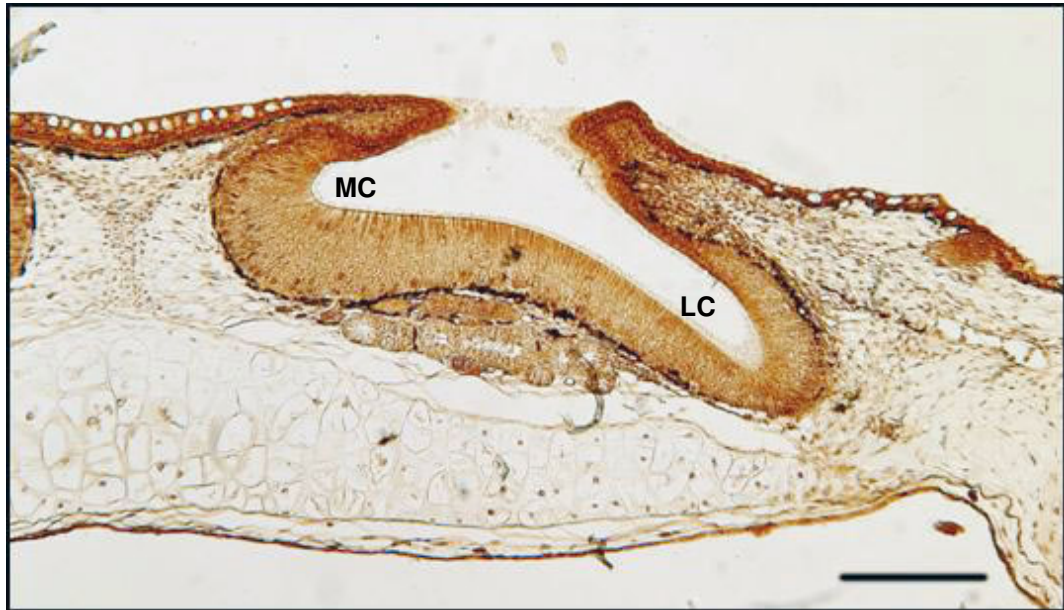


Fig. 77 Girino allo stadio 52. Formazione della camera laterale (LC), il futuro water nose. MC, camera mediale. Scale bar 100  $\mu$ m.

### ***Stadio 57***

L'encefalo presenta un livello di differenziamento piuttosto simile a quello dello stadio precedente. Diversi nuclei encefalici cominciano a prendere la loro forma definitiva.

La camera olfattiva presenta tre cavità in collegamento tra loro. Una camera principale, in posizione mediale, e una camera laterale, ormai ben evidente, la cui formazione ha avuto inizio nello stadio 50. Al di sotto di essa è alloggiato l'organo vomeronasale, anch'esso collegato mediante un dotto con la camera principale. Questo sistema di cavità è collegato con l'esterno solo mediante le narici, in quanto le coane non sono ancora aperte.

L'attività PCNAsica nel cervello è drammaticamente ridotta cosicché le cellule sono generalmente sparse nelle regioni ventricolari con qualche eccezione in cui l'attività PCNAsica rimane ancora molto evidente.

A livello del TEL anteriore la regione superiore dei ventricoli ha quasi perso tutte le cellule PCNA-ir, mentre nella zona inferiore e mediale il loro numero è maggiore, anche se comparativamente molto più basso rispetto agli stadi precedenti. Più posteriormente i ventricoli presentano, invece,

una maggiore attività PCNASica nella loro parte superiore. Tuttavia, il numero dei nuclei PCNA-ir è inferiore rispetto agli stadi precedenti.

Una delle aree che resta molto attiva, dal punto di vista dell'attività PCNASica, è la parte basale del POR del terzo ventricolo e del neuroepitelio del ventricolo dell'infundibolo basale.

Le cellule PCNA-ir a livello del sistema olfattivo sono più numerose e intensamente colorate nella camera mediale, rispetto a quella laterale, specialmente nella sua regione più anteriore. Nell'organo vomeronasale, per contro, ci sono solo rari nuclei PCNA-ir.

### ***Stadio 66***

L'encefalo sostanzialmente appare molto simile, sotto l'aspetto morfologico, allo stadio precedentemente descritto con dettaglio.

Le tre cavità sono in collegamento fra loro.

Le camere olfattive si presentano ora molto articolate. Vi è la camera olfattiva laterale che si estende in posizione mediale. Essa comunica con l'esterno attraverso le narici e con la cavità della bocca con le coane, che sono ora aperte. Questa camera comunica con quella mediale ed è da essa separata mediante una valvola. Le aree sensoriali appaiono più spesse, mentre larghi tratti delle mucose hanno un aspetto più sottile e sono epiteli respiratori. L'organo vomeronasale comunica anch'esso con la cavità mediale tramite un canale stretto e non è separato da valvole. A livello istologico nella camera mediale si sono differenziati evidenti elementi ghiandolari globulari (ghiandole di Bowman) e meno evidenti ghiandole tubulari. Quest'ultime sono anche presenti nell'organo vomeronasale. Nessun elemento ghiandolare è presente nella camera laterale.

Nell'encefalo l'attività PCNASica è ancora più ristretta. Il TEL mostra nuclei PCNA-ir nel neuroepitelio sparsi per tutta la loro estensione; tuttavia, con una maggiore concentrazione nel neuroepitelio del pallio

posteriore. Nella MSA, invece, l'immunoreattività è più forte e si estende in nuclei anche molto distanti dal neuroepitelio. Un'altra area che rimane ancora abbastanza attiva per quanto concerne l'attività PCNASica è la regione basale del POR del terzo ventricolo. Le altre regioni dell'encefalo presentano solo sparsi nuclei PCNA-ir localizzati in prossimità del neuroepitelio.

A livello delle camere olfattive si nota un maggior numero di cellule PCNA-ir nella camera laterale rispetto a quella mediale e l'organo vomeronasale, specialmente nelle zone dorsali. Intensa attività PCNASica si riscontra nella valvola che separa la camera mediale da quella laterale e in alcune zone dell'epitelio non sensoriale. Più posteriormente l'attività PCNASica è molto forte a livello dell'epitelio non sensoriale dell'apertura delle coane.

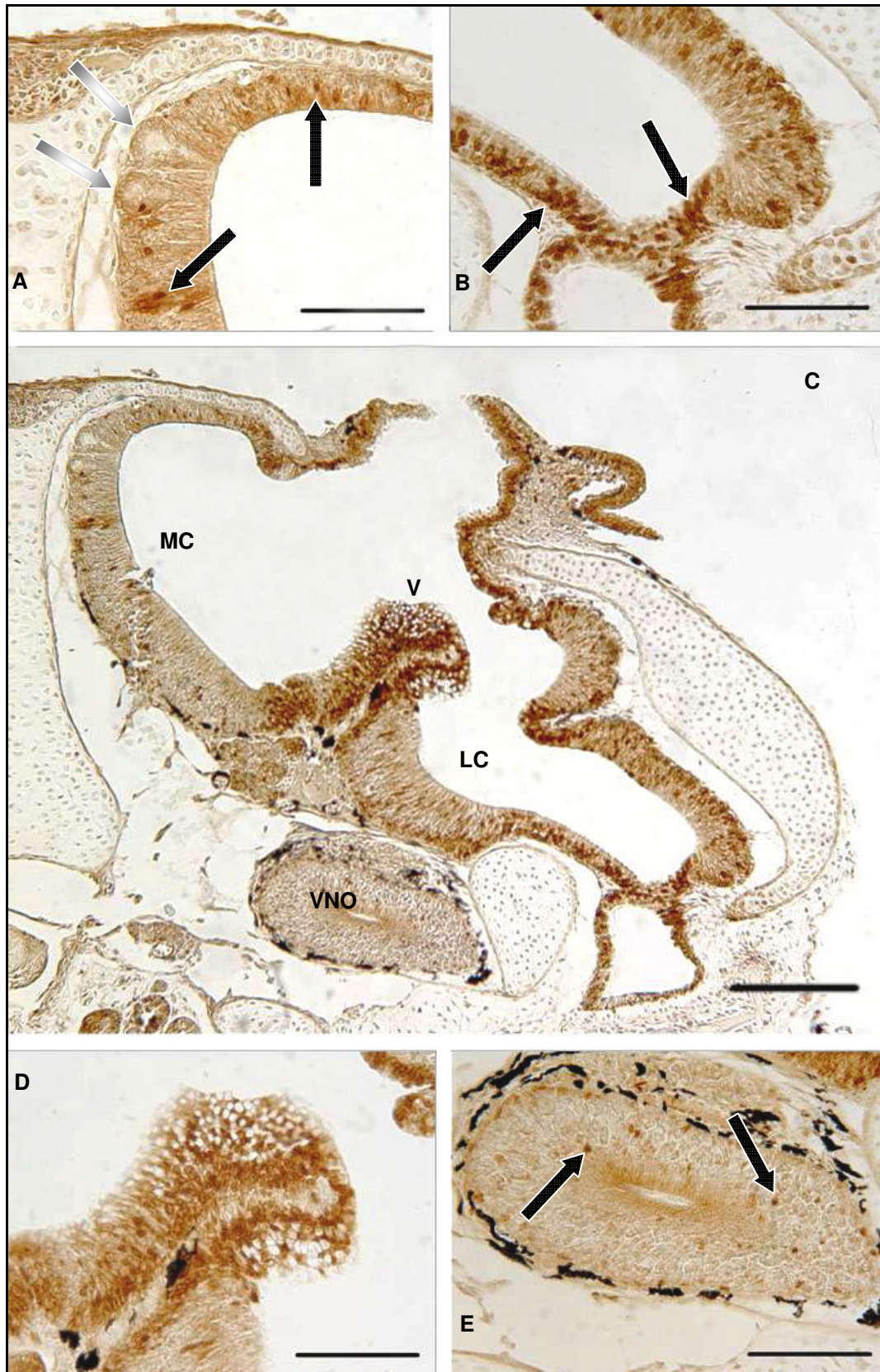


Fig. 78 Stadio neometamorfosato. A, cellule ir (frecche nere) nella camera mediale. Presenti anche elementi ghiandolari (frecche grigie). B, Cellule ir (frecche nere) nella camera laterale in numero maggiore rispetto a quella mediale e l'organo vomeronasale, specialmente nelle zone dorsali. C, visione d'insieme della mucosa. D, immunoreattività nella valvola che separa la camera mediale da quella laterale. E, Nuclei ir nell'organo vomeronasale (frecche nere). MC, camera mediale; LC, camera laterale; VNO, organo vomeronasale; V, valvola. Scale bar A, B, D, E 100  $\mu$ m; C, 200  $\mu$ m.



# DISCUSSIONI

Nel presente lavoro sono esposti i dati riguardanti la caratterizzazione morfologica del sistema del NT e del sistema di fibre olfattive extrabulbari in quattro specie di pesci teleostei, *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *Paracheiroidon innesi*, *Astyanax fasciatus mexicanus*, *Carassius auratus*, ed in due specie di anfibi anuri, *Rana esculenta* e *Xenopus laevis*.

La presente discussione verte, innanzi tutto, sulla metodologia sperimentale adoperata, per poi affrontare l'analisi comparativa tra le specie appartenenti alla stessa classe e tra le due classi studiate.

Di seguito, si discute sulla presenza e funzione del NT nelle specie analizzate e in quelle presenti in letteratura.

Non di meno, sono presenti considerazioni evolutive sul significato dell'EBOS e sui coinvolgimenti funzionali in cui è implicato. A tal proposito, è doveroso fare una premessa: in letteratura sono presenti lavori antecedenti la scoperta del sistema di fibre olfattive extrabulbari (1991), che si avvalgono di metodiche di applicazione alla mucosa olfattiva di traccianti per descrivere il percorso del NT. Szabo e i suoi collaboratori (1991) proposero una diversa interpretazione dei lavori che utilizzano tali tecniche in considerazione della presenza di proiezioni extrabulbari. Per quanto detto, nel presente studio, i lavori precedenti la scoperta dell'EBOS che fanno uso di applicazioni di traccianti neuronali alla mucosa olfattiva, sono interpretati tenendo conto della presenza di proiezioni extrabulbari.

Infine, nel presente lavoro, sono discusse le relazioni esistenti tra il NT e il sistema di fibre olfattive extrabulbari in funzione dei dati ottenuti e in relazione a quelli presenti in letteratura.

## CONSIDERAZIONI METODOLOGICHE

### ***FMRFa***

L'analisi immunohistochimica per il tetrapeptide FMRFa si è rivelato essere un metodo efficace per la caratterizzazione morfologica del NT. Infatti, è noto ormai da tempo in letteratura che l'immunoreattività per questo tetrapeptide è un ottimo marker per il sistema del NT (Stell et al., 1984; Ekström et al., 1988; Muske and Moore, 1988; Wirsig-Wiechmann and Basinger, 1988; Ostholm et al., 1990; Uchiyama, 1990; Wirsig-Wiechmann, 1990; Krishna et al., 1992; D'Aniello et al., 1996; Wright and Demski, 1996; Oelschläger et al., 1998).

In letteratura sono riportati altri marker per descrivere il decorso del NT. Nel 1980, Schwanzel-Fukuda e Silvermann dimostrarono la presenza di GnRH nel NT. Muske, nel 1993, riportò la presenza del GnRH in tutti gli gnatosomi. In seguito, altri studi hanno dimostrato la presenza di varie forme dello stesso peptide nel sistema in questione (Lovejoy et al., 1992; Forlano et al., 2000). Tuttavia, l'immunoreattività per tale peptide è poco stabile, in quanto in alcune specie è sottoposta a variazioni stagionali. Un esempio è dato da un recente lavoro su *Cirrhinus mrigala* (Biju et al., 2003).

Il neuropeptide tirosina (NPY) è stato descritto quale marker del NT (Chiba and Honma, 1992; Vallarino et al., 1995; Chiba et al., 1996; Gaikwad et al., 2004; Gaikwad et al., 2005; Sakharkar et al., 2005). Ciò nonostante, l'immunohistochimica per l'NPY non è stata adoperata in questo studio per gli stessi motivi riportati per il GnRH (Biju et al., 2003) e perché spesso gli anticorpi contro l'NPY mostrano alcune aspecificità (osservazioni personali).

L'immunoistochimica per l'FMRFa non presenta variabilità stagionali o altro tipo di instabilità. Pertanto, essa è stata scelta, in questo studio, per la caratterizzazione morfologica del NT.

In ogni modo, nei teleostei e negli anfibi sono presenti popolazioni di neuroni immunopositivi all'FMRFa distribuite in regioni differenti dell'encefalo, che non sono di pertinenza del NT (Northcutt and Muske, 1991, 1994). Le popolazioni di nuclei ir ritrovate nel diencefalo e nel mesencefalo hanno origine dal neuroepitelio del terzo ventricolo (Pinelli et al., 2000; Fiorentino et al., 2001). Queste ultime non appartengono al sistema del NT.

L'antisiero adoperato in questo studio, previo utilizzo su tessuto, è stato sottoposto a test di preassorbimento con l'antigene sintetico FMRFa. In tali test di preassorbimento omologo, la concentrazione del peptide sintetico era di 5 $\mu$ Mol: ciò provoca il completo abbattimento dell'attività degli anticorpi in esame. Quindi, con le dovute riserve, si può affermare che l'antisiero utilizzato riveli una sostanza FMRFa-simile. D'altronde, l'FMRFa in quanto tale, non è stato ancora isolato in nessun vertebrato. Piuttosto, sono state ritrovate molecole FMRFa-simili, rilevabili con tecniche immunoistochimiche utilizzando sieri contro l'FMRFa.

### ***PCNA***

Nella presente ricerca è stato studiato lo sviluppo delle componenti olfattive negli anfibi. Precisamente, sono stati analizzati i processi morfogenetici che conducono alla formazione delle regioni olfattive per valutare la presenza di differenti pattern temporali di proliferazione, in modo da correlarli, eventualmente, con i sistemi neuronali studiati. Il lavoro si avvale dell'utilizzo dell'immunoistochimica per la PCNA, noto marker di proliferazione cellulare (Tetè et al., 2000). Tuttavia, tale

strumento non deve intendersi come marker di neurogenesi, in quanto non è possibile predire il destino degli elementi in formazione nel neuroepitelio. Indubbiamente, le aree in cui hanno luogo i processi neurogenetici si sovrappongono alle regioni proliferative, ma ciò non toglie che in quelle stesse aree abbiano origine elementi non neuronali. D'altronde, scopo del presente lavoro è quello di correlare i processi proliferativi di morfogenesi ai sistemi neuronali studiati.

### *Traccianti neuronali*

L'utilizzo dei traccianti neuronali di natura lipofilica nei tessuti fissati è una metodologia altamente sensibile (Godement et al., 1987; Holmqvist et al., 1992). Essa offre la possibilità di rilevare le connessioni di strutture neuronali molto piccole, o di strutture il cui accesso è difficile attraverso metodiche diverse. Tuttavia, i risultati ottenuti tramite l'utilizzo dei traccianti neuronali devono essere interpretati con cautela, in quanto la natura lipofilica dei traccianti pone dei problemi di diffusione nelle aree circostanti il punto di applicazione. Infatti, lunghi periodi di incubazione possono provocare fenomeni di diffusioni non specifiche, rendendo difficile l'interpretazione dei dati.

La metodica d'utilizzo dei traccianti in questo lavoro, si avvale di un protocollo utilizzato nel lavoro di Hofmann e Bleckmann (1999). Gli autori utilizzarono EDTA, noto chelante degli ioni calcio, durante i processi di fissazione e durante il periodo di migrazione. Infatti, essi notarono che le diffusioni aspecifiche erano influenzate dalla presenza degli ioni calcio nonché dalla temperatura alla quale avveniva la migrazione. L'utilizzo dell'agente chelante nei protocolli di fissazione e migrazione, a temperatura ambiente, diminuisce sensibilmente i fenomeni di diffusione non specifica.

In tal modo, i risultati ottenuti dall'utilizzo dei due tipi di traccianti, sono sovrapponibili in quanto ad estensione e quantità degli elementi marcati.

I risultati ottenuti con l'utilizzo della biocitina quale tracciante neuronale, sono perfettamente paragonabili a quelli ottenuti con i traccianti lipofili. Le proiezioni dell'EBOS sono simili per quanto concerne estensione e campi terminali, così come per il numero di elementi marcati.

Nonostante ciò, diverse sono le problematiche inerenti all'utilizzo della biocitina. La sua applicazione è effettuata *in vivo*, e non è necessario danneggiare la mucosa olfattiva previa la sua applicazione. Ciò risulta vantaggioso in quanto, in tal senso, non si corre il rischio di esporre terminazioni del NT nell'uso di traccianti lipofili. Un esempio che possa spiegare al meglio tale concetto è offerto dallo studio del NT nella rana verde: il NT è composto da neuroni che durante lo sviluppo hanno origine dal placode olfattivo e migrano nel cervello lungo il complesso di nervi olfattivo/vomeronasale (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989). Tali neuroni proiettano le loro fibre attraverso il nervo olfattivo verso la mucosa olfattiva. Quindi, è probabile che elementi (fibre) periferici, durante le fasi iniziali dello sviluppo, possano incorporare il tracciante. Il risultato è la marcatura del NT e dell'EBOS contemporaneamente, con la scarsa possibilità di discernere i due sistemi. Invece, l'utilizzo della biocitina, che non prevede lesioni alla mucosa olfattiva per la sua applicazione, previene dal rischio che polveri del tracciante possano essere incorporate dal NT. Da ricordare che il NT non presenta corpi cellulari nell'epitelio olfattivo.

L'applicazione *in vivo* presenta delle difficoltà in quanto è necessario che l'animale sia in vita e in stato d'anestesia totale per l'intera durata della migrazione del tracciante (4 ore circa). La biocitina sfrutta, per la sua migrazione, il trasporto assonale, il quale può essere attivo solo nel momento in cui la cellula è viva. Nel caso degli anfibi, il problema è risolvibile ponendo su ghiaccio gli esemplari a cui è stato applicato il

tracciante. Nel caso dei teleostei è necessario un sistema che garantisca, per l'intera durata della migrazione, lo stato di anestesia totale dell'animale, e, nello stesso tempo, l'apporto d'ossigeno necessario alla sopravvivenza. Per tale motivo è stato realizzato il sistema raffigurato nello Schema 1, riportato nella sezione "Materiali e Metodi". Nonostante i lunghi periodi d'incubazione, gli esemplari sopravvivono garantendo una corretta migrazione della biocitina.

### *Teleostei*

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare la componente FMRFa-ir del sistema del NT e il sistema di fibre olfattive extrabulbari.

È noto che il gruppo dei teleostei presenta una discreta variabilità nella morfologia del rinencefalo. Differenti, infatti, possono essere i rapporti spaziali tra la mucosa olfattiva, i bulbi olfattivi e il telencefalo. La condizione in cui i bulbi olfattivi sono associati agli emisferi encefalici è detta sessile. In questo caso, due nervi olfattivi congiungono la mucosa olfattiva con i bulbi stessi. Diversa è la condizione pedunculata, in quanto i bulbi sono separati dal telencefalo e sono collegati ad esso mediante la presenza di tratti olfattivi. In questo caso, i nervi olfattivi sono di lunghezza variabile, così come i tratti olfattivi, in relazione alla vicinanza dei bulbi all'epitelio olfattivo.

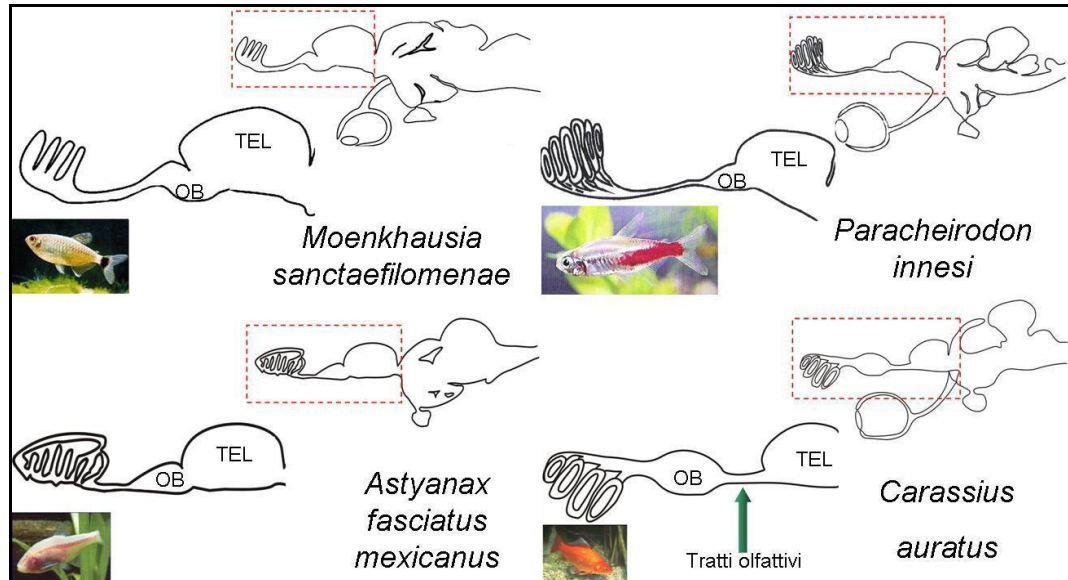
Le specie analizzate nel presente studio presentano condizioni diverse della posizione dei bulbi olfattivi: *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *Paracheirodon innesi* e *Astyanax fasciatus mexicanus* presentano una condizione sessile dei bulbi olfattivi. *Carassius auratus*, invece, una condizione pedunculata (Schema 2).

La scelta di tali specie ha permesso di valutare la presenza di eventuali differenze nella distribuzione di elementi FMRFa-ir in specie con bulbi olfattivi sessili, e tra quest'ultime e quelle con bulbi olfattivi pedunculati. Cionondimeno, sono state valutate le differenze nella morfologia ed estensione del sistema di fibre olfattive extrabulbari.

L'immunoistochimica per l'FMRFa ha messo in evidenza, nelle specie analizzate, due popolazioni di neuroni immunoreattivi: la prima, associata al nucleo periventricolare ipotalamico, consta di due gruppi separati dal

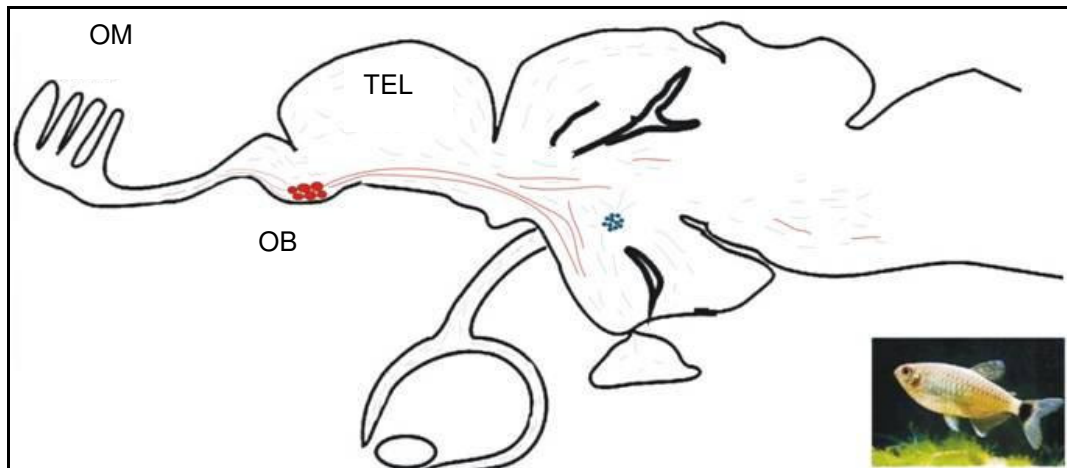


recesso del terzo ventricolo. La seconda popolazione di neuroni si presenta nelle regioni del rinencefalo. Quest'ultima è di competenza del NT.

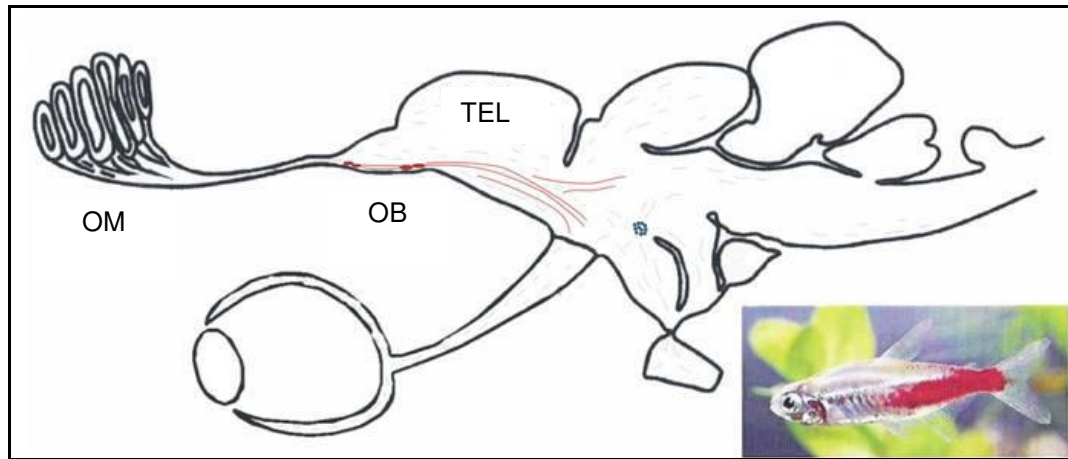


Schema 2 Topografia dei bulbi olfattivi nelle specie analizzate: *Moenkhausia sanctaefilomenae*, *Paracheirodon innesi* e *Astyanax fasciatus mexicanus* presentano una condizione sessile. *Carassius auratus*, invece, una condizione pedunculata con la presenza di tratti olfattivi (freccia). OB, bulbi olfattivi; TEL, telencefalo.

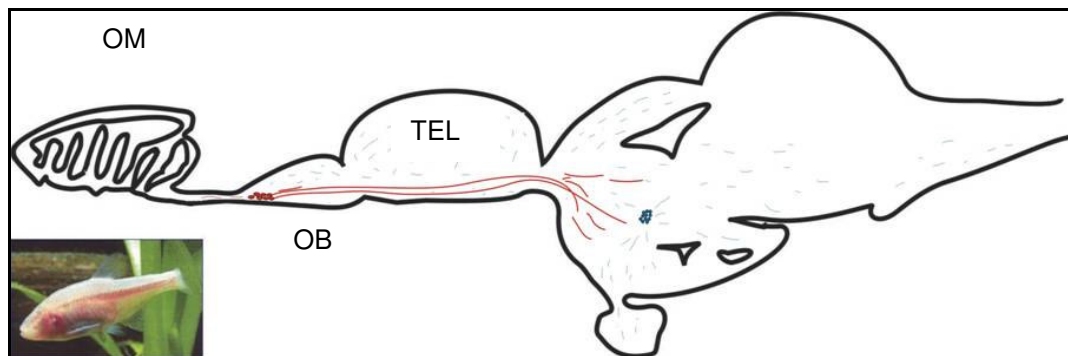
Dai risultati si evince che il gruppo di neuroni appartenenti al NT presenta una distribuzione variabile, sia tra specie con bulbi olfattivi sessili, sia tra specie con bulbi olfattivi peduncolati. In *Moenkhausia sanctaefilomenae*, due gruppi di neuroni sono localizzati in posizione ventrale, al confine tra bulbi olfattivi e telencefalo (Schema 3). In *Paracheirodon innesi*, entrambi i bulbi olfattivi presentano due gruppi di neuroni: il primo localizzato in prossimità del cono di emergenza del nervo olfattivo, il secondo in una posizione simile a quelli presenti in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Schema 4). *Astyanax fasciatus mexicanus* presenta un unico aggregato, per ciascun bulbo, in prossimità del cono d'emergenza del nervo olfattivo (Schema 5). Quindi, nell'ambito delle specie con bulbi olfattivi sessili, sono presenti tre diverse distribuzioni topografiche.



Schema 3 Nervo terminale in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (in rosso). Il ganglio del nervo terminale è localizzato alla base del bulbo olfattivo (OB), al confine con il telencefalo (TEL). In blu, neuroni e fibre di pertinenza del nucleo periventricolare ipotalamico, anch'esso immunoreattivo all'FMRFa. OM, mucosa olfattiva.

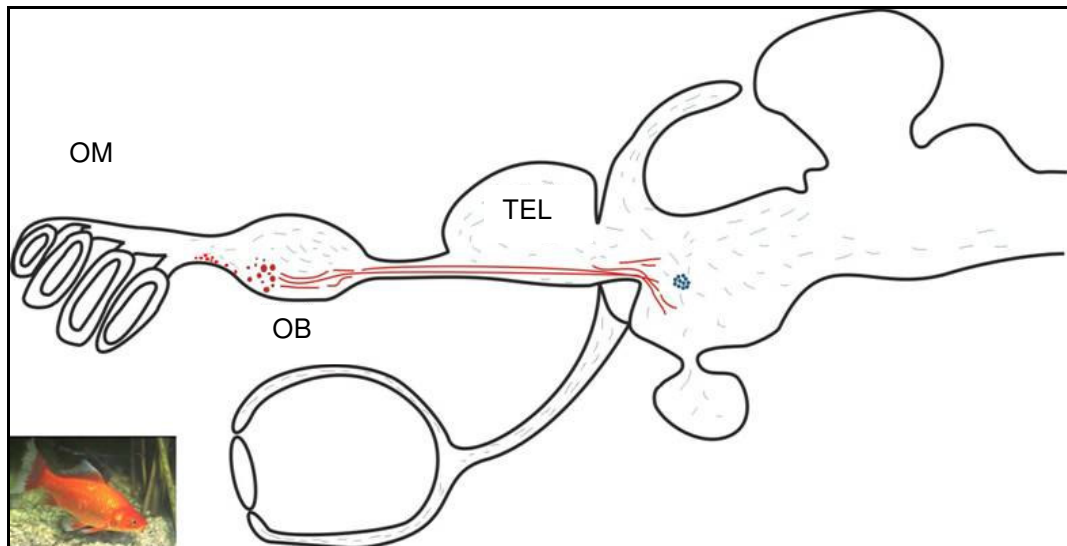


Schema 4 Nervo terminale in *Paracheirodon innesi* (in rosso). I gangli del nervo terminale sono localizzati alla base del bulbo olfattivo (OB), al confine con il telencefalo (TEL) e in prossimità del cono d'emergenza del nervo olfattivo. In blu, neuroni e fibre di pertinenza del nucleo periventricolare ipotalamico. OM, mucosa olfattiva.



Schema 5 Nervo terminale in *Astyanax fasciatus mexicanus* (in rosso). Il ganglio del nervo terminale è localizzato in prossimità del cono d'emergenza del nervo olfattivo. In blu, neuroni e fibre di pertinenza del nucleo periventricolare ipotalamico. OM, mucosa olfattiva; OB, bulbo olfattivo; TEL, telencefalo.

*Carassius auratus* presenta, invece, un consistente raggruppamento di cellule nella regione d'ingresso dei nervi olfattivi e nella porzione mediana dei bulbi olfattivi (Schema 6). Essi costituiscono numerosi raggruppamenti distinti.



Schema 6 Nervo terminale in *Carassius auratus* (in rosso). I gangli del nervo terminale sono localizzati alla base del bulbo olfattivo (OB), e nel nervo olfattivo. In blu, neuroni e fibre di pertinenza del nucleo periventricolare ipotalamico.

Oltre alla rilevante differenza nella topografia degli elementi immunoreattivi tra le specie con bulbi olfattivi sessili, si evince un'ulteriore divergenza tra le specie con diversa morfologia del rinencefalo. Specie con bulbi olfattivi sessili presentano aggregati di neuroni costituiti da un numero massimo di nuclei immunoreattivi pari a 10 (*Astyanax fasciatus mexicanus*) e dimensioni cellulari che superano i 40  $\mu\text{m}$ . In *Carassius auratus*, con bulbi olfattivi pedunculati, il numero dei neuroni è in media pari a 65, con dimensioni che si aggirano intorno a 15  $\mu\text{m}$ . Le cellule immunoreattive che, nel pesce rosso, raggiungono i 40  $\mu\text{m}$  sono molto poche.

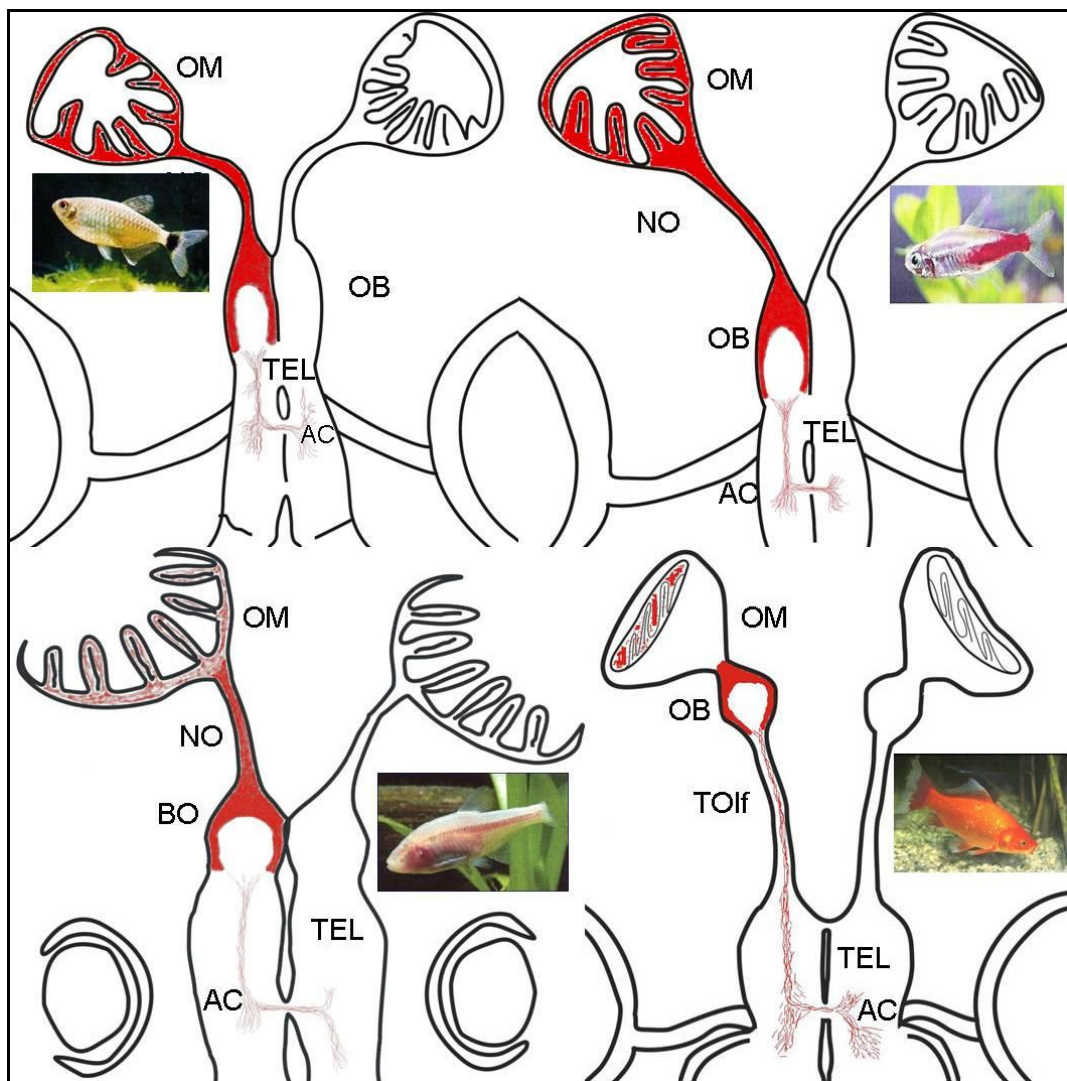
Da ciò si deduce che la condizione dei bulbi olfattivi influenza il numero e le dimensioni dei neuroni. Il decorso delle fibre del NT, invece, non è alterato dalla diversa morfologia del rinencefalo.

Le specie con una condizione sessile dei bulbi olfattivi presentano un'altra peculiarità: le fibre che hanno origine dai neuroni immunoreattivi del NT, dirette verso le regioni centrali dell'encefalo, presentano un calibro maggiore rispetto alle altre fibre immunoreattive riscontrate negli altri distretti encefalici. Le fibre di calibro maggiore hanno un decorso simile nelle tre specie: esse attraversano il telencefalo basale per raggiungere la regione ipotalamica, in prossimità del nucleo periventricolare ipotalamico. Unicamente in *Moenkhausia sanctaefilomenae*, le fibre di grosso calibro sono presenti anche nel mesencefalo e nel rombencefalo. Fibre di grosso calibro non sono state ritrovate nel nervo olfattivo. Questa caratteristica ha permesso di seguire il percorso delle fibre originate dalle cellule immunoreattive del NT, in modo da distinguerle da quelle originate da altri nuclei immunoreattivi. Dai neuroni immunoreattivi del NT hanno origine anche fibre di calibro inferiore. Esse sono presenti nel nervo olfattivo, dirette verso la mucosa olfattiva, senza contattarla.

*Carassius auratus*, invece, non presenta fibre di calibro maggiore come nelle altre specie. Ciò ha reso di difficile interpretazione la distinzione tra le fibre di pertinenza del NT e quelle degli altri nuclei immunoreattivi. Infatti, l'immunoistochimica per l'FMRFa ha messo in evidenza nel pesce rosso, come nelle altre specie analizzate, un altro gruppo di cellule immunoreattive. Esse sono localizzate, come detto in precedenza, in prossimità del nucleo periventricolare ipotalamico. Da tali cellule hanno origine fibre, di calibro inferiore, che invadono tutti i distretti encefalici.

Tuttavia, come detto nella sezione "Considerazioni metodologiche", i due nuclei immunoreattivi hanno diversa origine ontogenetica.

L'utilizzo dei traccianti neuronali ha permesso di caratterizzare il sistema di fibre olfattive extrabulbari. Nelle specie di teleostei analizzate, esso si presenta come un fascio compatto di fibre che oltrepassa i bulbi olfattivi, attraversa il telencefalo nella sua porzione medio-basale per poi decussare in prossimità della commessura anteriore. Il fascio di fibre prosegue nella porzione controlaterale dirigendosi verso il bulbo olfattivo controlaterale, senza contattarlo (Schema 7).



Schema 7 Estensione delle fibre EBOS nei teleostei studiati. La condizione topografica del bulbo olfattivo non condiziona la distribuzione delle fibre.

Oltre al fascio compatto, sono presenti anche fibre singole che innervano diversi distretti encefalici, quali pallio, ipsi e controlaterale, diencefalo, ipsi

e contro, e nucleo preottico. Le fibre singole hanno, in ogni modo, origine dal fascio principale.

Negli esemplari di *Moenkhausia sanctaefilomenae*, la quantità di fibre presenti nei distretti encefalici descritti è maggiore rispetto a quelle presenti nelle altre specie analizzate. Probabilmente, si tratta di una condizione specie-specifica.

L'utilizzo del tracciante neuronale biocitina, combinato con l'immunoistochimica per il tetrapeptide FMRFa, ha permesso di rivelare contemporaneamente il NT e il sistema di fibre olfattive extrabulbari. In tutti gli esemplari utilizzati, si evince una condivisione areale dei due sistemi: dai bulbi olfattivi, il NT e l'EBOS attraversano il telencefalo in posizione medio-basale, fino alla commessura anteriore, dove si assiste a decussazione. Fibre del NT raggiungono le regioni ipotalamiche; il sistema EBOS invade le regioni diencefaliche e il nucleo preottico, ma non le regioni ipotalamiche.

Tuttavia, nonostante la sovrapposizione dei due sistemi nei distretti encefalici analizzati, in nessun esemplare esaminato si assiste a colocalizzazione di materiale FMRFa e positività al tracciante.

## *Anfibi*

Lo studio del NT negli anfibi è stato ampiamente affrontato in letteratura (Herrick, 1909; McKibben, 1911; Wirsig and Getchell, 1986; Muske and Moore, 1988; Uchiyama et al., 1988; Hofmann and Meyer, 1989a, b; Schmidt and Roth, 1990; di Meglio et al., 1991; Hofmann and Meyer, 1992; Vallarino et al., 1993; Wirsig-Wiechmann, 1993; D'Aniello et al., 1994, 1996; Koza and Wirsig-Wiechmann, 2001; Pinelli et al., 2004).

I risultati ottenuti nel presente studio sono perfettamente comparabili con quelli presenti in letteratura nei quali è utilizzato come marker il tetrapeptide FMRFa.

Ai fini della discussione è importante ricordare la temporanea presenza, durante lo sviluppo, di fibre immunoreattive del NT nell'epitelio olfattivo. Tali fibre sono completamente assenti negli individui adulti (D'Aniello et al., 1996). Tale concetto è utile per spiegare la presenza, nei primi stadi di sviluppo, di neuroni del NT marcati in seguito all'applicazione dei traccianti lipofilici: le lesioni apportate alla mucosa olfattiva per l'applicazione dei cristalli di DiI o DiA, espongono le suddette fibre alla presenza del tracciante. In tal modo, parte del sistema del NT è marcato. Nei successivi stadi di sviluppo, tale inconveniente non si riscontra, in quanto il NT appare meno esteso (D'Aniello et al., 1995, 1996); ciò spiegherebbe l'assenza di neuroni marcati durante la metamorfosi.

Un analogo fenomeno di riduzione interessa anche il sistema di fibre olfattive extrabulbari (Fig. 52). La massima estensione del sistema EBOS è presente, in *Rana esculenta*, allo stadio 26. Tale stadio è rappresentato da un girino in cui sono presenti unicamente gli abbozzi degli arti posteriori.

La medesima estensione del sistema di fibre olfattive extrabulbari in *Xenopus laevis*, si riscontra allo stadio 56 (Fig. 71), girino in cui sono presenti sia gli abbozzi degli arti posteriori sia quelli degli arti anteriori.

In tale condizione, l'EBOS raggiunge, in entrambe le specie, gli stessi distretti encefalici. Infatti, fibre dal fascio principale circondano il recesso preottico, e, in seguito a decussazione alla commessura anteriore, invadono il diencefalo. Fibre si ritrovano anche nel mesencefalo e nel rombencefalo controlaterale. In entrambe le specie, le fibre EBOS raggiungono anche l'infundibolo. Solo in *Rana esculenta*, fibre si staccano dal fascio principale del telencefalo per innervare il pallio posteriore ipsilaterale.

In entrambe le specie, durante i successivi stadi di sviluppo, l'EBOS è sottoposto ad una sostanziale riduzione nel numero e nell'estensione delle fibre. Nell'adulto di *Rana esculenta* non sono presenti fasci compatti, e solo una o poche fibre invadono il telencefalo terminando nell'area mediana del setto.

Negli esemplari adulti di *Xenopus laevis*, il sistema appare più esteso rispetto alla rana verde: esso raggiunge la commessura anteriore e, in seguito a decussazione, raggiunge il diencefalo, con una concentrazione maggiore del numero di fibre in prossimità del talamo e dell'ipotalamo.

In definitiva, nonostante l'EBOS abbia la stessa estensione e gli stessi campi terminali nelle due specie durante lo sviluppo, la riduzione del sistema olfattivo extrabulbare è più consistente negli esemplari adulti di rana piuttosto che in quelli di *Xenopus*.

Differenze tra le due specie di anfibi si riscontrano anche nella morfogenesi delle componenti olfattive. Il sistema olfattivo dello *Xenopus laevis* è composto da una camera principale, l'air nose (Föske, 1934), da una camera laterale, il water nose (Altner, 1962) e dall'organo vomeronasale. In *Rana esculenta* è presente una sola camera e il vomeronasale. Grazie all'immunoistochimica per la PCNA si constata che nei primi stadi di sviluppo, il placode olfattivo, in entrambe le specie, presenta un'immunoreattività omogeneamente distribuita, senza strutture



differenziate. I primi processi d'invaginazione del placode olfattivo si riscontrano in uno stadio di sviluppo, in entrambe le specie, corrispondente ad un girino che non presenta gli abbozzi delle zampe posteriori. Allo stesso stadio, ovvero il 42, in *Xenopus laevis* compare anche il primordio dell'organo vomeronasale. In *Rana esculenta* tale organo inizia a differenziarsi più tardivamente, quando gli arti posteriori sono già abbozzati. In uno stadio corrispondente, in *Xenopus laevis*, si assiste alla formazione di una nuova camera olfattiva, la quale si estende lateralmente. Le ghiandole di Bowman compaiono nell'air nose solo durante la metamorfosi, stadio in cui si aprono anche le coane. In *Rana esculenta*, le ghiandole del Bowman compaiono, invece, poco prima dell'emergenza delle zampe anteriori e le coane si aprono ancora prima (stadio 25, corrispondente ad un girino che non presenta ancora l'abbozzo delle zampe posteriori).

L'attività proliferativa segue un decorso simile nelle due specie esaminate. Infatti, negli stadi iniziali, nuclei PCNA-ir si ritrovano numerosi in tutti i tessuti presenti nelle sezioni a livello delle aree olfattive. I placodi olfattivi appaiono omogeneamente immunoreattivi. Negli stadi successivi, l'immunoreattività tende a sfumare progressivamente nelle cellule disposte verso il lume delle camere olfattive e a concentrarsi maggiormente nelle regioni basali.

In definitiva, l'attività proliferativa nelle due specie risulta comparabile durante lo sviluppo. Tuttavia, si riscontrano differenze temporali nella morfogenesi delle componenti olfattive. Infatti, nonostante i processi di invaginazione dei placodi olfattivi abbiano inizio in uno stadio dello sviluppo equivalente, l'organo vomeronasale si differenzia più precocemente in *Xenopus laevis* (stadio in cui gli abbozzi degli arti posteriori non sono ancora formati). In *Rana esculenta*, invece, l'organo vomeronasale appare quando il girino presenta già gli abbozzi degli arti

posteriori. Le ghiandole di Bowman della mucosa olfattiva appaiono in *Rana esculenta* prima della metamorfosi, intorno allo stadio 30, mentre in *Xenopus laevis* solo alla metamorfosi. La presenza delle ghiandole è un indicatore molto importante che annuncia l'inizio della funzionalità aerea della mucosa olfattiva. Il motivo per cui nella rana tale fenomeno è molto precoce, non è chiaro. Si potrebbe ipotizzare che il girino inizi ad usare la mucosa olfattiva in ambiente aereo prima della metamorfosi: in effetti, in stadi avanzati dello sviluppo precedenti la metamorfosi, le risalite in superficie si fanno molto più frequenti.

Altro dato interessante da rilevare è la ristrutturazione delle camere olfattive in *Xenopus laevis*: quella principale, inizialmente un water nose, diventerà un air nose, laddove il ruolo di water nose sarà assunto dalla camera laterale di nuova formazione. Ciò trova spiegazione nel fatto che i pipidi sono secondariamente acquatici.

Lo studio sulla morfogenesi delle componenti olfattive, mediante immunisto chimica per la PCNA, ha permesso di valutare i differenti pattern temporali di proliferazione durante lo sviluppo. In tal senso è possibile analizzare lo sviluppo dell'EBOS nel tentativo di individuare i neuroni da cui ha origine il sistema di fibre. Non è possibile fare altrettanto per il NT, in quanto sono persi i contatti diretti tra il sistema e la mucosa olfattiva durante lo sviluppo.

In *Xenopus laevis*, negli stadi di sviluppo dal 42 al 50, l'attività proliferativa è generalizzata. La camera principale presenta forte attività nelle regioni basali dell'epitelio olfattivo. In questi stadi, l'EBOS si estende fino alle regioni diencefaliche, dopo decussazione alla commessura anteriore. È intuibile che in questi stadi di sviluppo, le proiezioni extrabulbari abbiano origine unicamente dalla camera principale. Si esclude l'origine delle fibre da cellule presenti nel vomeronasale in quanto mediante marcatura

retrograda non sono stati ritrovati neuroni olfattivi marcati nell'organo del Jacobson.

Allo stadio 50 si verifica la formazione della camera laterale, il futuro water nose dell'individuo adulto. Parallelamente, il numero delle fibre EBOS si accresce progressivamente fino a raggiungere la massima estensione allo stadio 56. In questo stadio di sviluppo, le fibre extrabulbari si ritrovano fino al rombencefalo. È molto probabile che l'aumento del numero delle fibre EBOS sia dovuto all'aumento nel numero dei corpi cellulari nella mucosa olfattiva; a suffragio di tale ipotesi è l'aumento del numero di cellule positive, rispetto agli stadi di sviluppo precedenti, visualizzate mediante i sistemi di marcatura retrograda.

Questo fenomeno è direttamente riconducibile all'incremento della proliferazione che si assiste a partire dallo stadio 50 per la formazione della camera laterale. Questo dato concorda con i risultati ottenuti da Gaudin e Gascuel (2005), per cui le proiezioni extrabulbari hanno origine in parte dalla camera principale e in parte da quella laterale. La successiva riduzione dell'EBOS è probabilmente dovuta alla morte cellulare dei corpi cellulari da cui ha origine.

Differente è il caso di *Rana esculenta*. Il primo stadio analizzato è il 26: le proiezioni extrabulbari in questo momento dello sviluppo raggiungono la loro massima estensione. Nell'epitelio olfattivo è ancora in corso il processo di invaginazione; quindi non è ancora ben definita la camera principale. Quindi, l'EBOS ha origine in uno stadio più precoce, probabilmente nel momento in cui hanno inizio i primi processi di invaginazione, intorno allo stadio 23. Purtroppo, nel presente studio non sono disponibili dati per supportare tale ipotesi.

Si può escludere l'origine delle proiezioni extrabulbari dall'organo vomeronasale in quanto la formazione di tale struttura ha inizio a partire

dallo stadio 27. Anche in questo caso, la successiva riduzione dell'EBOS a cui si assiste è probabilmente dovuta a morte cellulare.

L'attività proliferativa della mucosa olfattiva in rana procede anche dopo la metamorfosi, a prescindere dalla riduzione dell'EBOS. Tale fenomeno è in relazione alla necessità di accrescere l'epitelio olfattivo per supportare l'accrescimento corporeo dell'animale.

## ANALISI COMPARATIVA INTERCLASSE

L'analisi comparativa nelle due classi analizzate permette di esprimere alcune considerazioni. Il pattern del NT è simile nelle specie analizzate: esso è caratterizzato da un sistema di fibre con terminali nella mucosa olfattiva e nelle regioni ipotalamiche. Presenta gangli lungo il suo percorso, in posizioni diverse in relazione alla specie analizzata.

Nei teleostei è presente il sistema olfatto-retinale, complesso di fibre che presenta terminazioni nella mucosa olfattiva e, contemporaneamente, alla retina, attraverso le vie del telencefalo anteriore, chiasma ottico e nervo ottico. Come detto in precedenza, in quanto a posizione e odologia, il NOR è ritenuto omologo al NT (Munz and Claas, 1981). Probabilmente, esso rappresenta solo una parte del sistema.

Un sistema caratterizzato dalla presenza di proiezioni retinopetali è stato descritto anche in anfibi anuri, tra cui *Xenopus laevis* (Uchiyama et al., 1988). Tuttavia, tale complesso di fibre non è immunoreattivo ad anticorpi diretti contro il GnRH, così come il NT.

Il sistema EBOS dei teleostei ed anfibi studiati nel presente lavoro, presenta delle caratteristiche in comune. Da premettere che nel presente studio non è stato possibile analizzare gli stadi di sviluppo delle quattro specie di teleostei analizzate. Pertanto, l'analisi comparativa sarà riferita unicamente allo stadio adulto.

Il sistema di fibre olfattive extrabulbari dei teleostei è caratterizzato dalla presenza di un fascio compatto di fibre che, oltrepassando il bulbo olfattivo, invade il telencefalo nella sua porzione medio-basale; in seguito raggiunge le regioni ipotalamiche dopo decussazione alla commessura anteriore. In *Rana esculenta* una condizione del genere si assiste durante lo sviluppo, in quanto l'adulto presenta singole fibre che raggiungono al massimo l'area mediana del setto.

Gli adulti di *Xenopus laevis*, invece, presentano una condizione molto simile a quella riscontrata nei teleostei: il fascio compatto di fibre raggiunge il diencefalo, con una concentrazione maggiore di fibre nelle regioni talamiche ed ipotalamiche.

Secondo alcuni studiosi, il sistema EBOS in *Xenopus laevis* ha origine dalla camera olfattiva laterale, il water nose (Hofmann and Meyer, 1992), il quale si pensa sia implicato nella percezione delle sostanze disciolte in acqua (Föske, 1934; Altner, 1962).

I presenti dati indurrebbero a pensare che l'EBOS nella rana verde non abbia alcun significato funzionale, dal momento che *Rana esculenta* adulta non presenta un water nose. In verità, ci sono altre specie di anfibi che presentano da adulti un sistema di fibre olfattive extrabulbari, e che non presentano un water nose: *Bufo marinus* presenta un EBOS con le stesse caratteristiche dello *Xenopus* (Hofmann and Meyer, 1989a), ma non ci sono prove sull'esistenza di un water nose nella specie.

Schmidt e Wake (1990b) studiando il sistema olfattivo in alcune specie di gimnofioni, hanno descritto un sistema EBOS in *Ichthyophis kohtaeonsis* e *Typhlonectes natans*, con proiezioni fino al diencefalo. La prima specie è prevalentemente sotterranea (Dunker et al., 2000), mentre la seconda è secondariamente acquatica (Schmidt and Wake, 1990b).

Inoltre, lo studio su dieci specie di salamandre dimostra che l'EBOS si sviluppa a prescindere dal tipo di vita, sia esso acquatico o terrestre (Schmidt et al., 1988).

Per di più, in un recente studio di Gaudin and Gascuel (2005), così come nel presente lavoro, è stato dimostrato che le proiezioni extrabulbari nello *Xenopus laevis* hanno origine in parte dal water nose e in parte dall'air nose.

Queste osservazioni inducono a pensare che l'EBOS non sia coinvolto nella percezione delle sostanze disciolte in acqua come precedentemente

ipotizzato (Hofmann and Meyer, 1992a, 1995; Meyer and Rastogi, 1998). Piuttosto, esso potrebbe essere correlato con alcune primitive funzioni meno importanti o che scompaiono durante l'evoluzione degli amnioti (D'Aniello et al., 2007). A tal proposito è utile ricordare che negli osteitti si assiste ad una riduzione evolutiva dell'EBOS (Hofmann and Meyer, 1995; Pinelli et al., 2004), per cui le specie più derivate presentano un sistema di fibre olfattive extrabulbari meno esteso. In un contesto simile, la presenza di un EBOS ben sviluppato durante lo sviluppo di mammiferi ed uccelli (Meyer et al., 1987; Santacana et al., 1992), così come negli anuri (Hofmann and Meyer, 1992; D'Aniello et al., 2007; presente studio), potrebbe riflettere, con tutte le dovute precauzioni, un fenomeno evolutivo di ricapitolazione.

## CONSIDERAZIONI FUNZIONALI

Il coinvolgimento funzionale del sistema del NT è un tema largamente discusso in letteratura. Un recente studio afferma che la specifica funzione di tale nervo è ancora sconosciuta (Zhang and Delay, 2007).

Diverse sono le implicazioni funzionali attribuite al NT. Demski (1993a) ne riporta diverse, tra le quali che esso è: 1) un sistema di fibre sensoriali dirette alla mucosa olfattiva; 2) costituito da assoni vasomotori diretti ai vasi sanguigni della mucosa olfattiva; 3) costituito da fibre secretomotorie per le ghiandole di Bowman; 4) costituito da terminazioni neurosecretorie su vasi sanguigni e proiezioni neuromodulatorie attraverso le quali i peptidi presenti nel NT sono largamente distribuiti nei diversi distretti encefalici, retina e regione olfattiva.

Quest'ultima componente è da spunto per ulteriori considerazioni sul sistema olfatto-retinale. Demski e Northcutt (1983) hanno ipotizzato che il sistema olfatto-retinale potesse essere coinvolto nel controllo della fisiologia riproduttiva e del comportamento: infatti, la stimolazione sia del tratto olfattivo mediale, ma non di altre parti del tratto olfattivo, sia del nervo ottico, provoca il rilascio di sperma. Altri autori hanno anche suggerito che il sistema olfatto-retinale possa mediare le risposte ai feromoni sessuali femminili negli individui maschili, in quanto l'attività diminuisce, o è eliminata, da lesioni del tratto olfattivo mediale e septo-preottiche (Stacey and Kyle, 1983; Kyle et al., 1987). Altro dato interessante riguardo al NOR è la presenza in *Oncorhynchus kisutch* di proiezioni alla retina immunoreattive all'FMRFa solo durante la "smoltification", ovvero nel momento in cui il pesce si prepara alla migrazione dall'acqua dolce al mare (Ebbesson et al., 1991).



Diverso è il caso dell'*Astynax fasciatus mexicanus*. Il nervo ottico del caracide cieco è sottoposto ad un fenomeno di degenerazione che si conclude entro i primi tre mesi di vita (Jeffery, 2005). Gli individui adulti sono dotati di occhi abbozzati, non collegati mediante vie nervose al resto dell'encefalo e per questo non funzionali. Ciononostante, a parte per la regione ottica, questo fenomeno non incide sulla struttura del "sistema olfatto-retinale". Quindi, l'assenza di nervo ottico nell'adulto induce a non considerare l'aggregato di cellule immunoreattivo, seppure da ritenere omologo per odologia ed anatomia al nucleo olfatto-retinale, un effettivo NOR. Piuttosto si può ritenere un nucleo implicato nel trasferimento delle informazioni dalle regioni olfattive alle regioni centrali dell'encefalo e viceversa.

Secondo quanto riportato, in relazione alla sua anatomia ed odologia, sembra ragionevole pensare che il NT sia implicato funzionalmente nella modulazione della mucosa olfattiva, precisamente degli "olfactory receptor neurons" (ORN), attraverso la secrezione di neuropeptidi quali il GnRH o altri.

Le implicazioni funzionali dell'EBOS sono poco conosciute, così come per il NT. In un primo momento si pensava fosse implicato nella percezione di sostanze disciolte in acqua (Hofmann and Meyer, 1992, 1995; Meyer and Rastogi, 1998). In seguito, è stato dimostrato che la presenza dell'EBOS è scarsamente correlata alla vita acquatica (Schmidt et al., 1988; Schmidt and Wake, 1990b; D'Aniello et al., 2007; presente studio).

In primo luogo, bisogna comprendere se considerare realmente il sistema di fibre olfattive extrabulbari una componente del sistema olfattivo: con quest'ultimo, l'EBOS ha in comune diversi marker, quali la Somatostatina, la Sostanza P, l'Olfactory marker protein (OMP). In realtà, la Sostanza P è utilizzata anche come marker per il NT; altri marker, tra cui l'OMP, sono espressi in cellule che presentano un fenomeno di migrazione molto simile

a quello delle cellule di natura terminale. Inoltre, l'OMP è anche espressa in cellule che derivano dalla cresta neurale (Servenius et al., 1994). Poiché almeno una parte delle cellule del NT si pensa abbia origine dalla cresta neurale (Whitlock et al., 2003), l'OMP non potrebbe essere considerato come esclusivo degli ORN.

Quindi, l'espressione dell'OMP nell'EBOS non prova che cellule con assoni che oltrepassano i bulbi olfattivi siano fibre olfattive primarie piuttosto che elementi del NT (von Bartheld, 2004). Inoltre, questo tipo di cellule con proiezioni extrabulbari, non presenta le classiche ciglia dendritiche caratteristiche degli ORN (Anadon et al., 1995). Le cellule da cui ha origine il sistema olfattivo di fibre extrabulbari, essendo localizzate nell'epitelio olfattivo, somigliano a normali o senescenti olfactory receptor neuron (Muller and Marc, 1984). Sfortunatamente, non sono presenti in letteratura studi che dimostrano la presenza di ciglia su tali cellule. In realtà, sembra che i corpi EBOS manchino di ciglia e del caratteristico dendrite rod-like proprio degli ORN (Anadon et al., 1995). Per di più, la sola presenza di ciglia non implica che l'EBOS sia una componente del sistema olfattivo. Infatti, cellule del NT immunopositive al GnRH possono conservare le ciglia anche dopo la loro migrazione (Jennes et al., 1985; Kozłowski et al., 1980).

Quindi, presupposto quanto detto per i corpi cellulari da cui ha origine l'EBOS, si potrebbe accettare l'idea che tale sistema di fibre sia costituito da cellule del NT non migrate. A supportare tale ipotesi è un recente studio (Biju et al., 2003) in cui è dimostrata la presenza, nella carpa, di cellule immunopositive al GnRH nell'epitelio olfattivo. Tuttavia, è bene ricordare che la presenza dell'immunopositività è correlata ad una fase del ciclo vitale dell'animale, quella riproduttiva, ed è unicamente presente negli esemplari femminili.

La natura “olfattiva” dell’EBOS non può prescindere da determinate caratteristiche: la presenza sui corpi cellulari di ciglia dendritiche che si estendono nel lume della mucosa olfattiva; l’origine ontogenetica dell’EBOS dal placode olfattivo e non dalla cresta neurale; la presenza di proteine coinvolte specificamente nei meccanismi di trasduzione del segnale correlati alla funzione olfattiva.

Queste caratteristiche potrebbero confermare la natura olfattiva dell’EBOS.

Tuttavia, è possibile considerare un’ulteriore ipotesi, ovvero che l’EBOS, in realtà, sia di natura diversa da quella olfattiva, in quanto potrebbe avere implicazioni funzionali che sono poco, se non per nulla, correlate a quelle olfattive. D'altronde, non sono ancora presenti, in letteratura, studi d’elettrofisiologia in modo da ipotizzare specifiche funzioni del sistema.

Tuttavia, è confermata in letteratura la natura primaria delle proiezioni extrabulbari (Becerra et al., 1994), anche se, in precedenza, alcuni autori hanno descritto le fibre EBOS come proiezioni olfattive secondarie (Honkanen and Ekström, 1990).

Si potrebbe pensare all’EBOS come ad un collaterale delle fibre olfattive primarie sfuggito alla sinapsi con i dendriti delle cellule mitrali. Anche questo modello può essere scartato in quanto in seguito all’applicazione retrograda dei traccianti, i glomeruli non sono marcati.

## EBOS E NT

La prima descrizione del sistema di fibre olfattive extrabulbari (Szabo et al., 1991) suscitò non poco scalpore negli studiosi addetti alla materia. Le affermazioni di Szabo, e dopo pochi anni anche di Northcutt (Eisthen and Northcutt, 1996), davano una diversa interpretazione ai risultati ottenuti in seguito all'applicazione di traccianti alla mucosa olfattiva: mediante tale metodica, in realtà, si evidenziava l'EBOS e non il NT.

Alcuni studiosi interessati all'argomento erano, e lo sono tuttora, poco propensi ad accettare l'idea di un sistema "extrabulbare" diverso dal NT.

Come si è detto in precedenza, si è propensi a credere che il sistema di fibre olfattive extrabulbari sia una componente di natura terminale. In effetti, i due sistemi condividono in maniera inverosimile gli stessi distretti encefalici. Tuttavia, è utile ricordare un concetto: le fibre che provengono dalle regioni olfattive raggiungono il telencefalo attraverso il medial olfactory tract e il lateral olfactory tract. Questi due elementi sono ben visibili nei teleostei con condizione pedunculata dei bulbi olfattivi, in quanto costituiscono i tratti olfattivi che congiungono i bulbi stessi al telencefalo. Nella regione precommessurale del telencefalo, la maggior parte dei fasci nervosi si unisce a formare il "medial forebrain bundle" e il "lateral forebrain bundle". Questi due fasci raggiungono la commessura anteriore e poi, in seguito a decussazione, si portano nel diencefalo. È lecito, quindi aspettarsi che i due sistemi, provenienti entrambi dalle regioni anteriori dell'encefalo, possano condividere le stesse aree encefaliche.

Nonostante l'EBOS e il NT siano strettamente associati dal punto di vista anatomico, ciò non toglie che sia possibile caratterizzarne la morfologia. Nel presente lavoro, lo studio neuroanatomico dei due sistemi in questione

è stato affrontato mediante tecniche immunostochimiche ed utilizzo di traccianti.

Le tecniche immunostochimiche hanno permesso di caratterizzare il percorso del NT: esso si estende dalle regioni anteriori dell'encefalo, fino a quelle ipotalamiche. È contraddistinto dalla presenza di neuroni associati in gangli lungo il suo decorso. Come visto in precedenza, la posizione di tali gangli è variabile nelle specie e nelle classi. Nonostante cellule gangliari del NT abbiano proiezioni verso le regioni anteriori dell'encefalo, non sono mai state riscontrate cellule e/o elementi immunopositivi nell'epitelio olfattivo. Ciò induce a considerare, ma soprattutto a confermare, l'idea che il NT non presenta corpi cellulari nell'epitelio olfattivo.

L'applicazione di traccianti alla mucosa olfattiva ha permesso di evidenziare il sistema di fibre olfattive extrabulbari. Quest'ultimo presenta un decorso simile al NT, ma i campi terminali sono diversi: oltre al diencefalo, sono raggiunti anche mesencefalo e, in alcuni stadi di sviluppo degli anfibi, il rombencefalo.

Inoltre, non sono presenti cellule positive lungo il percorso dell'EBOS. Queste caratteristiche morfologiche depongono a favore dell'ipotesi che il NT e l'EBOS sono due entità anatomiche distinte.

In realtà, l'applicazione alla mucosa olfattiva dei traccianti nei primi stadi di sviluppo in rana e *Xenopus*, ha portato alla marcatura di cellule gangliari del NT. Tuttavia, come detto in precedenza, questa condizione è presente unicamente nei primi stadi di sviluppo, nel momento in cui le proiezioni del NT sono ancora presenti in prossimità della regione olfattiva, con la quale condivide la stessa origine ontogenetica.

Da quanto detto, si può intuire che i due sistemi sono distinti da caratteristiche morfologiche diverse: il NT non presenta corpi cellulari

nella mucosa, si contraddistingue per la presenza di cellule associate in gangli e ha proiezioni che si spingono alle regioni ipotalamiche.

L'EBOS presenta corpi cellulari nella mucosa, non è caratterizzato da gangli lungo il suo percorso e i campi terminali sono diencefalo, mesencefalo e, in alcuni casi, rombencefalo.

A confermare ulteriormente l'ipotesi che i due sistemi di fibre sono, in realtà, entità distinte, è la metodica di doppia marcatura biocitina – immunoistochimica per l'FMRFa. Vantaggio della biocitina rispetto all'utilizzo dei traccianti lipofilici, è quello di applicare il tracciante senza danneggiare la mucosa olfattiva. Le polveri di traccianti sono incorporate unicamente dalle cellule dell'epitelio olfattivo e non dagli elementi del NT. Infatti, nei primi stadi di sviluppo della rana e *Xenopus*, non si assiste alla presenza di cellule gangliari marcate con la biocitina. Questo permette di discriminare fin dai primi stadi di sviluppo i due sistemi.

Il risultato di quest'approccio sperimentale è la visualizzazione, sullo stesso preparato, del sistema dell'EBOS e del NT. Essi condividono le stesse aree, ma in nessun campione e stadio di sviluppo analizzato, si assiste a colocalizzazione di tracciante e immunopositività all'FMRFa. Inoltre, i due sistemi non sono in relazione tra loro, in quanto non sono stati osservati collegamenti tra gli elementi dei due sistemi né, tantomeno, fibre dell'EBOS innervavano cellule appartenenti al NT.

## CONCLUSIONI

I dati riportati in questo lavoro, dimostrano che il NT e l'EBOS nei teleostei e nelle specie di anfibi studiati, sono da considerarsi entità anatomicamente distinte. Le metodologie utilizzate dimostrano che i due sistemi condividono i medesimi distretti encefalici, conservando, pur tuttavia, una propria identità.

Molto probabilmente, il NT è implicato funzionalmente nella regolazione della mucosa olfattiva, come ampiamente dimostrato in letteratura. Scarse sono le informazioni sulle implicazioni funzionali dell'EBOS. La sua natura di sistema di fibre "olfattive" è da confermare in quanto non sono presenti studi fisiologici che comprovino la sua controparte nel sistema olfattivo. C'è bisogno di identificare e caratterizzare meglio le cellule recettoriali olfattive da cui ha origine l'EBOS, magari mediante un marker selettivo. Questo tornerebbe utile negli studi di elettrofisiologia, in modo da ipotizzare una stimolazione selettiva delle cellule recettoriali olfattive. Altra direzione futura sarebbe quella di definire dettagliatamente i campi terminali dell'EBOS, in modo da correlare il significato dell'EBOS con la funzione dell'area innervata.

La caratterizzazione morfologica assume, senz'altro, un'importanza fondamentale nello studio di componenti neuroanatomiche. È da ritenersi elemento essenziale per la comprensione delle implicazioni funzionali di sistemi correlati. Tuttavia, essa richiede approfonditi studi fisiologici, per convalidare ipotesi su determinate implicazioni funzionali.

È solo tramite l'approccio elettrofisiologico che si possono assegnare specifiche competenze funzionali e stabilire, infine, il concetto per cui il nervo terminale e il sistema di fibre olfattive extrabulbari sono da considerarsi entità distinte.

## BIBLIOGRAFIA



- Adair JS (1964). The olfactory bulb and related nuclei of the sturgeon (*Scaphirhynchus platorhynchus*). *Ala. J. Med. Sci.* **35**, 386-398.
- Allis EP (1897). The cranial muscles and cranial and first spinal nerves in *Amia calva*. *J. Morphol.* **12**, 487-809.
- Alonso JR, Covenas R, Lara J, de Leon M, Arevalo R and Aijon J (1989). Substance P-like immunoreactivity in the ganglion cells of the tench terminal nerve. *Neurosci. Lett.* **106**, 253-257.
- Altner H (1962). Untersuchungen über Leistungen und Bau der Nase des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Daudin, 1803). *Z. Verge Physiol.* **45**, 272-306.
- Anadón R, Manso MJ, Rodriguez-Moldes I, Becerra M (1995). Neurons of the olfactory organ projecting to the caudal telencephalon and hypothalamus: a carbonyne-dye labelling study in the brown trout (Teleostei). *Neurosci. Lett.* **106**, 253-257.
- Backstrom K (1924). Contribution to the forebrain morphology in selachians. *Acta Zool.* **5**, 123-240.
- Becerra M, Manso MJ, Rodriguez-Moldes I, Anadón R (1994). Primary olfactory fibres project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): a developmental immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* **342**, 131-143.
- Bertamar G (1981). Evolution of vomeronasal organ in vertebrates. *Evolution.* **35**, 359-366. *Biochem. Physiol.* **42(1)**, 121-129.
- Biju KC, Singru PS, Schreiber MP, Subhedar N (2003). Reproduction phase-related expression of GnRH-like immunoreactivity in the olfactory receptor neurons, their projections to the olfactory bulb and in the nervus terminalis in the female Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **133(3)**, 358-367.
- Boer HH, Schot LPC, Veenstra JA, Reichelt D (1980). Immunocytochemical identification of neural elements in central nervous systems of a snail, some insects, a fish and a mammal with an antiserum to the molluscan cardioexcitatory tetrapeptide FMRFamide. *Cell Tissue Res.* **231**, 21-27.
- Bonn U, König B (1988). FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and pituitary of *Xenotoca eisenii* (Cyprinodontiformes, Teleostei). *J. Brain Res.* **29**, 121-131.
- Bonn U, König B (1989a). FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the teleost *Eigenmannia lineata* (Gymnotiformes). *J. Mikrosk. Anat.* **103**, 221-236.
- Bonn U, König B (1989b). FMRFamide immunoreactivity in the brain and pituitary of *Carassius auratus* (Cyprinidae, Teleostei). *J. Hirnforsch.* **30(3)**, 361-370.
- Broman I (1920). Die Organon Vomero-nasale Jacobsoni – ein Wassergeruchorgan! *Anat. Hefte.* **58**, 143-191.

Brownlee DJA, Soirwether JCE, Smart D, Shaw C, Helton DW (1993). Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the SNC of the roundworms *Ascaris suurw* (Nematode-Ascaridea). *Parasitology* **106**, 305-316.

Brookover C (1914). The nervus terminalis in adult man. *J. Comp. Neurol.* **24**, 131-135.

Brookover C (1917). The peripheral distribution of the nervus terminalis in an infant. *J. Comp. Neurol.* **28**, 349-360.

Brown JW (1980). Development history of nervus terminalis embryos of insectivorous bats. *Anat. Rec.* **196**, 23-35.

Cajal SR (1909, 1911). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés (trans. L. Azoulay), Paris: Maloine. English translations: Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates (trans. N. Swanson and L. W. Swanson), New York: Oxford University Press, 1995; Texture of the Nervous System of Man and the Vertebrates (annotated and edited translation of the original Spanish text with the additions of the French version by P. Pasik and T. Pasik), Vienna/New York: Springer, 2000-2001.

Chiba A, Honma Y (1992). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain and hypophysis of the cloudy dogfish, *Scyliorhinus torazame*. *Cell Tissue Res.* **268(3)**, 453-461.

Chiba A, Sohn YC, Honma Y (1996). Distribution of neuropeptide Y and gonadotropin-releasing hormone immunoreactivities in the brain and hypophysis of the ayu, *Plecoglossus altivelis* (Teleostei). *Arch. Histol. Cytol.* **59(2)**, 137-148.

Cohen DH, Duff TA and Ebbesson SOE (1973). Electro-physiological identification of a visual area in shark telencephalon. *Science* **182**, 492-494.

Cottrell GA (1978). Actions of molluscan cardioexcitatory neuropeptide on identified 5-Hydroxytryptamine-containing neurons and their follower neurons in *Elix pomatia*. *J. Physiol.* **284**, 130-131.

D'Aniello B, Masucci M, di Meglio M, Iela L and Rastogi RK (1994). Immunohistochemical localization of GnRH in the crested newt (*Triturus cristatus*) brain and terminal nerve: a developmental study. *J. Neuroendocrinol.* **6**, 167-172.

D'Aniello B, Pinelli C, Di Fiore M, Iela L, King JA, Rastogi RK (1995). Development and distribution gonadotropin-releasing hormone neuronal system in the frog (*Rana esculenta*) brain: immunohistochemical analysis. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* **89**, 281-288.

D'Aniello B, Fiorentino M, Pinelli C, di Meglio M, Vallarino M, Rastogi RK (1996). Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and pituitary of *Rana esculenta* during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **95(2)**, 194-204.

D'Aniello B, Fiorentino M, Pinelli C, Guarino FM, Angelini F, Rastogi RK. (2001) Localization of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain of the viviparous skink (*Chalcides chalcides*). *Brain. Behav. Evol.* **57(1)**, 18-32.

D'Aniello B, Pinelli C, Polese G, Luongo L, Rastogi RK (2007). Developmental analysis of the extrabulbar olfactory projection in the ranid frog with some phylogenetic considerations. *Ital. J. Zool.* In Press.

Demski LS and Northcutt RG (1983). The terminal nerve: a new chemosensory system in vertebrates? *Science* **220(4595)**, 435-437.

Demski LS, Ridgway SH and Schwanzel-Fukuda M (1990). The terminal nerve of dolphins gross structure, histology and luteinizing hormone-releasing hormone immunocytochemistry. *Brain Behav. Evol.* **36**, 249-261.

Demski LS (1993a). Terminal nerve complex. *Acta Anat.* (Basel) **148(2-3)**, 81-95.

Demski LS (1993b). Reproductive physiology of teleost fishes. In "Captive Conservation of Endangered Species", Gibbons EF, Demarest J, Durrant BS eds. Albany, SUNY Press.

Denizot JP, Szabo T, Blähser S, Véron-Ravaille M, Rouilly D (1988). *Neurosci. Abstr.* **14**, 985.

Derivot JH (1984a). Functional anatomy of the peripheral olfactory system of the African lungfish *Protopterus annectens* owen: development of the primary olfactory pathway during postembryonic growth. *Am. J. Anat.* **171(1)**, 15-23.

Derivot JH (1984b). Functional anatomy of the peripheral olfactory system of the African lungfish *Protopterus annectens* owen: macroscopic, microscopic, and morphometric aspects. *Am. J. Anat.* **169(2)**, 177-192.

di Meglio M, Masucci M, D'Aniello B, Iela L and Rastogi RK (1991). Immunohistochemical localization of multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in the brain of frog. *J. Neuroendocrinol.* **3**, 363-368.

Dockray GJ, Williams RG (1983). FMRFamide-like immunoreactivity in rat brain: development of a radioimmunoassay and its application in studies of distribution and chromatographic properties. *Brain Res.* **266**, 295-303.

Dulka JG, Stacey NE, Sorensen PW, Van der Kraak GJ and Marchant TA (1987). A sex pheromone system in goldfish: is the nervus terminalis involved? In *The terminal Nerve (Nervus Terminalis) Structure, Function and Evolution* (eds. by L.D. Demsky and Schwanzel-Fukuda). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **519**, 411-420.

Dulka JG (1993). Sex pheromone systems in goldfish: comparisons to vomeronasal systems in tetrapods. *Brain Behav. Evol.* **42(4-5)**, 265-280.

Dunker N, Wake MH, Olson WM (2000). Embryonic and larval development in the caecilian *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibian, Gymnophiona): a staging table. *J. Morphol.* **243**, 3-34.

Ebberink RH, Price DA, van Loenhout H, Doble KE, Riehm JP, Geraerts WP, Greenberg MJ (1987). The brain of *Lymnaea* contains a family of FMRFamide-like peptides. *Peptides* **8**, 515-522.

- Ebbesson SOE and Heimer L (1968). Olfactory bulb projections in two species of sharks. *Anat. Rec.* **160**, 469.
- Ebbesson SOE and Schroeder DM (1971). Connections of the nurse shark's telencephalon. *Science* **173**, 254-256.
- Ebbesson SOE, Meyer DL, Malz CR, Bazer GT (1991). Ontogeny of the olfactory-retinal projection in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Exp. Zool.* **257**, 220-222.
- Eisthen HL, Northcutt RG (1996). Silver lampreys (*Ichthyomyzon unicuspis*) lack a gonadotropin-releasing hormone- and FMRFamide-immunoreactive terminal nerve. *J. Comp. Neurol.* **370**(2), 159-172.
- Ekström P, Honkanen T, Ebbesson SO (1988). FMRFamide-like immunoreactive neurons of the nervus terminalis of teleosts innervate both retina and pineal organ. *Brain Res.* **460**(1), 68-75.
- Faucette JR (1969). The accessory olfactory bulbs and the lateral telencephalic wall of the rat-fish, Chimaera. *J. Comp. Neurol.* **137**(4), 407-431.
- Fasano S, Pierantoni R, Minucci S, Di Matteo L, D'Antonio M, Chieffi G (1989). Effects of intratesticular injection of estradiol and gonadotropin releasing hormone on plasma androgen levels in intact and hypophysectomized *Torpedo marmorata* and *Torpedo ocellata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**, 349-354.
- Fischer AJ, Reisch HM, Kyle AL, Stell WK (1996). Characterization of the RFamide-like neuropeptides in the nervus terminalis of the goldfish (*Carassius auratus*). *Regul. Pept.* **23**, 73-87.
- Fiorentino M, Pinelli C, D'Aniello B, Iela L, di Meglio M, Rastogi RK (2001). Development and distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the toad (*Bufo bufo*) brain. *J. Chem. Neuroanat.* **21**, 201-213.
- Forlano PM, Maruska KP, Sower SA, King JA and Tricas TC (2000). Differential distribution of gonadotropin releasing hormone-immunoreactive neurons in the stingray brain: functional and evolutionary considerations. *Gen. Comp. Endocrinol.* **118**, 226-248.
- Föske H (1934). Das Geruchsorgan von *Xenopus laevis*. *Z. Anat. Entwicklungsgesch* **103**, 519-550.
- Fritsch G (1878). Untersuchungen über den feineren Bau des Fischgehirns mit besonderer Berücksichtigung der Homologien bei anderen Wirbeltierklassen. *Verlag der Guttman'schen Buchhandlung*, Berlin, pp 1-94.
- Fujii K, Kobayashi H (1992). FMRFamide-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ann. Anat.* **174**(3), 217-222.

Fujimoto M, Takeshita K, Wang X, Takabatake I, Fujisawa Y, Teranishi H, Ohtani M, Muneoka Y, Ohta S (1998). Isolation and characterization of a novel bioactive peptide, *Carassius* RFamide (C-RFa), from the brain of the Japanese crucian carp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 436-440.

Fujita I, Sorensen PW, Stacey NE and Hara TJ (1991). The olfactory system, not the terminal nerve, functions as the primary chemosensory pathway mediating responses to sex pheromones in male goldfish. *Brain Behav. Evol.* **38(6)**, 313-321.

Fuller GN and Burger PC (1990). Nervus terminalis (cranial nerve zero) in the adult human. *Clin. Neuropathol.* **9**, 279-283.

Gaikwad A, Biju KC, Saha SG, Subhedar N (2004). Neuropeptide Y in the olfactory system, forebrain and pituitary of the teleost, *Clarias batrachus*. *J. Chem. Neuroanat.* **27(1)**, 55-70.

Gaikwad A, Biju KC, Muthal PL, Saha S, Subhedar N (2005). Role of neuropeptide Y in the regulation of gonadotropin releasing hormone system in the forebrain of *Clarias batrachus* (Linn.): immunocytochemistry and high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometric analysis. *Neuroscience* **133(1)**, 267-79.

Gaudin A and Gascuel J (2005). 3D Atlas describing ontogenic evolution of the primary olfactory projections in the olfactory bulb of *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* **489**, 403-424.

Gaus G, Doble KE, Price DA, Greenberg MJ, Lee TD, Battelle BA (1993). The sequence of five neuropeptides isolated from *Limulus* using antisera to FMRFamide. *Biol. Bull.* **184**, 322-329.

Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F (1987). A study in developing visual system with a new method of staining neurons and their processes in fixed tissue. *Development* **101**, 697-713.

Greenberg MJ, Pierce DA, Lehman HK (1985). FMRFamide-like peptides of molluscs and vertebrates: distributin and evidence of function. In: *Neurosecretion and the Biology of Neuropeptides* 370-376.

Grimmelikhuijzen CJP, Dockay GJ, Schot LPC (1982). FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of Hydra. *Histochemistry* **73**, 499-508.

Grimmelikhuijzen CJP (1983). FMRFamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous system of coelenterates. *Histochemistry* **78**, 361-381.

Herrick CJ (1909). The nervus terminalis (nerve of Pinkus) in the frog. *J. Comp. Psychol.* **19**, 175-190.

Herrick CJ (1910). The morphology of the forebrain in Amphibia and Reptilia. *J. Comp. Neurol.* **20**, 413-547.

- Herrick CJ (1924). The nucleus olfactorius anterior of the opossum. *J. Comp. Neurol.* **37**, 373-396.
- Hofmann MH, Meyer DL (1989a). Central projections of the nervus terminalis in four species of amphibians. *Brain Behav. Evol.* **34(5)**, 301-307.
- Hofmann MH and Meyer DL (1989b). The nervus terminalis in larval and adult *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **489**, 167-169.
- Hofmann MH and Meyer DL (1991a). Subdivisions of the terminal nerve in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* **259**, 324-329.
- Hofmann MH, Meyer DL (1991b). Functional subdivisions of the olfactory system correlate with lectin-binding properties in *Xenopus*. *Brain Res.* **564(2)**, 344-7.
- Hofmann MH, Meyer DL (1992a). Peripheral origin of olfactory nerve fibers bypassing the olfactory bulb in *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **589(1)**, 161-163.
- Hofmann MH and Meyer DL (1992b). Peripheral origin of olfactory pathway: Primary olfactory fibers bypassing the olfactory bulb in the bony fishes? *Brain Behav. Evol.* **46**, 378-388.
- Hofmann MH, Meyer DL (1995). The extrabulbar olfactory pathway: primary olfactory fibers bypassing the olfactory bulb in bony fishes? *Brain Behav. Evol.* **46(6)**, 378-88.
- Hofmann MH, Bleckmann H (1999). Effect of temperature and calcium on transneuronal diffusion of DiI in fixed brain preparations. *J. Neurosci. Methods* **88(1)**, 27-31.
- Holmqvist BI, Ostholm T, Ekström P (1992). DiI tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in teleost, the Atlantic salmon. *J. Neurosci. Methods* **42**, 45-63.
- Honkanen T and Ekström P (1990). An immunocytochemical study of the olfactory projections in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, L. *J. Comp. Neurol.* **292(1)**, 65-72.
- Jacklet JW, Kose M, Goldberg M (1987). FMRFamide-like-immunoreactive efferent fibers and FMRFamide suppression of pacemaker neurons in eyes of *Bulla*. *J. Neurobiol.* **18**, 433-449.
- Jacobson L (1811). Description anatomique d'un organe observe dans les mammiferes. *Ann. Mus. Hist. Natl. (Paris)* **18**, 412-424.
- Jeffery WR (2005). Adaptive evolution of eye degeneration in the mexican blind cavefish. *J. Hered.* **96(3)**, 185-196.
- Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) - producing neurons. *J. Comp. Neurol.* **232**, 534-547.

- Johnston JB (1913). Nervus terminalis in reptiles and mammals. *J. Comp. Neurol.* **23**, 97-120.
- Josse J, Gerearts PM (1983). Endocrinology. In: *The mollusca, Vol. 4 Physiology, Part I*, Edited by A.S.M. Saleuddin and K.M. Wilburn, London: Accademic Press. 317-406.
- Kawakami T, Kusakabe T, Matsuda H, Hiruma H, Gono Y, Kurihara K, Takenaka T (1998). Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the salamander taste organs. *Histo. Histopathol.* **13**, 115-119.
- Key B, Giorgi PP (1986a). Selective binding of soybean agglutinin to the olfactory system of *Xenopus*. *Neuroscience* **18(2)**, 507-515.
- Key B, Giorgi PP (1986b). Soybean agglutinin binding to the olfactory systems of the rat and mouse. *Neurosci. Letters* **69(2)**, 131-136.
- Kobierski LA, Belz BS, Trimmer A, Kravitz A (1987). FMRFamide-like peptides of *Homarus americanus*: distribution, immunocytochemical mapping, and ultrastructural localization in terminal varicosities. *J. Comp. Neurol.* **266**, 1-15.
- Koza JM, Wirsig-Wiechmann CR (2001). A subpopulation of nervus terminalis neurons projects to the olfactory mucosa in *Xenopus laevis*. *J. Neurosci. Res.* **66(1)**, 8-15.
- Krishna NSR, Subhedar N, Schreibman MP (1992). FMRFa-like immuoreactive nervus terminalis innervation to the pituitary in the catfish, *Clarias batrachus*: demonstration by lesion and immunocytochemical techniques. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**, 111-117.
- Kozlowski GP, Chu L, Hostetter G, Kerdelhue B (1980). Cellular characteristics of immunolabeled luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons. *Peptides* **1**, 37-46.
- Kyle AL, Sorensen PW, Stacey NE and Dulka JG (1987). Medial olfactory tract pathways controlling sexual reflexes and behavior in Teleosts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **519**, 97-107.
- Kyle AL, Luo BG, Magnus TH, Stell WK (1995). Substance P-, F8Famide-, and A18Famide-like immunoreactivity in the nervus terminalis and retina of the goldfish *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res.* **280**, 605-615.
- Kusakabe T, Kawakami T, Takenaka T (1995). Peptidergic innervation in the amphibian carotid labyrinth. *Histol. Histopathol.* **10**, 185-202.
- Larsell O (1919). Studies on the nervus terminalis: turtle. *J. Comp. Neurol.* **30**, 423-443.
- Le Gall S, Feral C, Van Mimen J, Marchant CR (1988). Evidence for peptidergic innervation of the endocrine optic gland in *Sepia* by neurons showing FMRFamide-like immunoreactivity. *Brain Res.* **462**, 83-88.

Lehman KD, Pierce DA, Greenberg MJ (1984). The FMRFamide-like neuropeptide of *Aplysia* is FMRFamide. *Biol. Bull.* **167**, 460-466.

Locy WA (1905). On a newly recognized nerve connected with the forebrain of selachians. *Anat. Anz.* **26**, 33-123.

Lovejoy DA, Stell WK and Sherwood NM (1992). Partial characterization of four forms of immunoreactive gonadotropin releasing hormone in the brain and terminal nerve of the spiny dogfish (Elasmobranchii; *Squalus acanthias*). *Regul. Pept.* **37**, 38-48.

Mackay-Sim A and Rose JD (1986). Removal of the vomeronasal organ impairs lordosis in female hamsters: effect is reversed by luteinising hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* **42(6)**, 489-493.

Magliulo-Cepriano L, Schreiber MP, Blum V (1993). The distribution of immunoreactive FMRF-amide, neurotensin and galanin in the brain and pituitary gland of three species of *Xiphophorus* from birth to sexual maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92**, 269-280.

McKibben PS (1911). The nervus terminalis in urodele amphibians. *J. Comp. Neurol.* **21**, 261-310.

Meredith M and Howard G (1992). Intracerebroventricular LHRH relieves behavioral deficits due to vomeronasal organ removal. *Brain Res. Bull.* **1**, 75-79.

Meyer DL, von Bartheld C and Lindorfer HW (1987). Evidence for the existence of a terminal nerve in lamprey and in birds. In: L.S. Demski and M. Schwanzel-Fukuda (eds), The terminal nerve (nervus terminalis), *Ann NY Acad Sci*, New York, pp. 385-391.

Meyer DL and Rastogi RKR (1998). Olfaction and Reproduction. In: "Encyclopedia of reproduction" (ed. Knobil and Neill), Academic Press, New York.

Monti-Graziadei AG (1992). Cell migration from the olfactory neuroepithelium of neonatal and adult rodents. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* **70(1)**, 65-74.

Muller JF, Marc RE (1984). Three distinct morphological classes of receptors in fish olfactory organs. *J. Comp. Neurol.* **222**, 482-495.

Munz H, Claas B (1981). Centrifugal innervation of the retina in cichlid and poeciliid fish. A horseradish peroxidase study. *Neurosci. Lett.* **22**, 223-226.

Munz H, Stumpf WE and Jennes L (1981). LHRH system in the brain of platyfish. *Brain Res.* **221**, 1-13.

Muske LE and Moore FL (1988). The amphibian nervus terminalis: anatomy, chemistry and relationship with the hypothalamic LHRH system. *Brain Behav. Evol.* **32**, 141-150.

Muske LE (1993). Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav. Evol.* **42**, 215-230.



- Niewkoop PD, Faber J (1956). Normal table of *Xenopus laevis*. Elsevier, Amsterdam.
- Norgren RB, Lippert JrJ and Lehman MN (1992). Luteinizing hormone-releasing hormone in the pigeon terminal nerve and olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* **135**, 201-204.
- Northcutt RG (1972). Afferent projection of the telencephalon of bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Anat. Rec.* **172**, 374.
- Northcutt RG, Puzdrowski RL (1988). Projections of the olfactory bulb and nervus terminalis in the silver lamprey. *Brain Behav. Evol.* **32(2)**, 96-107.
- Northcutt RG, Muske LE (1991). Experimental embryological evidence of the placodal origin of GnRH and FMRFamide neurons of the terminal nerve and preoptic area in salamanders. *Soc. Neurosci. Abstr.* **17**, 321.
- Northcutt RG, Muske LE (1994). Multiple embryonic origin of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive neurons. *Dev. Brain Res.* **78**, 279-290.
- Oelshläger HA and Northcutt RG (1992). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis and brain of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *J. Comp. Neurol.* **315**, 344-363.
- Oelshläger HA, Helpert C, Northcutt RG (1998). Coexistence of FMRFAMIDE-like and LHRH-like immunoreactivity in the terminal nerve and forebrain of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *Brain Behav. Evol.* **52(3)**, 139-147.
- Ostholm T, Ekström P, Ebbesson SO (1990). Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the brain, retina and nervus terminalis of the sockeye salmon parr, *Oncorhynchus nerka*. *Cell Tissue Res.* **261(3)**, 403-418.
- Pinelli C, D'Aniello B, Fiorentino M, Bhat G, Saidapur SK and Rastogi RK (1997). Distribution of gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of *Ichthyophis beddomei* (Amphibia: Gymnophiona). *J. Comp. Neurol.* **384**, 283-292.
- Pinelli C, D'Aniello B, Sordino P, Meyer DL, Fiorentino M, Rastogi RK (2000). Comparative immunocytochemical study of FMRFamide neuronal system in the brain of *Danio rerio* and *Acipenser ruthenus* during development. *Dev. Brain Res.* **119**, 195-208
- Pinelli C, D'Aniello B, Polese G, Rastogi RK (2004). Extrabulbar olfactory system and nervus terminalis FMRFamide immunoreactive components in *Xenopus laevis* ontogenesis. *J. Chem. Neuroanat.* **28(1-2)**, 37-46.
- Pinkus VF (1894). Über einen noch nicht beschriebenen Hirnnerv des *Protopterus annectens*. *Anat. Anz.* **9**, 562-566.
- Potiquet M (1891). Le canal de Jacobson. *Rev. Laryngol (Paris)* **2**, 737-753.
- Price DA, Greenberg MJ (1977a). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* **197**, 670-671.

Price DA and Greenberg MJ (1977b). Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.* **7**, 261-281.

Price DA (1982). The FMRFamide like peptide of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **72**, 325-328.

Propper CR and Moore FL (1991). Effects of courtship on brain gonadotropin hormone-releasing hormone and plasma steroid concentrations in a female amphibian (*Taricha granulosa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **81(2)**, 304-312.

Riddle DR and Oakley B (1992). Immunocytochemical identification of primary olfactory afferents in rainbow trout. *J. Comp. Neurol.* **324**, 575-589.

Ridgway SH, Demski LS, Bullock TH and Schwanzel-Fukuda M (1987). The terminal nerve in odontocete cetaceans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **519**, 201-212.

Royce GJ and Northcutt RG (1969). Olfactory bulb projections in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) and the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Anat. Rec.* **163**, 254.

Rudebeck R (1945). Contribution to forebrain morphology in Dipnoi. *Acta Zool.* **26**, 9-156.

Ruysch F (1703). *Thesaurus Anatomicus Tertius*, 70, plate IV. Fig. 5, 48-49. Wolters. Amsterdam.

Santacana M, Heredia M, Valverde F (1992). Transient pattern of exuberant projections of olfactory axons during development in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **70(2)**, 213-222.

Sakharkar AJ, Singru PS, Sarkar K, Subhedar NK (2005). Neuropeptide Y in the forebrain of the adult male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*: distribution, effects of castration and testosterone replacement. *J. Comp. Neurol.* **489(2)**, 148-165.

Scalia F, Harpern M, Knapp H and Riss W (1968). The efferent connections of the olfactory bulb in the frog: A study of degenerating unmyelinated fibers. *J. Anat.* **103**, 245-262.

Scalia F and Ebesson SOE (1971). The central projections of the olfactory bulb in a teleost (*Gymnothorax funebris*). *Brain Behav. Evol.* **4**, 376-399.

Schmidt A, Naujoks-Manteuffel C and Rott G (1988). Olfactory and vomeronasal projections and the pathway of the nervus terminalis in ten species of salamanders. *Cell Tissue Res.* **251**, 45-50.

Schmidt A and Roth G (1990). Central olfactory and vomeronasal pathways in salamanders. *J. Hirnforsch.* **31**, 543-553.

Schmidt A and Wake MH (1990). Olfactory and vomeronasal system of caecilians (Amphibian: Gymnophiona). *J. Morphol.* **205**, 255-268.

- Schnitzlein HN (1964). Correlation of habit and structure in the fish brain. *Am. Zool.* **136**, 21-32.
- Schnitzlein HN, Crosby EC (1967). The telencephalon of the lungfish, Protopterus. *J. Hirnforsch.* **9(2)**, 105-149.
- Schober A, Meyer DL, Von Bartheld CS (1994). Central projections of the nervus terminalis and the nervus praeopticus in the lungfish brain revealed by nitric oxide synthase. *J. Comp. Neurol.* **349(1)**, 1-19.
- Schreibman MP, Margolis-Nunno H (1987). Reproductive biology of the terminal nerve (nucleus olfactoretinalis) and other LHRH pathways in teleost fishes. *Ann. N Y Acad. Sci.* **519**, 60-68.
- Schwanzel-Fukuda M and Silverman AJ (1980). The nervus terminalis of the guinea pig: a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal system. *J. Comp. Neurol.* **191(2)**, 213-225.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* **338**, 161-164.
- Servenius B, Vernachio J, Price J, Andersson LC, Peterson PA (1994). Metastasizing neuroblastoma in mice transgenic for simian virus 40 large T (SV40T) under the olfactory marker protein gene promoter. *Cancer Res.* **54**, 5198-5205.
- Smith MT, Moore FL, Mason RT (1997). Neuroanatomical distribution of chicken-I gonadotropin-releasing hormone (cGnRH-I) in the brain of the male red-sided garter snake. *Brain Behav. Evol.* **49(3)**, 137-148.
- Springer AD, Mednick AS (1983). Dorsotemporal retinal ganglion cell axons of goldfish are located in the dorsal rather than ventral optic tract. *Brain Res.* **273(1)**, 152-155.
- Stacey NE and Kyle AL (1983). Effects of olfactory tracts lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol. Behav.* **30**, 621-628.
- Stell WK, Walker SE, Chohan KS and Ball AK (1984). The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(3)**, 940-944.
- Stell WK, Chohan KS and Kyle AL (1985). Substance P-immunoreactivity coexists with LHRH- and FMRFamide-immunoreactivity in the nervus terminalis efferents to goldfish retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (Suppl)* **26**, 277.
- Stell WK, Walker SE and Ball AK (1987). Functional-anatomical studies on the terminal nerve projection to the retina of bony fishes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **519**, 80-96.
- Story H (1964). The olfactory bulbar formation and related nuclei of the paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. Comp. Neurol.* **123**, 285-297.

Szabo T, Blähser S, Denizot JP and Veron-Ravaille M (1987). High substance P-like immunoreactivity (SPLI) in the olfactory and electrosensory cells of gymnotid fish. *Neurosci. Lett.* **81(3)**, 245-249.

Szabo T, Blähser S, Denizot JP and Ravaille-Veron M (1991a). The olfactoretinalis system = terminal nerve? *Neuroreport* **2(2)**, 73-76.

Szabo T, Blähser S, Denizot JP and Ravaille-Veron M (1991b). Extra-bulbar primary olfactory projection in teleost fishes. *C.R. Acad.Sci. III* **312(11)**, 555-560.

Tetè S, Falco A et al. (2000). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) e Ki-67 come marker di proliferazione cellulare. Revisione della letteratura. *Doctor OS.* **10**, 1137-1142.

Uchiyama H, Reh TA, Stell WK (1988). Immunocytochemical and morphological evidence for a retinopetal projection in anuran amphibians. *J. Comp. Neurol.* **274(1)**, 48-59.

Uchiyama H (1990). Immunohistochemical subpopulations of retinopetal neurons in the nucleus olfactoretinalis in a teleost, the whitespotted greenling (*Hexagrammos stelleri*). *J. Comp. Neurol.* **293(1)**, 54-62.

Vallarino M, Salsotto-Cattaneo M, Vaudry H (1993). Immunohistochemical localization of FMRFamide-like peptides in the brain of the frog *Rana esculenta*. In: F. Facchinetti, J.W. Henderson, R. Pierantoni and A. Polzonetti-Magni (Eds), *Cellular Communication in Reproduction, J. Endocrinol., Bristol*, 45-48.

Vallarino M, Tranchand-Bunel D, Thoumas JL, Masini MA, Conlon JM, Fournier A, Pelletier G, Vaudry H (1995). Neuropeptide tyrosine in the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J. Comp. Neurol.* **356(4)**, 537-551.

von Bartheld CS and Meyer DL (1986). Central projections of the nervus terminalis in the bichir, *Polypterus palmas*. *Cell Tissue Res.* **244**, 181-186.

von Bartheld CS, Lindörfer HW and Meyer DL (1987). The nervus terminalis also exists in cyclostomes and birds. *Cell Tissue Res.* **250(2)**, 431-434.

von Bartheld CS and Meyer DL (1988). Central projections of the nervus terminalis in lampreys, lungfishes, and bichirs. *Brain Behav. Evol.* **32(3)**, 151-159.

von Bartheld CS, Claas B, Munz H and Meyer DL (1988). Primary olfactory projections and the nervus terminalis in the African lungfish: Implications for the phylogeny of cranial nerves. *Am. J. Anat.* **182**, 325-334.

von Bartheld CS, Collins SP and Meyer DL (1990). Dorsomedial telencephalon of lungfishes: a pallial or subpallial structure? Criteria based on histology, connectivity and histochemistry. *J. Comp. Neurol.* **294(1)**, 14-29.

- von Bartheld CS (2004). The terminal nerve and its relation with extrabulbar “olfactory” projection: lessons from lampreys and lungfishes. *Micr. Res. Tec.* **65**, 13-24.
- Waga S, Bauer G and Stillman B (1994). Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.* **269**, 10923 – 10934.
- Watson WH, Groome JR (1984). Presence and distribution of immunoreactive and bioactive FMRF-amide-like peptides in the nervous system of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Peptides* **5**, 585-592.
- Weiss S, Goldberg JI, Cohan KS, Stell WK, Drummond GI, Lakowiak K (1984). Evidence for FMRFamide as a neurotransmitter in the gill of *Aplisia californica*. *J. Neurosci.* **4**, 1994-2000.
- Weiss G (1986). Die Struktur des Geruchsorgans und des Telencephalons beim südafrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis* (Daudin) und ihre Veränderung während der Metamorphose. PhD Dissertation, Universität Regensburg, Germany.
- Wirsig CR and Getchel TV (1986). Amphibia terminal nerve: distribution revealed by LHRH and AChE marker. *Brain Res.* **385**, 1-21.
- Wirsig CR and Leonard CM (1986). Acetylcholinesterase and luteinizing hormone-releasing hormone distinguish separate populations of terminal nerve neurons. *Neuroscience* **19(3)**, 719-740.
- Wirsig CR (1987). Effects of lesions of the terminal nerve on mating behavior in the male hamster. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **519**, 241-251.
- Wirsig-Wiechmann CR, Basinger SF (1988). FMRFamide-immunoreactive retinopetal fibers in the frog, *Rana pipiens*: demonstration by lesion and immunocytochemical techniques. *Brain Res.* **449(1-2)**, 116-134.
- Wirsig-Wiechmann CR (1990). The nervus terminalis in the chick: a FMRFamide immunoreactive and AChE-positive nerve. *Brain Res.* **523**, 175-179.
- Wirsig-Wiechmann CR (1993). Peripheral projection of nervus terminalis LHRH-containing neurons in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Cell Tissue Res.* **273**, 31-40.
- Wirsig-Wiechmann CR (2001). Function of gonadotropin-releasing hormone in olfaction. *Keio J. Med.* **50(2)**, 81-85.
- Wirsig-Wiechmann CR, Oka Y (2002). The terminal nerve ganglion cells project to the olfactory mucosa in the dwarf gourami. *Neurosci. Res.* **44(3)**, 337-341.
- Whitlock KE, Wolf CD, Boyce ML (2003). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) cells arise from cranial neural crest and adenohipophyseal regions of the neural plate in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Biol.* **257**, 140-152.

Witkin JW (1987a). Immunocytochemical demonstration of luteinizing hormone-releasing hormone in optic nerve and nasal region of fetal resus macaque. *Neurosci. Lett.* **79**, 73-77.

Witkin JW (1987b). Nervus terminalis, olfactory nerve, and optic nerve representation of luteinizing hormone-releasing hormone in primates. In: LS Demski and Schwanzel-Fukuda M (eds): The terminal nerve (Nervus Terminalis): structure, function, and evolution. New York: New York Academy of Science, pp. 174-183.

Witschi E (1956). Development of vertebrates. WB Saunders Co. Philadelphia: PA.

Wright DE and Demski LS (1996). Organization of GnRH and FMRF-amide systems in two primitive bony fishes (order polypteriformes). *Brain Behav. Evol.* **47(5)**, 267-278.

Yang HYT, Fratta W, Majane EA, Costa E (1985). Isolation, sequencing, synthesis and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7757-7761.

Zhang W, Delay RJ (2007). Gonadotropin-releasing hormone modulates voltage-activated sodium current and odor responses in *Necturus maculosus* olfactory sensory neurons. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1656-1667.