



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Veterinarie

INDIRIZZO: Scienze Veterinarie Biomediche Veterinarie e Comparate

CICLO: XXIV

**CONCENTRAZIONE PLASMATICA E PRODUZIONE EXTRAPINEALE DI
MELATONINA NEL TURSIOPE (*Tursiops truncatus*)**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Supervisore: Ch.mo Prof. Bruno Cozzi

Dottorando : Mattia Panin

CONCENTRAZIONE PLASMATICA E PRODUZIONE EXTRAPINEALE DI MELATONINA NEL TURSIOPE (*Tursiops truncatus*)

SOMMARIO

La melatonina è un ormone ubiquitario, prodotto sia in vertebrati che in invertebrati, compresi batteri e protozoi, oltre che in piante superiori. Il suo ruolo principale nei vertebrati è quello di regolatore dei ritmi biologici, grazie a un pattern di secrezione che riflette l'alternanza del ciclo luce-buio durante il giorno, determinando ritmi circadiani. Nel corso dell'anno questo ritmo cambia continuamente in risposta alla variazione della lunghezza del giorno, determinando complessivamente un ritmo circannuale o stagionale. La melatonina circolante nei mammiferi è prodotta per la maggior parte dalla ghiandola pineale (o epifisi), struttura neuroendocrina posta sul tetto del terzo ventricolo e facente parte del diencefalo. Questa ghiandola nei cetacei è generalmente considerata assente, anche se i riscontri in letteratura sono contraddittori, dato che in alcune specie ne viene documentata la presenza. In altre specie ancora, alcuni autori la osservano in alcuni esemplari, mentre altri studi su individui conspecifici non la individuano. Quest'ultimo caso riguarda anche il comune tursiope (*Tursiops truncatus*), che è stato l'oggetto di questo studio. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare alcuni aspetti della produzione di melatonina, non ancora studiata in questa specie, da diversi punti di vista, macroscopico, fisiologico e biomolecolare. Per prima cosa è stata valutata la presenza della pineale in una serie di encefali di tursiope, dei quali nessuno sfortunatamente presentava la ghiandola. Per verificare se la melatonina fosse comunque prodotta in questa specie è stata organizzata la raccolta periodica di campioni di sangue da esemplari tenuti in cattività, nell'arco di sette mesi, in due gruppi in località distinte. La concentrazione di melatonina è stata determinata attraverso un radioimmunosaggio (RIA), che ha rivelato per la prima volta l'effettiva presenza dell'ormone nel sangue, con alcune fluttuazioni stagionali e variazioni giornaliere. La significatività di tali variazioni è stata purtroppo limitata dall'impossibilità di rispettare a pieno il disegno di campionamento, ottenendo meno campioni del previsto.

Poiché la pineale è apparentemente assente ma il suo principale secreto è presente nel sangue di tursiope, è stata valutata la sua produzione da parte di siti alternativi. In letteratura è ampiamente documentata la produzione extrapineale di melatonina in alcuni tessuti, anche se il loro effettivo contributo ai livelli circolanti dell'ormone non è ancora del tutto chiaro. Nei mammiferi i tre principali siti extrapineali sono la retina, la ghiandola di Harder e l'intestino. È stata quindi indagata la potenziale secrezione di melatonina da parte di questi tessuti nel tursiope, tramite

immunoistochimica contro l'enzima idrossiindol-O-metil-trasferasi (HIOMT), l'ultimo della via biosintetica dell'ormone. Come controllo positivo è stato utilizzata la pineale di bovino. Tutti e tre i tessuti sono risultati immunoreattivi, anche se con qualche differenza rispetto alla maggior parte dei mammiferi. Per verificare in modo alternativo la presenza dell'enzima nei tessuti immunopositivi, è stata valutata tramite PCR l'espressione del suo mRNA. Non essendo disponibili sequenze dell'enzima di alcun cetaceo sono state eseguite alcune prove con primer disegnati sulla sequenza di bovino (filogeneticamente vicino al tursiope), oltre che su quella ipotetica del gene di tursiope presente nella banca dati ENSEMBL, per un totale di cinque diverse coppie di primer. Nessuna di esse ha purtroppo dato esito positivo, nemmeno nei tre tessuti immunoreattivi, il che suggerisce la necessità di caratterizzare il gene di HIOMT in studi futuri per risalire alla corretta sequenza e disegnare primer specifici.

Un ulteriore aspetto della produzione di melatonina nel tursiope, indagato in questo studio, è stato quello dell'utilizzo di un modello in vivo alternativo a quello dell'animale in toto, ovvero di colture cellulari. Poiché in letteratura è stata dimostrata la produzione di melatonina da parte della cute di alcuni mammiferi, ed essendo la pelle il tessuto più facilmente recuperabile durante la necropsia di un cetaceo, sono state ricavate delle colture cellulari da campioni cutanei di tursiope. Le coltura primarie inizialmente ottenute sono state stabilizzate tramite processo di immortalizzazione, per poi caratterizzarle attraverso la determinazione del cariotipo e l'identificazione immunoistochimica di specifici marker citoscheletrici. L'espressione di HIOMT da parte delle cellule di cute è stata valutata sia attraverso immunocitochimica, sia attraverso PCR, entrambe risultate negative, suggerendo che la cute nel tursiope non sia un sito di produzione di melatonina.

CIRCULATING AND EXTRAPINEAL MELATONIN IN THE BOTTLENOSE DOLPHIN (*Tursiops truncatus*)

ABSTRACT

Melatonin is a ubiquitous hormone, produced both by vertebrates and invertebrates, including also bacteria and protozoans, besides superior plants. Its main role is to regulate biological rhythms, thanks to a secretion pattern reflecting the daily light-dark cycle, determining so-called circadian rhythms. Over the year, this daily rhythm changes slightly but constantly with changing daylength, generating a circannual or seasonal rhythm. Circulating melatonin in mammals is synthesized by the pineal gland (or *epiphysis cerebri*), a neuroendocrine structure situated on the roof of the third ventricle, belonging to the diencephalon. This gland in cetaceans is apparently absent, though there are controversial reports in the literature, some reporting its presence. In some species yet, some authors found it in some individuals, whereas other studies on conspecifics did not detect it. This is the case also for the common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), the subject of this study. The aim of the present research is to assess some aspects of melatonin production, which has never been investigated in this species, from different point of views, macroscopic, physiological and biomolecular. First, the presence of a pineal gland was evaluated in a series of bottlenose dolphin brains, all of which unfortunately lacked one. To verify if melatonin was produced all the same, blood samples were collected from two groups of captive bottlenose dolphins in two different locations, over a 7 month period. Hormone concentration was determined by a validated radioimmunoassay (RIA), revealing for the first time the actual presence of melatonin in the blood, with little seasonal and daily fluctuations. The significance of these variations was somewhat limited due to the impossibility to cope with the scheduled sampling design, obtaining a much lower sample size than expected.

Since the pineal is apparently absent in bottlenose dolphins, but its main product is actually found in the blood of this species, melatonin synthesis by alternative sources was investigated. In the literature, extrapineal melatonin production is well documented in some tissues, though their relative contribution to circulating levels has still to be elucidated. In mammals the three main extrapineal sites are the retina, the Harderian gland and the gastro-intestinal tract. The presence of the enzyme hydroxyindole-O-methyl-transferase (HIOMT), the last one of melatonin biosynthetic pathway, was investigated by immunohistochemistry. Bovine pineal glands were used as a positive control. All the three tissues were positively labeled, though with some differences with respect to most mammals. To confirm HIOMT presence in immunoreactive tissues, the presence of its mRNA

was evaluated through PCR. Since there are currently no cetacean sequences of the enzyme, five different primer couples were designed, one on the known bovine sequence, the others on the bottlenose dolphin predicted sequence available on the ENSEMBL genome database. None of them unfortunately gave positive results, even in the immunoreactive tissues, prompting the need in future studies to characterize the HIOMT gene of the bottlenose dolphin, so to obtain the correct sequence and to design specific primers.

A further aspect concerning melatonin production in the bottlenose dolphin was the possible use of an *in vivo* model alternative to that of the whole animal, i.e. cell cultures. Since in the literature melatonin production was demonstrated in the skin of some mammalian species, and since skin samples are the easiest to obtain during a cetacean necropsy, primary cell cultures were established from bottlenose dolphin cutaneous specimens. After stabilizing them by an immortalization process, the cultures were characterized by karyotyping and by labeling specific cytoskeletal markers. The expression of HIOMT by skin cells was evaluated by immunohistochemistry and by PCR, both with negative results, suggesting that skin in the bottlenose dolphin might not be able to synthesize melatonin.

INDICE

1. INTRODUZIONE	p.1
1.1 Ghiandola pineale	p.1
1.1.2 Storia evolutiva	p. 1
1.1.3 Anatomia e vascolarizzazione	p. 3
1.1.4 Innervazione	p. 5
1.2 Melatonina	p. 7
1.2.1 Sintesi e metabolismo	p. 7
1.2.2 Recettori	p. 11
1.3 Effetti principali della melatonina	p. 12
1.3.1 Ritmi biologici	p. 12
1.3.2 Proprietà paracrine e autocrine	p. 14
1.3.3 Altri effetti	p. 15
1.4 Il tursiope (<i>Tursiops truncatus</i>)	p. 16
1.4.1 Storia evolutiva dei Cetacei	p. 16
1.4.2 Caratteri morfologici principali dei Cetacei	p. 19
1.4.3 Caratteri morfologici, life history, distribuzione ed ecologia del tursiope	p. 22
1.4.4 Ghiandola pineale nei Cetacei e in altri mammiferi marini	p. 24
1.4.5 Retina	p. 27
1.4.6 Intestino	p. 30
1.4.7 Ghiandola di Harder	p. 30
2. SCOPO DELLA TESI	p. 32
3. MATERIALI E METODI	p. 33
3.1 Campioni di encefalo di tursiope	p. 33
3.2 Campioni di ghiandola pineale bovina	p. 33
3.3 Quantificazione melatonina	p. 33
3.3.1 Radioimmunosaggio (RIA)	p. 33
3.3.2 Gruppi sperimentali e disegno di campionamento	p. 34
3.3.3 Etica della sperimentazione	p. 35
3.3.4 Statistica	p. 36
3.4 Immunoistochimica	p. 36
3.4.1 Campioni di tessuto e istochimica	p. 36
3.4.2 Marcaggio anticorpale	p. 37
3.5 Western Blot	p. 37
3.5.1 Preparazione dei campioni	p. 37
3.5.2 Saggio Bradford	p. 37

3.5.3 Separazione elettroforetica	p. 38
3.5.4 Elettrotrasferimento	p. 38
3.5.5 Marcaggio anticorpale	p. 39
3.5.6 Marcaggio anticorpale	p. 39
3.6 Biologia molecolare	p. 39
3.6.1 Disegno dei primer per HIOMT, SV40 e β -actina mRNA	p. 39
3.6.2 Estrazione e quantificazione RNA	p. 44
3.6.3 Retrotrascrizione a cDNA	p. 45
3.6.4 PCR	p. 46
3.6.5 Estrazione e purificazione di DNA genomico	p. 46
3.6.6 Purificazione e sequenziamento REG1 e REG2	p. 47
3.7 Colture cellulari	p. 47
3.7.1 Campioni di cute di <i>T. truncatus</i>	p. 47
3.7.2 Allestimento coltura primaria	p. 48
3.7.3 Coltura batterica e isolamento su vasta scala del plasmide pSV3-neo	p. 48
3.7.4 Immortalizzazione della coltura primaria	p. 49
3.7.5 Propagazione della coltura secondaria	p. 50
3.7.6 Caratterizzazione della linea stabilizzata	p. 50
3.7.6.1 Cariotipizzazione	p. 50
3.7.6.2 G-banding	p. 51
3.7.6.3 Immunocitochimica	p. 51
4. RISULTATI	p. 53
4.1. Campioni di encefalo di tursiope	p. 53
4.2 Quantificazione melatonina	p. 54
4.2.1 Parallelismo	p. 57
4.2.2 Recupero	p. 58
4.3 Immunoistochimica	p. 58
4.3.1 Retina	p. 59
4.3.2 Ghiandola di Harder	p. 60
4.3.3 Intestino	p. 60
4.3.4 Altri tessuti	p. 61
4.4 Western blot	p. 62
4.5 Estrazione RNA tessuti ID 196	p. 63
4.6 PCR per HIOMT	p. 64
4.7 Colture cellulari	p. 68
4.7.1 Cariotipo e G-banding	p. 69
4.7.2 Immunocitochimica	p. 70

5. DISCUSSIONE	p. 71
6. BIBLIOGRAFIA	p. 89

1. INTRODUZIONE

1.1 Ghiandola pineale

1.1.2 Storia evolutiva

L'esistenza della ghiandola pineale è nota fin dall'antichità, ad opera del greco Erofilo (325–280 a.C.). La funzione attribuita era quella di una sorta di valvola che regolava il flusso dello *spiritus animalis*, la forza vitale che si pensava riempisse i ventricoli. Galeno (130–200 d.C.) cita Erofilo ma le attribuisce funzione di supporto ai tessuti in spazi privi di vasi sanguigni (Arendt 1995). La più interessante osservazione storica della pineale avviene nel 1622 ad opera di Cartesio, che pur considerandola la sede dell'anima analogamente agli antichi, riteneva che la sua funzione fosse influenzata dalla luce che colpiva la retina (Arendt 1995). Il primo a riconoscere una somiglianza fra l'organo pineale o parietale di alcuni vertebrati inferiori e la struttura degli occhi laterali fu Ahlborn (1883). Questa osservazione fu tra le più importanti alla base dell'interesse della comunità scientifica per la storia evolutiva della pineale, e ha portato ad affermare che gli organi fotosensibili dei vertebrati inferiori si siano trasformati nel corso dell'evoluzione nella ghiandola pineale non fotosensibile dei mammiferi (Studnicka 1905).

La ghiandola pineale si origina da un'evaginazione del tetto del terzo ventricolo, di cui rimane nell'adulto una piccola rientranza detta recesso pineale (Arendt 1995). Fra i mammiferi può avere forme e posizioni diverse, ma in genere è leggermente ovale. Nell'uomo ha le dimensioni di un pisello e forma conica che ricorda una pigna, da cui deriva il nome latino *pinealis*. La ghiandola nei mammiferi è un organo secretorio, mentre in pesci e rettili ha funzione mista fotoricettiva e secretoria. Durante lo sviluppo in alcuni pesci, anfibi e rettili lacertiliani la pineale forma due componenti, l'organo parietale (detto anche frontale o parapineale) extracranico e l'organo pineale intracranico. In alcuni vertebrati inferiori l'organo parietale giace direttamente sotto lo strato cutaneo della superficie del cranio, come nella rana o nel lepidosauro (*Sphenodon* sp.), ed è chiamato anche “terzo occhio” (Vollrath 1981), in quanto può presentare addirittura una cornea e una coppa pigmentata come gli occhi laterali (Eakin e Westfall 1960). Nei vertebrati inferiori questo occhio pineale, come ad esempio nella rana, è connesso all'encefalo da un nervo e un tratto pineale (Oksche and Vaupel–von Harnack 1965). In alcuni mammiferi, come coniglio, pecora e uomo, è stata dimostrata la presenza, nelle prime fasi dell'ontogenesi, di un “nervo pineale” che connette la parte caudale della ghiandola con la commissura posteriore, e che scompare durante lo sviluppo embrionale, a testimonianza della comune origine ancestrale con

l'organo parietale. Le componenti principali dell'occhio pineale sono fotorecettori, che in alcuni casi possono avere capacità secretoria. Questa doppia funzione, evolutivamente antica, è riflessa nelle caratteristiche strutturali e funzionali dei pinealociti di mammifero. La loro funzione primaria in tutte le specie studiate è quella di fototrasduzione, cioè di conversione dello stimolo luminoso in stimolo nervoso, che si traduce in diversi effetti fisiologici. La secrezione di melatonina, il principale secreto della ghiandola pineale, è il principale strumento attraverso cui si manifestano questi effetti. Negli uccelli e negli altri vertebrati inferiori il ritmo di secrezione dell'ormone è generato negli stessi pinealociti, mentre nei mammiferi è regolato da un orologio biologico situato nel nucleo suprachiasmatico dell'ipotalamo (Klein et al. 1991).

La comune origine ancestrale fra pinealociti di mammifero e fotorecettori della retina e degli organi parietali è testimoniata dal mantenimento di alcune caratteristiche ultrastrutturali tipiche dei fotorecettori nei pinealociti, come la presenza di un segmento esterno e di sinapsi a nastro. Il segmento esterno dei fotorecettori contiene i dischi membranosi ricchi di opsina, mentre nei pinealociti di mammifero i segmenti esterni sono poco sviluppati e privi di dischi. È presente un corpo basale, formato da microtubuli con organizzazione "9+0" uguale a quella del residuo del ciglio sensoriale, ovvero nove coppie di microtubuli disposte attorno ad uno spazio centrale (mentre le ciglia mobili hanno struttura "9+2", con coppia centrale di microtubuli) (Ekström e Meissl 2003). Le sinapsi a nastro sono tipi specializzati di sinapsi sensoriali che richiedono una particolare efficienza e velocità di trasmissione nervosa. Si trova infatti nei fotorecettori e nei neuroni bipolari della retina, ma anche nelle cellule capellute della coclea (Schmitz et al. 2000). Il "nastro" è un organello lamellare presinaptico, in grado di accumulare un numero molto elevato di vescicole sinaptiche (fino a ~600) che tiene ancorate, e che rilascia in dosi massicce, fino a 500 vescicole/s (mentre una classica sinapsi ad esempio dell'ippocampo arriva a 20 vescicole/s) (Stevens e Tsujimoto 1995). Sia pinealociti che retina sono inoltre in grado di sintetizzare melatonina, ed i primi esprimono numerosi antigeni retinici, come opsina (Huang et al. 1992), recoverina (Korf et al. 1992), antigene-S retinico (SAG) (Korf et al. 1986, Perentes et al. 1986) e rodopsina chinasi, coinvolti nella cascata di reazioni della fototrasduzione. Manca invece il gruppo prostetico della rodopsina, il retinale, un cromoforo senza il quale non può avvenire la fototrasduzione (Kramm et al. 1993).

Ma qual è il significato evolutivo di un organo fotosensibile "accessorio" posto al centro del capo, dato che già gli occhi laterali sono predisposti a ricevere gli stimoli luminosi ambientali? Mentre gli occhi sono deputati alla formazione di immagini, l'organo pineale certamente non ne è in grado, ed utilizza l'informazione derivante dall'alternarsi di luce e buio per regolare i propri ritmi biologici, che devono essere sincronizzati con le variazioni delle condizioni ambientali. Gli

organismi dotati di orologio interno devono quindi essere in grado di prevedere i cambiamenti annuali e giornalieri delle condizioni ambientali, in modo che il comportamento giusto avvenga al momento giusto (Falcòn et al. 2009). Fra i vari fattori ambientali, es. luce, temperatura, disponibilità di cibo, precipitazioni, il fotoperiodo varia in modo costante ogni anno ed è quindi il segnale più prevedibile ed affidabile per interpretare il passare del tempo. Nel corso dell'evoluzione si assiste ad una progressiva e radicale trasformazione morfologica e ad un'internalizzazione delle strutture fotosensibili superficiali dell'organo pineale, non essendo più necessaria la ricezione diretta della luce. Nei mammiferi lo stimolo luminoso viene comunicato alla ghiandola pineale indirettamente attraverso una complessa rete nervosa, che trae origine da una specifica popolazione di neuroni gangliari della retina. Questi proiettano i loro assoni in un tratto retino-ipotalamico (RHT), distinto dal nervo ottico, che raggiunge il nucleo suprachiasmatico ipotalamico, in cui ha sede l'orologio interno che regola anche la secrezione di melatonina (Moore e Lenn 1972).

1.1.3 Anatomia e vascolarizzazione

Come anticipato, la ghiandola pineale dei mammiferi si origina da un'evaginazione del tetto del terzo ventricolo, e nell'adulto è posta al confine fra mesencefalo e diencefalo. Dal punto di vista neuroanatomico, viene considerata come parte dell'epitalamo e quindi del diencefalo. Nella maggior parte dei mammiferi, la ghiandola ha forma piramidale ed è posizionata direttamente sulla parte dorsale del tronco cerebrale, rostralmente ai collicoli superiori. Tuttavia, molte specie, appartenenti anche alla stessa famiglia o allo stesso ordine, mostrano una discreta varietà di forme e dimensioni. Vollrath (1981) ha proposto una classificazione dei principali tipi di pineale, in base alla forma della ghiandola e dei suoi rapporti con il terzo ventricolo: nel tipo A la pineale è di forma globosa e giace a contatto col ventricolo, nel tipo AB l'organo ha forma più allungata, nel tipo ABC la maggior parte della ghiandola giace superficialmente molto vicino al cervelletto e nel tipo C tutto il tessuto pineale è superficiale. Quando una parte è meno sviluppata delle altre viene indicata con la rispettiva lettera greca. Ad esempio, nell'uomo è di tipo A, nel ratto è considerata di tipo C e nel criceto di tipo α C. In tutte le specie si può comunque riconoscere un peduncolo pineale, che collega la ghiandola all'encefalo, in particolare alla commissura abenulare (anteriormente) e alla commissura posteriore (caudalmente). Il parenchima della ghiandola pineale dei mammiferi è formato da cordoni di cellule separate da capillari con spazi perivascolari piuttosto ampi. In alcune specie di grandi dimensioni, compreso l'uomo, il parenchima è suddiviso in lobuli separati da setti di connettivo lasso derivanti dalla piamadre, ma

in altre specie si osservano configurazioni a rosetta, a follicolo, con o senza setti intermedi e possibile presenza di un lume (Arendt 1995).

In tutti i mammiferi studiati sono stati descritti 5 tipi principali di cellule: i pinealociti secernenti melatonina, le cellule interstiziali, i fagociti perivascolari, neuroni e cellule neurone-simili peptidergiche (Møller e Baeres 2002). Il pinealocita ha un corpo cellulare del diametro di 7–12 μm da cui si dipartono 3–5 processi citoplasmatici, visibili facilmente con impregnazione argentica. Nel ratto costituiscono circa l'80% della ghiandola (Arendt 1995). Ognuno termina con un ingrossamento a forma di clava, che al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) si rivela pieno di granuli elettrondensi. I pinealociti possono contenere più di un nucleo, il reticolo endoplasmatico è atipico, con caratteristiche intermedie fra liscio e rugoso, ed i centrioli possono creare piccoli fasci microtubulari, in alcuni casi con formazione di un vero e proprio ciglio.

Le cellule interstiziali si presentano molto più piccole dei pinealociti, con nucleo di forma triangolare e molto scuro, sia al TEM che in microscopia ottica. Il corpo cellulare ha forma stellata con molti sottili processi citoplasmatici. Molte di queste cellule, ma non tutte, si dimostrano immunoreattive per la proteina fibrillare acida della glia (GFAP), tipicamente espressa dagli astrociti del sistema nervoso centrale (SNC) (Møller et al. 1978). Le cellule fagocitarie sono state descritte solo recentemente. Si distribuiscono soprattutto negli spazi perivascolari, ed hanno probabilmente un ruolo importante nella risposta immunitaria, in quanto è stata dimostrata tramite immunisto chimica la presenza del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) (Pedersen et al. 1993), un complesso proteico espresso in un ristretto numero di tipi cellulari, coinvolto nel riconoscimento e nella presentazione degli antigeni. La presenza di neuroni intrapineali è stata documentata in alcuni mammiferi come il furetto, il macaco, il coniglio e l'uomo (Matsushima et al. 1994). In alcune specie questi neuroni formerebbero addirittura veri e propri gangli, ad esempio nel furetto, che ricevono innervazione direttamente da neuroni nel nucleo abenulare dell'epitalamo (David e Herbert 1973). Le cellule neurone-simili peptidergiche sono state osservate in roditori (Coto-Montes et al. 1994) ma anche nell'uomo (Møller e Baeres 2002). Queste cellule sono state dimostrate immunoreattive per encefaline, vasopressina (Badiu et al. 1999) e ossitocina (Badiu et al. 2001), e apparentemente mancano di input sinaptici (Coto-Montes et al. 1994). Questo suggerisce che possano avere un ruolo di regolazione paracrina dei pinealociti, ma la loro effettiva importanza rimane da dimostrare (Møller 1997).

L'apporto vascolare della pineale è particolarmente ricco, ed è stato calcolato che il flusso di sangue che la attraversa, (4 ml/min/g) è inferiore solo a quello renale (pari a ca. 5 ml/min/g) (Brezis e Rosen 1995). Sottili capillari che si ramificano delle arterie corioidee posteriori avvolgono la capsula connettivale della ghiandola prima di penetrare nel parenchima. Il drenaggio

venoso della ghiandola viene convogliato nella grande vena cerebrale (*vena magna cerebri*), che le giace dorsalmente. Nella maggior parte dei mammiferi, ad esempio criceto dorato, pecora e la presenza di una barriera emato–encefalica (EEB) è indicata dalla presenza di un endotelio capillare continuo, al contrario di topo, ratto, criceto siberiano e uomo, che mostrano molte fenestrazioni (Vollrath 1981). Tuttavia, anche nelle pineali con evidente EEB l'endotelio capillare viene attraversato da traccianti sia di basso peso (es. fuscina) che di alto peso molecolare come la perossidasi di rafano (HRP) (Welsh e Beitz 1981).

1.1.4 Innervazione

Nei vertebrati inferiori vi sono sia fibre afferenti che efferenti dalla ghiandola pineale, mentre nei mammiferi durante l'evoluzione l'innervazione efferente è stata persa. Dopo che il nucleo suprachiasmatico (SCN) ipotalamico è stato riconosciuto come sede del pacemaker circadiano che regola il ritmo della melatonina (Klein et al. 1991), numerosi studi hanno tentato di mappare le connessioni nervose tra SCN e ghiandola pineale.

Il recente sviluppo di sofisticate tecniche che rendono in grado di seguire il percorso delle vie nervose sia in senso retrogrado che anterogrado *in vivo* con l'uso di particolari traccianti, ha permesso di identificare una connessione fra il nucleo suprachiasmatico e quello paraventricolare (PVN), entrambi nell'ipotalamo (Kalsbeek et al. 2000, Munch et al. 2002). Dal PVN partono proiezioni al nucleo intermedio–laterale del midollo spinale toracico (IML), da qui al ganglio cervicale superiore (SCG) e da qui alla ghiandola pineale, la quale riceve proiezioni direttamente anche dal PVN (Larsen et al. 1998, Buijs et al. 1999). L'innervazione da parte del SCG, in quanto di tipo simpatico, è principalmente noradrenergica, ma molte fibre contengono anche neuropeptide Y (NPY) (Zhang et al. 1991, Cozzi et al. 1992). Curiosamente, dopo ganglionectomia dell'SCG, in alcune specie come il ratto sono state osservate nella ghiandola persistenti fibre NPY–immunoreattive, il che indica l'esistenza di connessioni centrali da altre parti dell'encefalo (Matsushima et al. 1999).

Altri studi con l'impiego di traccianti e immunoistochimica contro alcuni neurotrasmettitori, hanno rivelato l'esistenza di innervazione anche da parte di fibre provenienti da gangli parasimpatici e dal ganglio trigemino (Møller 1999). Dei gangli parasimpatici di testa e collo, i due più importanti per l'innervazione della pineale sembrano essere quello sfenopalatino (SPG) e quello otico (OG), in particolare in relazione a due neurotrasmettitori peptidici, il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e il peptide istidina–isoleucina (PHI) (Møller e Mikkelsen 1989). Entrambi i peptidi derivano dallo stesso prep–pro–ormone. Il VIP è stato tracciato retrogradamente *in vivo* fino al ganglio sfenopalatino, oltre che individuato con

immunoistochimica (IHC) (Shiotani et al. 1986). Nel ganglio otico invece l'IHC ha rivelato la presenza sia di VIP che di PHI, ma il tracciamento *in vivo* non è stato ancora eseguito.

Per quanto riguarda il trigemino, è stato osservato contenere tre neurotrasmettitori peptidici: la sostanza P (PS), il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) e il peptide ipofisario attivante l'adenilato ciclasi (PACAP). Fibre nervose intra-pineali contenenti SP sono stati individuati sia in roditori (Shiotani et al. 1986, Matsushima et al. 1994) che non roditori (Korf e Møller 1984; Kado et al. 1999). Immunoreattività per PACAP e CGRP è stata osservata nel ratto, spesso in concomitanza nelle stesse fibre (Møller 1999), ed inoltre è stata dimostrata la presenza di uno specifico recettore pineale per PACAP, che quindi può influenzare direttamente la secrezione di melatonina (Schomerus et al. 1996). Recentemente è stato eseguito il tracciamento retrogrado di PACAP e SP dalla pineale, dimostrando l'innervazione diretta da parte del trigemino (Møller e Baeres 2002).

L'innervazione centrale della pineale è stata a lungo supposta ma non dimostrata. La supposizione partiva dal presupposto che la commissura posteriore (CP), che delimita caudalmente il peduncolo pineale, è attraversata da fibre della via visiva. Poiché la secrezione di melatonina è influenzata dalla luce, la connessione della pineale con la retina attraverso fibre provenienti dalla commissura appariva la via anatomica più breve. Le recenti tecniche di tracciamento e di immunoistochimica hanno permesso di identificare questa innervazione centrale, che ha origine nel nucleo paraventricolare (Larsen et al. 1991), il nucleo genicolato laterale (Mikkelsen e Møller 1990) e il nucleo del raphe dorsale (Møller e Hay-Schmidt 1998). L'analisi al TEM ha rivelato la presenza di alcune fibre nervose mielinizzate nella parte rostrale della pineale profonda e un numero inferiore nel peduncolo. Analisi immunoistochimiche hanno dimostrato che le fibre nervose centrali provenienti dal PVN erano immunoreattive per vasopressina e ossitocina (Buijs e Pévet 1980). Altre fibre positive per l'orexina, un nuovo peptide coinvolto nella regolazione di sonno e appetito, sono state osservate nel ratto (Mikkelsen et al. 2001) e nel maiale (Møller e Baeres 2002), provenienti dalle aree ipotalamico dorsolaterale dell'ipotalamo e perifornicale. In culture di pinealociti, l'orexina è stata dimostrata inibire il rilascio di melatonina agendo sui recettori β -adrenergici (Mikkelsen et al. 2001). Poiché le fibre nervose centrali nei roditori si osservano sempre limitate alla sola porzione profonda, la loro effettiva influenza funzionale sull'epifisi è stata messa in dubbio. Tuttavia, uno studio effettuato sulla ghiandola pineale di molti mammiferi ha tracciato fibre GABAergiche che attraversavano le commissure abenulare e posteriore, penetrando nella pineale (Sakai et al. 2001). Nei roditori queste fibre si fermavano alla pineale profonda e al peduncolo, mentre nella tupaia comune (*Tupaia glis*), non roditore affine ai primati con pineale di tipo A, le fibre contattavano tutte le

parti della ghiandola. L'esatta provenienza di queste fibre rimane però ancora da identificare. La pineale quindi possiede un'innervazione molto complessa, che comprende oltre a quelle dal sistema nervoso autonomo, varie tipi di innervazione peptidergica, il cui effettivo contributo rimane da verificare *in vivo*.

1.2 Melatonina

1.2.1 Sintesi e metabolismo

La melatonina (5-metossi-N-acetil-idrossitriptamina) è stata purificata per la prima volta da Lerner et al. (1958), dopo che era stato documentato l'effetto sbiancante sui melanofori cutanei del rospo *Xenopus laevis* da parte di estratti di ghiandola pineale bovina. È il principale metossiindolo secreto dalla ghiandola pineale, ma certamente non l'unico, anche se il significato fisiologico degli altri è generalmente considerato trascurabile o nullo. Tutti i metossiindoli hanno come precursore fondamentale il triptofano (Trp), un amminoacido essenziale assunto con la dieta. Poiché apparentemente alcuni mammiferi sono privi di barriera emato-encefalica, come ratto e uomo, ci si aspetterebbe che i livelli circolanti di Trp siano simili a quelli pineali. Al contrario, questi ultimi sono maggiori, suggerendo l'esistenza di un trasporto attivo contro gradiente. Apparentemente manipolazioni della dieta non influiscono sui livelli di secrezione di melatonina (Arendt 1995), tuttavia è stata dimostrato un aumento della concentrazione plasmatica dell'ormone dopo somministrazione di triptofano nell'uomo (Celinski et al. 2009). Il triptofano viene convertito a 5-idrossitriptofano (5-HTP) dall'enzima triptofano 5-idrossilasi (TPOH) (Lovenberg et al. 1967), e successivamente nel citosol la decarbossilasi degli amminoacidi aromatici (AAAD) lo trasforma in serotonina, altro importante ormone e neurotrasmettitore (Frazer e Hensler 1999). La TPOH è un enzima mitocondriale tipicamente presente nei tessuti che producono serotonina, necessita di un cofattore pteridinico (di solito tetraidrobiopterina) ed ha un'emivita di soli 75 minuti (Sitaram e Lees 1978). L'espressione dell'mRNA e la sua attività diurne sono elevate e nella pineale di ratto aumentano fino al 100% nelle ore notturne (Ehret et al. 1991). L'AAAD è invece un enzima citosolico, diffuso in molti tessuti e con ampia varietà di substrati, ed è essenziale ad esempio per la sintesi delle catecolamine (es. adrenalina e noradrenalina). Necessita di piridossalfofato (una forma attiva di vitamina B6) come cofattore, e al contrario di TPOH la sua attività non è limitante per la produzione di serotonina (King e Steinlechner 1985), è relativamente alta e senza variazioni giornaliere. Le concentrazioni di serotonina variano secondo un ritmo giornaliero, con valori elevati durante il giorno (150-250

pmol/ghiandola) e minimi durante la notte (25–50 pmol/ghiandola) nel ratto (Snyder et al. 1967). Nonostante i suoi livelli seguano un pattern di variazione inverso rispetto a quello della melatonina, è stato dimostrato che la secrezione di serotonina notturna è necessaria per una stimolazione ottimale β -adrenergica, il maggiore stimolo nervoso per la secrezione di melatonina (Sun et al. 2002).

La serotonina, o 5-idrossitriptamina (5-HT) è il precursore di tre differenti vie biosintetiche. Nel primo caso può venire direttamente metilata dall'idrossiindolo-O-metiltrasferasi (HIOMT), l'ultimo enzima coinvolto nella sintesi di melatonina, a formare 5-metossitriptamina (5-MT) (Axelrod e Weissbach 1960). Nel secondo caso può essere deaminata da una monoamino ossidasi (MAO) a 5-metossiindolacetaldeide (5-HIAL), la quale a sua volta può subire due destini diversi: essere ossidata da un'aldeide deidrogenasi ad acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA) e poi metilata da HIOMT ad acido 5-metossiindolacetico (5-MIAA), oppure venire ridotta da un'alcol deidrogenasi a 5-idrossitriptofolo (5-HL) poi metilato da HIOMT a 5-metossitriptofolo (5-ML). La terza via biosintetica è quella più importante e fisiologicamente significativa, essendo quella che porta alla sintesi di melatonina (Weissbach et al. 1960). In particolare, la serotonina viene prima acetilata dalla arilalchilammina-N-acetiltrasferasi (AANAT) a N-acetil-serotonina (NAS), che viene poi metilata da HIOMT per formare melatonina (5-metossiindol-N-acetilserotonina). È interessante sottolineare che in tutti e tre questi percorsi metabolici la HIOMT gioca un ruolo centrale.

AANAT è l'enzima in assoluto più studiato fra quelli coinvolti nella sintesi di melatonina, in quanto la sua attività è considerata il fattore limitante. È un enzima citoplasmatico, che necessita di acetil-coenzima A (acetil-CoA) come cofattore, ed è presente in molti tessuti. Ha peso molecolare di ca. 23 kDa, nel ratto è di forma globulare e composta da 8 foglietti- β e 4 α -eliche. I domini più conservati della proteina sono uno N-terminale, che è il sito di legame della arilalchilammine, e due C-terminali, coinvolti nel legame dell'acetil-CoA. Nella pineale e nella retina è espresso a livelli elevati, ma anche in altri tessuti nervosi o periferici (soprattutto ovaia e testicolo), con livelli molto bassi (Hamada et al. 1999, Uz e Manev 1999). Tuttavia non è ancora chiaro se nei tessuti non nervosi essa regoli la sintesi locale di melatonina oppure di serotonina o NAS.

Il suo cDNA è stato sequenziato in molti mammiferi, come ratto, topo (Roseboom et al. 1996), criceto siberiano (Gauer et al. 1999), pecora (Coon et al. 1995), bovino (Craft et al. 1999), macaco (Coon et al. 2002) e uomo (Coon et al. 1996). L'omologia di sequenza proteica interspecifica è piuttosto elevata, ed è significativamente diversa da sequenze note di altre proteine, il che fa supporre che AANAT sia una proteina che è comparsa evolutivamente tardi e si è evoluta

rapidamente, forse parallelamente all'adozione della melatonina come segnale di buio (Klein et al. 1997). Il grado di similarità della proteina rispetto all'uomo è del 97% nel macaco, 84% nella pecora, 90% nel ratto, 76% nel pollo (Klein et al. 1997). Nella stessa specie, la proteina è apparentemente regolata in modo molto diverso a seconda del tessuto in cui è espressa. Ad esempio, il complesso eterodimerico BMAL1/CLOCK che funge da fattore di trascrizione dei geni coinvolti nella regolazione del ritmo circadiano, nella retina di ratto attiva la trascrizione del gene di AANAT, mentre nella pineale no.

Espressione dell'mRNA, quantità e attività dell'enzima sono quasi del tutto non rilevabili durante il giorno, mentre nella pineale di ratto possono aumentare fra 75 e 150 volte (Borjigin et al. 1995, Klein et al. 1996). Questo picco notturno necessita di trascrizione e traduzione *ex novo*, poiché la proteina è molto instabile, con emivita compresa fra 3 e 5 minuti. Dopo esposizione alla luce anche per tempi brevi durante le ore notturne, l'attività di AANAT subisce un rapido decremento, indipendentemente dalla quantità di mRNA tradotto, che dipende quindi da meccanismi post-traduzionali (Gastel et al. 1998). È proprio a causa di questa drastica inibizione indotta dalla luce che AANAT è considerato l'enzima limitante nella sintesi di melatonina e che determina il ritmo della secrezione. Tuttavia, sia in pinealociti in coltura che nella pineale di ratto *in vivo*, è stata osservata un elevato rilascio extracellulare notturno di NAS, che indica quindi che non tutta l'N-acetilserotonina prodotta da AANAT viene poi convertita in melatonina, perciò l'enzima limitante in condizioni di particolare stimolazione diventa HIOMT (Simonneaux e Ribelayga 2003). L'importanza relativa dei meccanismi trascrizionale, tradizionali e post-traduzionali nell'attività di AANAT varia a seconda della specie (Klein 1997).

HIOMT, come già descritto, catalizza la reazione finale non solo di melatonina ma anche degli altri metossiindoli pineali. Il cofattore essenziale per la sua funzione è la S-adenosilmetionina, da cui l'enzima trasferisce un gruppo metile al substrato indolico. L'enzima costituisce una frazione molto elevata del contenuto proteico totale della ghiandola pineale, pari al 2-4% (Jackson e Lovenberg 1971). La stabilità della proteina è molto elevata, con un'emivita superiore a 24 h (Bernard et al. 1995, 1996). Nelle specie studiate finora HIOMT è un dimero di 76-79 kDa formato da due subunità di peso identico. Nel bovino è stato ipotizzato che le subunità possano formare complessi polimerici di elevato peso molecolare (Jackson e Lovenberg 1971). Indagini immunoistochimiche hanno rivelato una grande eterogeneità nella struttura proteica e nelle proprietà enzimatiche fra le varie specie studiate (Nakane et al. 1983).

Al contrario di AANAT l'omologia di sequenza amminoacidica inter-specifica è relativamente bassa, ad esempio rispetto al ratto, è del 66% nel bovino, del 69% nel pollo, e del 60% nell'uomo (Simonneaux e Ribelayga 2003). L'espressione del gene è regolata da due distinti

promotori, che determinano la produzione di due isoforme specifiche per la retina (promotore A) e per la pineale (promotore B). Nella pineale di ratto l'attività notturna dell'enzima di notte è molto bassa ma maggiore che nella retina e nella ghiandola di Harder. Gli studi enzimatici rivelano che le isoforme di HIOMT di retina e pineale hanno proprietà simili tra loro, ma diverse da quella della ghiandola di Harder (Cardinali e Wurtman 1972). Ciò è confermato anche dal fatto che primer specifici per la sequenza nucleotidica di HIOMT della pineale riconoscono la sequenza della retina, ma non della ghiandola di Harder (Simonneaux e Ribelayga 2003).

Fra i precursori dei metossindoli sintetizzati da HIOMT, nella ghiandola pineale di ratto l'enzima ha un'affinità per N-acetilserotonina del 50–80%, per 5-idrossitriptofolo del 15–30%, per 5-idrossitriptamina del 10% e per altri del 5%. Ciò implica che la proporzione di metossindoli circolanti sono sempre rappresentati in maggioranza da melatonina, e in percentuali inferiori anche da altri composti. Inoltre nell'uomo le variazioni di 5-metossitriptamina e 5-metossitriptofolo si dimostrano inversi a quelli di melatonina, ovvero con livelli elevati durante il giorno e bassi durante la notte (Arendt 1995).

L'aumento di attività enzimatica notturna di HIOMT è talmente basso che è stato messo in dubbio, anche perché la stimolazione con agonisti β -adrenergici non inducevano attività enzimatica nei pinealociti né *in vitro* (Berg e Klein 1971) né *in vivo* (Nagle et al. 1973). Recentemente nel ratto è stato tuttavia documentato un aumento del 40–50% dell'attività notturna rispetto a quella diurna (Ribelayga 1997). Al contrario dell'attività enzimatica, la trascrizione del suo gene è relativamente alta anche durante il giorno, e aumenta di circa 2 volte durante la notte (Gauer e Craft 1996). L'esposizione alla luce durante le ore notturne ha un effetto a breve termine sulla trascrizione, che nel ratto viene inibita nel giro di 20 minuti (Ribelayga et al. 1999). Curiosamente, né la stimolazione da parte di cAMP (AMP ciclico) o di agonisti noradrenergici stimolava l'attività di HIOMT a breve termine in pinealociti in coltura, mentre NPY (altro neurotrasmettitore presente nelle fibre del ganglio cervicale superiore) riusciva ad aumentarla del 30–40% entro poche ore (Ribelayga et al. 1997). Ciò implica che NPY svolga un ruolo importante nella regolazione del ritmo circadiano dell'attività di HIOMT. L'espressione e l'attività di questo enzima, quindi della produzione di melatonina, appare regolato in modo complesso da diversi neurotrasmettitori, almeno nel breve termine.

Essendo altamente lipofilica la melatonina non viene immagazzinata in granuli, al contrario della serotonina (Ringvall et al. 2008), quindi una volta sintetizzata viene direttamente immessa nel circolo sanguigno, in cui ha un'emivita di circa 20 minuti (Gibbs e Vriend 1981). Nel ratto si osserva una concentrazione di melatonina diurna di 10–20 pg/ml e notturna di 80–100 pg/ml. La melatonina viene rapidamente degradata nel fegato a 6-idrossimelatonina dal citocromo

P450 (Skene et al. 2001) e successivamente nel rene può essere solfonata a 6-sulfatossimelatonina, come nel ratto (Kopin et al. 1961), oppure coniugata con acido glucuronico come nel topo, per poi essere escreta nelle urine. La percentuale dei due tipi di metabolica varia a seconda della specie, ad esempio in ratto e uomo la frazione solfonata è di almeno il 90% rispetto a quella glucuronata (Arendt 1995). Nell'encefalo la melatonina subisce un catabolismo ancora diverso, con rottura dell'anello indolico e produzione di N- γ -acetil-N-2-formil-5-metossichinurenamina e N- γ -acetil-5-metossichinurenamina (Arendt 1995).

1.2.2 Recettori

Come tutti gli ormoni, la melatonina necessita del legame con un recettore per esercitare la maggior parte dei suoi effetti. I primi esperimenti che suggerivano l'esistenza di recettori che mediavano risposte specifiche sono stati quelli condotti sul potere sbiancante della melatonina e dei suoi ligandi nella pelle di anfibio. In questi esperimenti la tossina della pertosse inibiva l'aggregazione dei granuli di pigmento, indicando che la melatonina agisce attraverso recettori transmembranalmente accoppiati a proteina G, inattivata dalla tossina (White et al. 1987). Altri studi effettuati con analoghi radioattivi, es. 2[¹²⁵I]-melatonina, hanno rivelato l'esistenza di due tipi di siti legame: quelli ad alta affinità, con costante di dissociazione K_D nel range 20–200 pM, e quella a bassa affinità, con K_D con range nanomolare (Vanecek et al. 1987). Attualmente sono stati caratterizzati tre tipi di recettori ad alta affinità: MT_1 (già Mel_{1a}), presente in tutti i vertebrati soprattutto nell'encefalo, MT_2 (già Mel_{1b}), espresso in tutti i vertebrati principalmente nella retina, e Mel_{1c} identificato nel pesce zebra (*Danio rerio*), nell'anuro *Xenopus laevis* e nel pollo ma non nei mammiferi. Il sito a bassa affinità, chiamato inizialmente MT_3 , è stato da poco identificato con l'enzima chinone reduttasi 2 (QR_2), un enzima citosolico la cui funzione non è ancora stata del tutto delineata (Nosjean et al. 2000, Fischer et al. 2007). Inoltre sono stati identificati anche recettori nucleari, $ROR\alpha$ e $ROR\beta$, appartenenti alla famiglia dei recettori orfani correlati al recettore dell'acido retinico (RAR). I recettori orfani sono così chiamati perché la loro struttura è simile a quella di altri recettori conosciuti, ma il cui specifico ligando non è noto; la melatonina è stata dimostrata essere uno di questi ligandi (Becker-Andrè 1994).

Sia MT_1 che MT_2 sono classici recettori con 7 domini transmembranalmente accoppiati a proteina G solitamente inibente l'adenilato ciclasi, che quindi abbassa i livelli intracellulari di cAMP. Entrambi hanno peso molecolare di ca. 39–40 kDa, hanno identità di sequenza reciproca del 60% e sono codificati da geni su cromosomi distinti (Masana e Dubocovich 2001). Tra i recettori accoppiati a proteina G (GPCR) si distinguono per il motivo asparagina-arginina-tirosina

(NRY), presente sul secondo loop interno, diverso da tutti gli altri, ed è quello coinvolto nella trasduzione con la proteina G. Gli effetti sui messaggeri secondari sono sia eccitatori che inibitori, ad esempio stimolando il ripristino del fosfatidilinositolo o aumentando il rilascio intracellulare di Ca^{2+} (MT₁), oppure inibendo la formazione di cAMP (MT₁ e MT₂) e l'accumulo di cGMP (MT₂) (Dubokovich et al. 2003). È stato dimostrato nella pineale di ratto una proporzionalità inversa fra la densità dei recettori di melatonina e i suoi livelli plasmatici (Gauer et al. 1993). MT₃ (o QR2) è stato identificato nell'encefalo di ratto e in molti tessuti periferici, agisce principalmente attraverso l'idrolisi di fosfoinositidi, ed è in grado di legare sia melatonina che il suo precursore NAS (Popova e Dubocovich 1995). L'analogo sintetico 2[¹²⁵I]-melatonina può legarsi sia a MT₁ che a MT₂ ma *in vivo* nel ratto sembra essere limitato a MT₁ dato che nel SCN non viene rilevata radioattività in esemplari con knock-out del gene per MT₁ (Liu et al. 1997). Nell'uomo l'mRNA di MT₁ è stato localizzato con PCR in SCN, cervelletto, corteccia cerebrale, talamo, ippocampo e retina, e quello di MT₂ in retina e ippocampo, ma con ibridizzazione *in situ* anche in SCN e cervelletto (Reppert et al. 1994, 1995). Nella retina di ratto e cavia, MT₁ è stato localizzato con immunostochimica nello strato plessiforme esterno, nelle cellule gangliari, nelle cellule orizzontali e nelle amacrine, ma non nei fotorecettori. Al contrario, nella retina di uomo i fotorecettori esprimono MT₁ (Scher et al. 2002). Gli effetti principali di MT₁ sono l'inibizione della frequenza di scarica del potenziale d'azione da parte dei neuroni del nucleo suprachiasmatico, la stimolazione della secrezione di prolattina dalla *pars tuberalis* e vasocostrizione (Mason e Brooks 1988, Shibata et al. 1989). L'attivazione di MT₂ provoca invece uno spostamento di fase del ritmo generato da SCN, inibisce il rilascio di dopamina dalla retina e induce vasodilatazione. La funzione di MT₃ resta ancora da definire appieno, ma è coinvolto nella riduzione della pressione intraoculare e nell'inibizione del rotolamento dei leucociti sugli endoteli vascolari (Lotufo et al. 2001, Pintor et al. 2001). Sia ROR α che ROR β sono in grado di legare melatonina e mostrano un certa variabilità tessuto-specifica. ROR α è stato isolato da retina e testicolo di uomo, in cui si riconoscono almeno 4 varianti di *splicing*, mentre ROR β da encefalo di ratto, tessuto in cui è espresso preferibilmente (Carlberg et al. 1994, Giguère et al. 1994,). L'esistenza di questi recettori testimonia che la melatonina ha un effetto diretto sull'attivazione dei geni coinvolti nella regolazione dei ritmi circadiani, con effetti a lungo termine, ma ancora non si conosce esattamente il loro specifico significato funzionale.

1.3 Effetti principali della melatonina

1.3.1 Ritmi biologici

La melatonina è secreta dalla pineale e da altri tessuti con variazioni giornaliere e stagionali sotto il controllo dell'oscillatore circadiano interno con sede nel SCN ipotalamico. L'ormone è secreto durante la notte con una durata e un'ampiezza del picco inversamente proporzionale alla durata del fotoperiodo, e con un periodo di latenza specie-specifico (Arendt 1995). La pineale agisce da trasduttore neuroendocrino del segnale luminoso esterno permettendo all'organismo di adottare i cambiamenti fisiologici per adattarsi alle mutate condizioni ambientali. Tra le più importanti funzioni regolate in modo fotoperiodo-dipendenti c'è sicuramente l'attivazione o l'inattivazione della riproduzione. La stagionalità riproduttiva è ristretta in molti mammiferi ad un preciso periodo dell'anno, per dare alla prole maggiori possibilità di sopravvivere alla nascita in condizioni ambientali favorevoli (Gerlach e Aurich 2000).

Una delle strutture considerata coinvolta nella funzione riproduttiva è il peduncolo ipofisario o *pars tuberalis* dell'adenipofisi, che connette la ghiandola al resto dell'ipotalamo. Essa contiene la più alta densità registrata di recettori della melatonina ed è il sito di controllo della secrezione di prolattina, che ha effetti sulla funzione riproduttiva (Egli et al. 2010). Differenti strutture nervose sono state riconosciute come bersaglio specifico per il controllo della funzione riproduttiva in diverse specie, ad esempio il SCN nel criceto siberiano, l'ipotalamo mediobasale nel criceto dorato e l'ipotalamo premammillare nella pecora (Maywood e Hastings 1995, Malpoux et al. 1998). Ma quali sono i parametri del ritmo di secrezione di melatonina (es. fase, quantità totale secreta, durata e ampiezza del picco) che vengono interpretati come il segnale fotoperiodico da parte della struttura bersaglio? Numerosi studi effettuati soprattutto in roditori (Illernova et Vanecek 1980, Ribelayga et al. 2000, Ashkenazi et al. 2009) ma anche in alcuni ruminanti (Cheminau et al. 1988) hanno cercato di chiarire questi aspetti, attraverso esperimenti con manipolazioni del fotoperiodo o con iniezioni acute e croniche di melatonina.

È stato stabilito in alcuni mammiferi sottoposti a diverse condizioni fotoperiodiche che la durata del picco notturno di melatonina è sempre proporzionale alla durata della notte, ad esempio nella pecora (Rollag e Niswender 1976), nel ratto (Illernova e Vanecek 1980), nel criceto dorato (Ribelayga et al. 2000) e nel criceto europeo (Vivien-Roels et al. 1992). Esperimenti con iniezione acuta/infusione endovenosa di melatonina hanno evidenziato che la durata del picco di melatonina è un fattore importante per la trasmissione dell'informazione fotoperiodica all'organismo e per l'induzione del comportamento riproduttivo (Carter e Goldman 1983, Pitrosky et al. 1995).

L'ampiezza del picco di melatonina può essere un altro fattore importante, ed è stato osservato variare a seconda delle condizioni fotoperiodiche durante l'anno, ad esempio nel maiale

(Taste et al. 2001), nel mulo (Cozzi et al. 1991), nel criceto siberiano (Ribelayga et al. 2000) e nel cavallo (Guérin et al. 1995). Queste variazioni si osservano al meglio in animali mantenuti nel loro ambiente naturale, suggerendo che altri fattori ambientali, anche se non decisivi, possono costituire altri segnali che integrano l'informazione fotoperiodica (Vivien–Roels 1999). Ad esempio un abbassamento della temperatura è stato dimostrato accelerare la regressione delle gonadi in criceti siberiani e dorati a parità di fotoperiodo (Pévet et al. 1986, Larkin et al. 2002), aumentare l'attività di HIOMT nella pineale di ratto (Nir et al. 1975), aumentare l'ampiezza del picco notturno di melatonina nel criceto europeo (Vivien–Roels et al. 1997) e modulare l'effetto inibitorio dell'impulso luminoso di notte nel criceto siberiano (Stiglitz et al. 1991).

Indipendentemente dalle abitudini diurne o notturne delle varie specie, la melatonina viene sintetizzata dalla ghiandola pineale durante la fase buia in tutte. Il suo ritmo viene utilizzato dal nucleo suprachiasmatico per trasmettere l'informazione fotoperiodica agli organi bersaglio, ma lo stesso SCN è influenzato direttamente dall'ormone, che ha un così detto effetto cronobiotico, cioè in grado di alterare il normale ritmo modificando ad esempio la fase del picco di secrezione o la sua ampiezza. In condizioni di ritmo *free-running*, ovvero senza imposizione di input esterni, in ratto e criceto dosi farmacologiche di melatonina sono in grado di sincronizzare il ritmo circadiano di attività e la stessa sintesi di melatonina (Pévet et al. 2002, Schuhler et al. 2002). L'effetto di sincronizzazione avviene ad un determinato momento del ritmo circadiano e in maniera specie-specifica, ad esempio nel ratto all'inizio del periodo di attività (Simonneaux e Ribelayga 2003). La melatonina infusa direttamente nel SCN di ratto non solo anticipa la fase, quindi il tempo a cui si verifica il picco, ma ne aumenta l'ampiezza (Bothorel et al. 2002). Questi effetti cronobiotici della melatonina, oltre a quelli di altri input minori, è utilizzato anche dalla madre per sincronizzare il l'orologio circadiano della prole, come documentato in molti roditori (Stetson et al. 1989, Goldman 2003).

1.3.2 Proprietà paracrine e autocrine

Oltre ad influenzare organi bersaglio distanti, in quanto ormone endocrino, sono stati ultimamente riconosciuti diversi effetti paracrini o autocrini della melatonina, sia da parte della pineale che dai tessuti extrapineali. Nella retina della maggior parte dei mammiferi l'ormone viene sintetizzato in maniera circadiana nei fotorecettori della retina, anche in vitro (Tosini e Menaker 1996). La maggior parte degli effetti retinici della melatonina consiste principalmente nell'inibizione del rilascio di dopamina da parte delle cellule amacrine (Dubocovich 1983). Viceversa, la dopamina inibisce la sintesi di melatonina in maniera acuta e influenza la fase del

ritmo di quest'ultima (Tosini e Dirden 2000). Anche l'epitelio retinico pigmentato (RPE) è stato dimostrato in grado di sintetizzare melatonina, che in maniera autocrina potrebbe influenzare aggregazione e dispersione dei propri granuli di melanina (Pang e Yew 1979), o per via paracrina potrebbe stimolare nei fotorecettori il rilascio dei dischi terminali dai segmenti esterni che vengono poi fagocitati (Kevany e Palczewski 2010). Nella ghiandola di Harder (esocrina) la melatonina viene attivamente prodotta, ma i meccanismi che ne regolano la sintesi e i suoi effetti autocrini o paracrini sono scarsamente compresi (Djéridane et al. 2000). Nella pineale di ratto è stata dimostrata l'espressione di recettori MT_1 e MT_2 nel feto ma non nell'adulto (Zitouni et al. 1995), mentre l'espressione dei recettori nucleari $ROR\alpha$ e $ROR\beta$ avviene anche nell'adulto e con profili d'espressione paralleli a quelli della melatonina, indicando la regolazione autocrina o paracrina anche in questa ghiandola (André et al. 1998). Gli effetti esogeni della somministrazione di melatonina comprendono modificazioni della polimerizzazione dei microtubuli, dell'attività di alcuni enzimi (Freire e Cardinali 1975) e del rilascio presinaptico di neurotrasmettitori (Chuluyan et al. 1991) compresa la serotonina (Miguez et al. 1995).

1.3.3 Altri effetti

L'influenza della melatonina sul sistema immunitario è stata suggerita dalle prime osservazioni su ratti pinealectomizzati che mostravano modificazioni strutturali del timo, e dal fatto che la melatonina esogena o il trapianto di pineale preveniva l'involuzione del timo in topi di età avanzata (Maestroni 2001). Numerosi studi hanno poi dato conferma all'opinione generale secondo cui la melatonina ha un effetto stimolante sul sistema immunitario. Studi *in vivo* dimostrano l'aumento dell'attività delle cellule T e la stimolazione della maturazione dei linfociti, ed *in vitro* la melatonina aumenta l'attività delle cellule T-helper e *natural killer* (NK), con aumento della secrezione di citochine (Simonneaux e Ribelayga). Gli effetti dell'ormone sono mediati da specifici recettori, individuati in molti tessuti con funzione immunitaria, come nel timo, nella milza, nei linfociti e nelle cellule T-helper (Pozo et al. 2004). Poiché il numero e l'attività dei linfociti T, B e NK mostra un ritmo giornaliero, è stato suggerito che la melatonina possa regolare cambiamenti stagionali della funzione immune, che in fotoperiodo brevi potrebbe essere incrementata dai picchi notturni prolungati (Nelson e Drazen 2000).

In alcuni studi su ratti vecchi, la somministrazione di melatonina o il trapianto di pineale di esemplari giovani aveva un effetto rivitalizzante ed antiossidante. L'utilizzo dell'ossigeno nel metabolismo cellulare comporta la produzione di moltissime specie reattive di radicali liberi, come l'anione superossido, il perossido d'idrogeno, l'ossido nitrico e il radicale ossidrile, tra i più

potenti. Questi radicali danneggiano con reazioni a catena le principali macromolecole sia nel citosol che del nucleo, portando all'invecchiamento e alla morte cellulare per apoptosi. È stato documentato che elevate dosi farmacologiche di melatonina, nell'ordine delle millimoli, sono in grado di neutralizzare la maggior parte di questi composti citotossici, soprattutto il radicale ossidrilico, con produzione *in vivo* di 3-idrossimelatonina ciclica escreta nelle urine (Tan et al. 1998). Inoltre la melatonina stimola *in vivo* l'attività di alcuni enzimi antiossidanti, come la glutatione perossidasi o la superossido dismutasi, e inibisce quella di enzimi pro-ossidanti come la ossido nitrico sintasi (Barlow-Walden et al. 1995, Kotler et al. 1998). *In vivo* probabilmente la melatonina è in grado di esercitare un effetto antiossidante senza la mediazione di recettori, date le sue proprietà lipofili che le permettono una facile diffusione attraverso le membrane compresa quella nucleare (Menendez-Pelaez e Reiter 1993). Poiché gli effetti dei radicali liberi sono coinvolti anche nei processi di invecchiamento e di cancerogenesi, è stato ipotizzato che elevati livelli di melatonina potrebbero rallentare le alterazioni legate all'età o ai tumori. Ad esempio, in pazienti affette da tumore al seno estrogeno-dipendente c'è una significativa correlazione inversa fra i livelli citoplasmatici di melatonina e la densità dei recettori degli estrogeni. *In vitro* invece concentrazioni di melatonina (ma non di serotonina o NAS) fra 1 e 100 nM riducevano dal 40 al 60% la proliferazione delle cellule tumorali (MCF-7), ma non è ancora chiaro lo specifico meccanismo di citotossicità della melatonina su queste cellule (Blask e Hill 1986). Bisogna sottolineare che questi effetti oncostatici o anti-invecchiamento si verificano a concentrazioni micromolari, di sei ordini di grandezza superiori a quelli fisiologici che sono nel range picomolare. Finora solo pochi studi suggeriscono che anche a livelli fisiologici la melatonina possa avere proprietà antiossidanti (Pozo et al. 1994, Benot et al. 1999), e necessitano di una corroborazione maggiore.

1.4 Il tursiope (*Tursiops truncatus*)

1.4.1 Storia evolutiva dei Cetacei

L'ordine dei Cetacei è suddiviso in 3 sottordini: gli Odontoceti, che comprendono tutti le specie dotate di denti, i Mysticeti, che includono quelle dotate di fanoni, e gli Archeoceti, completamente estinti. L'esatta origine filogenetica dei Cetacei è sempre stata molto dibattuta, ed a lungo sono stati considerati come progenitori diretti più antichi i Mesonichidi, un clade di mammiferi con caratteristiche intermedie fra gli odierni Carnivori e Ungulati, risalenti a ca. 64 milioni di anni fa (MAF), nel primo Paleocene (O' Leary 2001). In tempi recenti però, dopo la

scoperta di nuove specie di Archeoceti primitivi con arti posteriori ben conservati, numerose analisi filogenetiche sia basate su caratteri morfologici che biomolecolari hanno rivelato che i Cetacei sono più strettamente imparentati con gli Artiodattili (comprendenti ad esempio maiali, ippopotami, cammelli, pecore, capre e bovini), oppure direttamente discendenti da essi (Shimamura et al. 1997). Molti studiosi ritengono i due ordini non più come distinti ma appartenenti ad un unico nuovo ordine, i Cetartiodattili (Gingerich et al. 2001, Geisler e Uhen 2005). I Mesonichidi sarebbero esclusi da questo clade, ed inoltre, al suo interno emergerebbe che la famiglia degli Ippopotamidi è quella più direttamente imparentata con i Cetacei (Boisserie et al. 2005, Geisler e Uhen 2005). Questa teoria trae un consistente supporto dalle analisi filogenetiche molecolari, tuttavia rimarrebbe da spiegare un apparente vuoto di 40 milioni di anni, fra gli ultimi ippopotamidi fossili noti e il loro ultimo antenato fossile comune con i Cetacei (Theodor JM 2004).

Gli Archeoceti, come s'intuisce dal nome, costituiscono la più antica radiazione di cetacei e comprendono gli antenati degli odierni Odontoceti e Mysticeti. Le famiglie generalmente riconosciute al loro interno, dalla più antica alla più derivata, sono 5: Pakicetidi, Ambulocetidi, Remingtonocetidi, Protocetidi e Basilosauridi (Williams 1998). Vissero durante tutto l'arco dell'Eocene (ca. 55–34 MAF), per poi scomparire durante l'estinzione di massa avvenuta a cavallo fra Eocene e Oligocene, evento noto come “Grand Coupure” (Prothero 1994). Il più antico resto fossile di pakicetide è stato trovato negli anni '80 in Pakistan, da cui il nome di *Pakicetus*, in rocce risalenti all'Eocene (53–54 milioni di anni fa). In quell'era le condizioni climatiche favorevoli produssero un'elevata diffusione di ambienti acquatici, specialmente di mari poco profondi e relativamente caldi, risorse che a loro volta hanno permesso la rapida diffusione sia dei primi Cetacei che dei primi Sireni (Gingerich et al. 1983). I Pakicetidi avevano dimensioni medie fra quella di una volpe e di un lupo, le narici si trovavano vicino alla fronte e gli occhi guardavano verso l'alto in modo simile ai coccodrilli. La dentizione e la morfologia del cranio non corrispondeva a quella degli attuali Cetacei, ma in comune con questi mostravano ossicini dell'orecchio medio pachiosteotici e orientati in modo diverso rispetto agli altri mammiferi. La presenza di arti posteriori ancora robusti non suggerisce fossero in grado di nuotare ma solo di guadare corsi d'acqua (Gray et al. 2007).

Gli Ambulocetidi somigliavano di più a coccodrilli, con cranio massiccio e rostro allungato, coda robusta e arti corti, ma gli occhi in posizione dorsale guardavano anche lateralmente. Sono stati rinvenuti in rocce risalenti a ca 45 MAF e corrispondenti ad ambienti rivieraschi, come estuari o insenature. Sia le zampe anteriori che posteriori erano corte e dotate di zoccolo, l'autopodio posteriore era molto più allungato, suggerendo una modalità di locomozione

simile alle lontre, ovvero fornita dall'ondeggiamento delle zampe posteriori con possibilità di propulsioni con la coda. La vera particolarità degli Ambulocetidi consisteva nella connessione di tessuto molle fra la mandibola e l'orecchio medio, che nei moderni Odontoceti si è sviluppata nel "cuscino" di grasso che fa parte del sistema acustico ricettivo (Nummela et al. 2004).

I Remingtonocetidi sono stati ritrovati in sedimenti di India e Pakistan di ca. 46–43 MAF, i cui resti sono essenzialmente costituiti da resti di mandibole e crani. Il rostro era più proporzionalmente più allungato rispetto ai precedenti Archeoceti, gli occhi erano più piccoli, le ossa dell'orecchio più distanziate e la loro connessione con la mandibola più estesa, indicando una maggiore attitudine alla ricezione sonora in un ambiente acquatico (Kumar e Sahni 1986). Analisi geochimiche dei radioisotopi stabili indicano che probabilmente ingerivano acqua di mare (Clementz et al. 2006).

I Protocetidi costituiscono una radiazione evolutiva parzialmente sovrapposta ai Remingtonocetidi e successiva a Pakicetidi e Ambulocetidi. Possedevano rostri molto allungati, grandi occhi e narici ancora più arretrate degli altri Archeoceti, rendendoli in grado di respirare in acqua tenendo la maggior parte della testa orizzontale, anticipando l'origine dello sfiatatoio. Le zampe posteriori erano molto ridotte e, particolare importante, in alcune specie le ossa del bacino non avevano articolazione ossea col resto della colonna vertebrale, suggerendo che le zampe posteriori non sorreggessero il peso corporeo. I fossili di Protocetidi sono infatti stati trovati in sedimenti corrispondenti ad bacini marini poco profondi, indicando modalità di vita già totalmente acquatica in alcuni di questi Archeoceti (Hullbert 1998, Gingerich et al. 2001).

I Basilosauridi rappresentano il gruppo più derivato, composto totalmente di forme acquatiche, e raggiungevano dimensioni ragguardevoli, fra i 4 (*Saghacetus osiris*) e i 16 m (*Basilosaurus cetoides*). Nonostante non presentassero ancora telescopio del massiccio facciale, ed avessero ancora dentatura eterodonte difiodonte (Uhen 1998), al contrario dei Cetacei attuali, possedevano caratteristiche uniche rispetto agli altri Archeoceti. Le zampe posteriori erano fortemente ridotte e prive di articolazione con la colonna vertebrale, nella quale mancavano le vertebre sacrali e alcune caudali erano appiattite dorso–ventralmente. La scapola era ampia e a forma di ventaglio, le ossa di braccio e avambraccio erano appiattite e sullo stesso piano, comportando il movimento dell'articolazione del gomito su un solo piano, e con l'impossibilità di ruotare radio e ulna all'articolazione radioulnare prossimale (Uhen 2008). Ciò anticipava la formazione di una pinna pettorale, in cui le ossa dell'intero arto non possono muoversi le une rispetto alle altre, se non all'articolazione scapolo–omerale, come nei Cetacei odierni. Dal gruppo dei Dorudontini, i Basilosauridi più derivati, ha avuto origine la divergenza evolutiva fra Odontoceti e Misticeti, circa 32–34 MAF (Arnason et al. 2000).

1.4.2 Caratteri morfologici principali dei Cetacei

Odontoceti e Mysticeti per adattarsi alla vita completamente acquatica hanno subito diversi cambiamenti estremi, di cui i più evidenti riguardano l'apparato tegumentario e muscolo-scheletrico. Entrambi gli ordini sono privi di pelliccia, in quanto sarebbe di impedimento per una buona idrodinamicità, ma alcuni peli si possono ancora osservare sottoforma di vibrisse in due file lungo il rostro negli Odontoceti. Generalmente si notano solo nei neonati e scompaiono con la crescita, lasciando solo le cripte del follicolo, tranne nei delfini di fiume della famiglia *Platanistidae*, in cui rimangono dei ciuffi anche nell'adulto (Norman e Fraser 1948). Nei Mysticeti invece, anche negli adulti si trovano numerose vibrisse, che variano in numero e posizione lungo la testa, e spesso sono associate con le callosità tipiche del genere *Eubalaena* (Weinrich 2008) o dei noduli del rostro delle megattere (Ling 1977). Per garantire l'isolamento termico, in assenza di una pelliccia è stato sviluppato uno spesso strato sottocutaneo di grasso, detto *blubber*, che ha anche un ruolo determinante nel galleggiamento, in quanto riduce fortemente la densità corporea.

Nei Cetacei il tessuto adiposo ha subito un notevole grado di specializzazione funzionale, con lo sviluppo di alcune strutture coinvolte nella ricezione o nell'emissione sonora. Entrambi i sottordini presentano dei corpi adiposi che riempiono le cavità delle ossa mandibolari, la cui funzione è quella di canalizzare il suono in entrata verso i seni aerei che circondano l'orecchio medio (Soldevilla et al. 2005). Negli Odontoceti si è evoluto anche uno speciale organo detto melone, caratterizzato da un complesso tessuto connettivale e adiposo, che ha la funzione di focalizzare il suono in uscita imprimendogli una direzionalità. Particolare è il caso della famiglia dei *Physeteridae*, in cui oltre al melone si è evoluta una nuova struttura, non omologa ad altre, detta organo dello spermaceti, al cui interno è contenuta l'omonima sostanza cerosa. La sua funzione più probabile si suppone sia quella di zavorra: riscaldando o raffreddando gli olii in esso contenuti, grazie ai grandi vasi sanguigni, la densità della testa cambierebbe, facilitando immersione ed emersione (Miller et al. 2004). Nei Cetacei l'apparato locomotore ha subito profonde trasformazioni anatomiche per adattarsi a una locomozione in un mezzo acquatico, a cominciare dalla formazione di pinne. Gli arti toracici hanno perso qualsiasi tipo di mobilità tra le ossa che li compongono, tranne per l'articolazione scapolo-omerale, e formano una superficie piatta, che permette di stabilizzare l'assetto orizzontale e di sterzare. La scapola ha sviluppato un'ampia forma a ventaglio e la clavicola è assente. Le pinne caudale e dorsale sono composte esclusivamente da tessuto connettivo fibroso, tranne per la presenza delle ultime vertebre caudali nel peduncolo caudale, ed entrambe sono caratterizzate da reti mirabili fondamentali per la

termoregolazione (Scholander e Schevill 1955, Rommel et al. 2006). La dorsale è assente in alcuni Odontoceti, come il lissodelfino (*Lissodelphis* spp.), il narvalo (*Monodon monoceros*) e il beluga (*Delphinapterus leucas*), oppure è sostituita da gibbosità, come nel capodoglio (*Physeter macrocephalus*). Analogamente, 2 famiglie di Mysticeti ne sono sprovviste: nei *Balaenidae* è del tutto assente, e negli *Eschrichtiidae* (di cui l'unico rappresentante è la balena grigia *Eschrichtius robustus*) è sostituita da gibbosità come nel capodoglio.

Il movimento propulsivo dei Cetacei è dovuto esclusivamente all'oscillazione verticale della pinna caudale, che viene azionata da una potente muscolatura, sia dorsale che ventrale, i cui tendini trovano inserzione su ambo i lati dei grandi processi spinosi vertebrali (Pabst 1993). Gli arti posteriori sono andati perduti, in quanto vivendo in acqua il corpo è sorretto dalla spinta idrostatica, ed essi non sono più necessari per lo scaricamento a terra del peso corporeo. Rimangono solo delle vestigia del cinto pelvico (ossa coxali) situate in profondità nella parete ventrale, che nei maschi sono associate alla muscolatura dell'apparato riproduttore; in alcuni Mysticeti s'individuano anche dei rudimenti del femore (Lande 1978).

L'apparato scheletrico ha subito numerose altre modificazioni frutto dell'adattamento alla vita acquatica, a cominciare dai caratteri istologici. Tutte le ossa sono prevalentemente di tipo spugnoso, con una matrice ossea fittamente intrecciata, che aumenta la resistenza alle sollecitazioni. Hanno un elevato contenuto di lipidi negli spazi trabecolari, il che diminuisce il peso specifico e migliora l'assetto idrostatico, e le ossa lunghe hanno una cavità midollare molto ridotta, a differenza dei mammiferi terrestri. A partire dalla nascita comincia un processo di erosione dell'osso corticale periferico, cosicché si formano due componenti ossee spugnose: una più centrale a forma di clessidra, e una più compatta in posizione periferica e mediana della diafisi. Il fenomeno continua per tutta la vita dell'animale, è di tipo osteoporotico ma non patologico, e si verifica anche nei Sirenni, completamente acquatici come i Cetacei (Gray et al. 2007).

La colonna vertebrale, profondamente trasformata, non presenta cifosi e lordosi ma un'unica curvatura con convessità ventrale. Le regioni individuabili sono 4 e non 5: a causa dell'atrofia del cinto pelvico e degli arti posteriori manca infatti la regione sacrale. Le vertebre cervicali sono 7 come in tutti i Mammiferi ma, tranne il massiccio atlante, sono estremamente appiattite antero-posteriormente. Possono rimanere libere fra loro (come nei *Balaenopteridae*) o anchilosarsi tra loro in vario grado, fino alla fusione in un unico blocco (come nei *Balaenidae*). Tale regressione cervicale fa sì che non vi sia un collo riconoscibile esternamente, che sarebbe d'impedimento per l'idrodinamica del nuoto, ma in rari casi è dotato di mobilità, come nel beluga (*Delphinapterus leucas*). Le regioni toracica e lombare, con forma molto simile a prima vista, si

distinguono fra loro sia per l'articolazione delle vertebre toraciche con le costole, sia per il fatto che le spine neurali a partire dalla prima vertebra lombare (detta "anticlinale") sono inclinate rostralmente invece che caudalmente. La regione caudale invece, è distinguibile dalla lombare per la presenza di piccole ossa a forma di "Y" (emapofisi o *chevrone*s) con cui si articolano ventralmente le vertebre. Si viene a formare un canale emale, attraverso cui passano grandi vasi sanguigni organizzati in un sistema di scambio di calore controcorrente (Rommel et al. 2006). In assenza degli *chevrone*s, le caudali si distinguono dalle lombari per la presenza di due creste parallele (anziché una centrale) sull'aspetto ventrale del corpo vertebrale, che indica l'articolazione con le due creste dorsali delle emapofisi.

Le modificazioni dello scheletro più radicali riguardano però il cranio e l'apparato boccale, il base al quale sono distinti i due sottordini. Gli Odontoceti sono provvisti di denti conici, di forma uguale in tutte le regioni dell'arcata dentaria (dentatura omodonte) e con una sola generazione, mancando quindi i denti da latte (monofiodonti) (Hohn 2008). Nelle specie prevalentemente teutofaghe i denti sono andati perduti, ad eccezione di un paio residuo sulla mandibola (negli *Ziphiidae*), oppure spuntano solamente a maturità sessuale con funzione alimentare secondaria (in *P. macrocephalus*) (Heyning 1984). Nei Mysticeti i denti vengono abbozzati solo nell'embrione ma scompaiono precocemente durante lo sviluppo, ed al loro posto si formano nuove strutture dette fanoni. Questi sono lamelle cornee che si sviluppano da pliche della mucosa del palato, in senso perpendicolare all'asse longitudinale della bocca e in file parallele. Sono cheratinizzate ma elastiche, e dotate lungo il lato interno della bocca di una frangiatura che nel complesso forma un fitto setaccio che viene utilizzato per filtrare l'acqua e trattenere le prede, siano esse krill o pesci (Utrecht 1965).

Alcune ossa del cranio di entrambi i sottordini hanno subito un particolare fenomeno di telescopia, ovvero di allungamento anti-orbitale dello splancocranio e contemporaneamente di compressione del neurocranio, che si trova accorciato e allargato (Miller 1923). Il lungo rostro è formato da ossa mascellari, premaxillari, vomere e mandibola proiettati anteriormente, che racchiudono una cavità, nota come solco mesorostrale, riempita *in vivo* dall'omonima cartilagine. Il processo di allungamento si verifica durante lo sviluppo post-embriionale ed è interpretabile come una risposta adattativa per l'assunzione del cibo e per il nuoto. Può contribuire ad assumere una forma idrodinamica, ma soprattutto permette l'impianto di un numero elevato di denti o fanoni. Negli Odontoceti un rostro allungato è associato anche all'alloggiamento del melone (e dello spermaceti nei *Physeteridae*) sulla superficie superiore del rostro. A seguito della telescopia, oltre all'allungamento delle ossa del massiccio facciale si è verificata una sovrapposizione fra alcune di esse, con un cambiamento nella forma e nei rapporti relativi. Le ossa frontali si trovano

nascoste dagli ampi processi ascendenti dei mascellari e premaxillari che le ricoprono, e si espandono lateralmente a formare il tetto delle orbite. Le ossa parietali si sono spostate lateralmente e posteriormente e non costituiscono più la volta della scatola cranica come negli altri mammiferi; a supplire questa loro funzione vi sono un interparietale e un sovraoccipitale molto sviluppati, che contattano i margini posteriori dei frontali. Una delle conseguenze più importanti della telescopia riguarda il rimodellamento delle vie nasali, che si sviluppano in senso verticale e si trovano in posizione molto arretrata. Le aperture esterne delle narici si trovano sulla sommità del capo e rimangono separate nei Mysticeti, mentre negli Odontoceti si fondono in un unico sfiatatoio. Le ossa nasali hanno perso la loro funzione di protezione dorsale delle prime vie aeree e sono rimaste come vestigia, ospitate in apposite fosse dell'osso frontale. Negli Ziphiidae si trovano ancora relativamente sviluppate e contribuiscono alla formazione dell'ampio vertice del cranio. Le ossa temporali in quanto tali non esistono più, poiché i diversi centri di ossificazione che nei mammiferi terrestri vanno a costituire un unico osso, rimangono separati nei Cetacei, che quindi presentano un osso squamoso, un mastoideo e un timpano-periotico. Quest'ultimo in particolare è connesso al neurocranio da tessuto connettivo fibroso, e solo in alcuni Ziphiidae è anchilosato (Rommel et al. 2006).

Negli Odontoceti si osserva una curiosa asimmetria dell'aspetto esterno di alcune ossa del massiccio facciale, in misura diversa a seconda della specie ma presente in tutto il sottordine. Nei Mysticeti, sia fossili che viventi, non vi è invece traccia di asimmetria. Tipicamente si notano mascellari e premaxillari destri più sviluppati rispetto ai sinistri, e i passaggi nasali si trovano deviati verso sinistra; si pensa che questa particolarità sia collegata all'ecolocazione, al fine di evitare eventuali interferenze durante l'emissione sonora (Heyning 1989).

1.4.3 Caratteri morfologici, life history, distribuzione ed ecologia del tursiope

Il tursiope (*Tursiops truncatus*) è un odontocete della famiglia *Delphinidae*, ed è certamente il cetaceo più noto al grande pubblico e il più studiato dai cetologi. È una specie cosmopolita, presente nei mari di tutte le latitudini temperate e tropicali, e in diversi ecosistemi marini o salmastri, compresi estuari e rive dei fiumi. Si riconoscono forme costiere e forme pelagiche, distinguibili anche per alcuni aspetti esterni, come colorazione, taglia media, dimensioni del cranio e forma della pinna dorsale (Wells e Scott 2008). Questa varietà morfologica, nel corso degli anni, ha dato adito al riconoscimento di almeno 20 presunte specie (Hershkovitz 1966), ma l'unica altra vera specie del genere *Tursiops*, diversa geneticamente e morfologicamente è *T. aduncus*, riconosciuta da circa un decennio (Wang et al. 2000) e tipica del

bacino Indo–Pacifico. Il genere *Tursiops* ha la forma del cetaceo generalizzato, con corpo robusto, taglia media, colorazione grigio–nera dorsale e chiara ventrale, e una marcatura netta che separa il margine anteriore del melone dal resto del corto rostro. La pinna dorsale è moderatamente falcata e la lunghezza nell’adulto varia con la posizione geografica, compresa fra ca. 2.5 m e 3.8 m (Read et al. 1993). Gli ecotipi costieri dell’Atlantico ed alcune altre regioni tendono ad essere di dimensioni minori e colorazione più chiara di quelli pelagici, ma nel Pacifico orientale sono le forme pelagiche ad avere taglie minori e colorazione più scura. Si stima che la popolazione mondiale dei *T. truncatus* si aggiri intorno alle 600,000 unità (Wells e Scott 2008). La dieta è composta da una varietà di pesci e cefalopodi, ma sembra i tursiopi sembrano avere una preferenza per *Scombridae*, *Sciaenidae*, e *Mugilidae*. La maggior parte dei pesci di queste ultime due famiglie sono demersali o in grado di produrre suoni, e ciò le rende particolarmente facili da catturare per un tursiope, che scandaglia i fondali con il proprio sonar ed ecolocalizza le prede anche sotto la sabbia (Gannon et al. 2005). Le modalità di caccia dei tursiopi sono varie, possono essere condotte singolarmente o in gruppo, e in certi casi sono molto sofisticate, ad esempio creando muri di bolle per disorientare i banchi di pesci e catturarli più facilmente, oppure spingendoli a riva e raccogliendoli col rischio di rimanere spiaggiati essi stessi (Leatherwood 1975). Le tattiche di caccia vengono apprese generalmente dalla madre, ma anche attraverso l’imitazione di altri individui, con una trasmissione delle conoscenze sia verticale che orizzontale (Mann e Sargeant 2003).

L’areale di distribuzione del tursiope può avere un’ampia gamma di tipologie, e comprende migrazioni stagionali, stanzialità periodica, permanente o una combinazione di queste tre. Sono state riportati periodi di stanzialità per più di 30 anni, ad esempio lungo le coste orientali della Florida (Wells e Scott 1999), oppure migrazioni pelagiche di oltre 4200 km percorrendo fra 33 km e 89 km al giorno (Tanaka 1987). I gruppi sono composti da 2 a 15 individui, anche se sono stati documentati raggruppamenti di oltre 1000 esemplari (Scott e Chivers 1990), e di solito i gruppi di ecotipi costieri sono meno numerosi di quelli pelagici (Wells et al. 1999). All’interno del gruppo la composizione è variabile, ma in genere consta di gruppi di allevamento mamma–cucciolo, gruppi misti di giovanili e maschi adulti singoli o che formano coppie. Le femmine danno alla luce piccoli avuti da padri diversi, e non sono ancora stati documentati casi di coppie monogame stabili (Duffield e Wells 2002). All’interno del gruppo i rapporti gerarchici sono più forti tra i maschi, che vengono mantenuti attraverso sia scontri fisici che atteggiamenti posturali (Parsons et al. 2003). I tursiopi sono generalmente attivi sia di notte che di giorno, intervallando periodi di caccia, movimento, interazioni sociali e riposo (Wells et al. 1999b).

Attraverso l'analisi degli strati di crescita di dentina, è stato calcolato che l'età massima delle femmine è superiore ai 57 anni, mentre per i maschi è intorno ai 48 (Wells e Scott 1999). La lunghezza alla nascita varia fra 84 cm e 140 cm, a seconda degli ecotipi, e nascono dopo una gestazione di circa 12 mesi (Perrin e Reilly 1984). La maturità sessuale è più precoce nelle femmine, ed avviene fra i 5 e i 13 anni, mentre per i maschi è fra i 9 e i 14 anni. La stagionalità riproduttiva è piuttosto flessibile, e in genere si osservano picchi di nascite nei mesi primaverili ed estivi (Thayer et al. 2003). Le femmine sono ovulatrici spontanee e sporadiche, con più ovulazioni possibili durante una data stagione, mentre i maschi mostrano picchi di testosterone circolante per diversi mesi, in modo da sovrapporsi ai periodi di fertilità delle diverse femmine (Wells e Scott 1999).

In natura, la principale minaccia è la predazione che può avvenire da alcune specie di squali, ma anche occasionalmente da orche (*Orcinus orca*), membri della stessa famiglia *Delphinidae*. Fino al 50% degli esemplari avvistati in natura portano sul corpo i segni dei morsi di squalo, soprattutto ventralmente e posteriormente, in quanto molti di essi tendono imboscate arrivando da sotto o da dietro (Wood et al. 1970). In alcune zone un tasso di mortalità relativamente elevato è dovuto alla puntura da parte di razze, che feriscono con l'aculeo esternamente o internamente se ingerite di piccola taglia, e provocano intossicazioni e infezioni fatali (Walsh et al. 1988). In casi meno frequenti la morte può essere provocata anche da tossine algali, ma rimane l'uomo la principale minaccia per questa specie. Le cause sono molteplici e possono essere indirette come l'inquinamento chimico o acustico, o dirette come la cattura accidentale nelle reti, l'ingestione di attrezzature da pesca, la collisione coi natanti e soprattutto la caccia con arpioni o tramite la tristemente nota pratica del *drive fishery* (Wells e Scott 1999).

1.4.4 Ghiandola pineale nei Cetacei e in altri mammiferi marini

La presenza di una ghiandola pineale (o *epiphysis cerebri*) nell'encefalo dei Cetacei è al centro di un dibattito che si protrae sin dalla fine del XIX secolo, e che tutt'ora è lungi dal giungere ad una conclusione definitiva. La prima osservazione nota della pineale in un cetaceo risale al 1889, da parte di Kükenthal e Ziehen, nell'iperodonte boreale *Hyperoodon ampullatus* (Ziphiidae) e nel beluga *Delphinapterus leucas* (Delphinidae). Le dimensioni della ghiandola riportate sembrano molto ridotte, con una lunghezza di 6 mm nell'iperodonte, e una larghezza di 2 mm e un'altezza di 9 mm nel beluga, anche se non si conosce l'età degli esemplari in questione. Gersch (1938) ha descritto la pineale in 6 esemplari adulti (lunghezza totale 12.2–14.3 m) di megattera (*Megaptera novaeangliae*), studiandola anche dal punto di vista istologico, e

osservando le stesse caratteristiche di quella umana e bovina. Le ghiandole erano lunghe 14–18 mm, alte 8–11 mm e larghe 7.5–10 mm, non molto più grandi di quanto riportato da Kükenthal e Ziehen (1889). Anche nella focena comune (*Phocoena phocoena*) Behrman (1990) ha caratterizzato dal punto istologico la ghiandola pineale, trovata in un giovane esemplare maschio, la quale durante la separazione degli emisferi sarebbe rimasta integra sul lato sinistro. Purtroppo Behrman non ha eseguito alcuna tecnica immunohistochimica specifica sul suo campione, ad esempio per la melatonina o per gli enzimi che la sintetizzano, perciò rimane da verificare la bontà delle sue osservazioni. Nel capodoglio (*Physeter macrocephalus*) la pineale è stata osservata sia nell'adulto (Ries e Langworthy 1937) che nel feto (Oelschlager e Kemp 1998), e Fuse (1936) in un esemplare di neofocena (*Neophocoena phocoenoides*) riporta la presenza di un ghiandola, definita rudimentale. In alcune specie l'epifisi non è stata mai osservata, come per il platanistide *Inia geoffrensis* (Gruenberger 1970), nel lagenorinco dai denti obliqui (*Lagenorhynchus obliquidens*) e nella stenella da lungo rostro (*Stenella longirostris*) (Arvy 1971). Nel narvalo (*Monodon monoceros*) la pineale apparentemente manca sin dallo stadio fetale (Holzman 1991), mentre nel capodoglio nano *Kogia sima* (Oelschlager et al. 2010) e nel delfino comune *Delphinus delphis* (Oelschlager et al. 2008) nemmeno l'analisi con risonanza magnetica tridimensionale (3D MRI) ne ha rivelato la presenza in esemplari adulti.

Per altre specie ancora, paradossalmente, alcuni studi riportano la presenza della ghiandola pineale, mentre altri su individui conspecifici non riescono a individuarla. Come già citato, Gersch (1938) descrive la ghiandola nella megattera, ma sia Breathnach (1990) che Pilleri (1966b) dichiarano che era assente negli encefali della stessa specie da loro esaminati. Nella balenottera boreale (*Balaenoptera borealis*) Pilleri (1966a) descrive la pineale come strettamente legata al plesso corioideo sotto lo splenio del corpo calloso, ma Arvy (1971) la reputa mancante. Curiosamente, Duffield et al. (1992) ha esaminato l'encefalo di 11 esemplari di *Balena mysticetus* catturati dagli Eschimesi dell'Alaska, ed ha ritrovato l'epifisi solamente in un esemplare. Nella balenottera azzurra (*Balaenoptera musculus*) la ghiandola pineale non è stata trovata in esemplari adulti da Pilleri et al. (1965), mentre Jansen e Jansen (1969) ne riportano la presenza in un feto. Il tursiope (*T. truncatus*) rappresenta un altro caso emblematico. Ridgway (1990) afferma di non aver mai trovato la pineale negli encefali da lui esaminati, come pure McFarland et al. (1969), che sottolineano anche l'assenza di un recesso pineale nei loro campioni. Al contrario, Morgane e Jacobs (1972) riportano la presenza dell'epifisi nell'adulto, e recentemente è stata pubblicata per la prima volta un'immagine inconfondibile di una ghiandola pineale *in situ* in una femmina gravida (Lyamin et al. 2008), anche se non è stata eseguita un'indagine istologica per chiarire la natura di quella formazione. Gli autori sottolineano che l'esemplare in questione era stato gravido

per dodici mesi prima della morte, perciò il rinvenimento di una pineale, da loro considerata di grandi dimensioni (larghezza massima ca. 6 mm), sarebbe da attribuire allo stato di gravidanza. L'aumento della massa della pineale durante la gestazione è stato provato ad esempio nel pipistrello *Cynopterus sphinx* (Haldar et al. 2006) e nello scoiattolo *Funambulus pennanti* (Bishnupuri e Haldar 2000), ma la ghiandola non scompare (o compare) mai del tutto dopo il parto.

Tra i mammiferi marini, l'ordine dei Sirenii, mostra alcune analogie con la situazione nei Cetacei, con cui condivide l'adattamento ad una vita completamente acquatica. Nel dugongo (*Dugong dugon*) la ghiandola pineale non è stata osservata (Dexler 1912). Nel lamantino (*Trichechus manatus*) invece, Chapman (1975) afferma di averla individuata, mentre Ralph et al. (1985) nella stessa specie non trova traccia nemmeno a livello istologico della presenza di tessuto pineale in corrispondenza di un apparente recesso pineale. Nell'ordine dei Pinnipedi invece, la pineale ha un'altra particolarità, ovvero raggiunge dimensioni eccezionali in feti e neonati, maggiori di ogni altro mammifero, in genere poi riducendosi nell'adulto. Oltre alle dimensioni, l'altra particolarità è che la ghiandola si trova già attiva in fase perinatale, mentre nella maggior parte dei mammiferi nasce abbozzata e non funzionale, per attivarsi attorno ad un'età specie-specifica (Reiter 1988). Già Turner (1888) descrive la ghiandola in due giovani esemplari di tricheco (Odobenidae, *Odobenus rosmarus*), riportando una lunghezza di ben 3 cm ($\frac{1}{4}$ della lunghezza totale dell'encefalo) e una larghezza di 1.3–1.8 cm. Dimensioni molto simili sono state riportate nella foca di Weddell (Phocidae, *Leptonychotes weddelli*), in cui i neonati possiedono una ghiandola pineale di ca. 3.5 g, ben 7 volte superiore al peso nelle femmine adulte (Cuello e Tramezzani 1969, Bryden et al. 1986). In altre specie la ghiandola ha dimensioni assolute minori, ma rimane maggiore nei neonati rispetto agli adulti, come nella foca della Groenlandia (Phocidae, *Pagophilus groenlandicus*) nella foca dalla cresta (Phocidae, *Cystophora cristata*) (Aarseth e Stokkan 2003) o nell'elefante marino del Sud (Phocidae, *Mirounga leonina*) (Bryden et al. 1986). Recentemente anche nell'otaria della California (Otariidae, *Zalophus californianus*) è stata osservata l'eccezionale dimensione della ghiandola, anche in relazione alle altre formazioni encefaliche, grazie alla risonanza magnetica (Montie et al. 2009). Come termine di paragone, nell'uomo le dimensioni medie dell'epifisi sono 5–9 mm di lunghezza, 1–5 mm di larghezza e 3–5 mm di altezza, con un peso medio di 150 mg (Macchi e Bruce 2004). È evidente la sproporzione con il caso dei Pinnipedi, mentre le dimensioni sono appena inferiori rispetto ai pochi casi documentati fra i Cetacei, sopra citati (Gesrch 1938, Kükenthal e Ziehen 1889, Lyamin et al. 2008).

Una pineale così grande ed attiva nei cuccioli di pinnipedi, con livelli circolanti di melatonina superiori a 4000 pg/ml (Little e Bryden 1990, Bryden et al. 1994), è stata a lungo considerata come un meccanismo protettivo rispetto alle condizioni ambientali estreme che i neonati si trovano ad affrontare alle alte latitudini. Senza un sufficiente spessore del grasso sottocutaneo, per generare il calore necessario la melatonina sovrastimolerebbe l'attività metabolica, attraverso l'attivazione della tiroide. In realtà, dimensioni della pineale e livelli di melatonina simili si riscontrano in specie di latitudini inferiori a quelle polari, e l'effetto termogenico rimane ancora da dimostrare (Aarseth e Stokkan 2003). Un'altra teoria riguarda invece le condizioni fisiologiche che vivrebbe il feto durante le immersioni della madre. Dopo apnee prolungate infatti, l'apporto di ossigeno con l'inspirazione della madre potrebbe generare molte specie reattive (ROS) e radicali liberi, dannose soprattutto per il feto, particolarmente sensibile. Date le riconosciute proprietà antiossidanti della melatonina, le elevate concentrazioni sanguigne del feto aiuterebbero a smaltire i radicali proteggendolo dal danno ossidativo (Tan et al. 2005).

1.4.5 Retina

La retina dei Cetacei è composta dagli stessi strati che si trovano in tutti gli altri mammiferi. Procedendo in senso centripeto, si trovano l'epitelio pigmentato della retina (RPE), lo strato dei fotorecettori, lo strato plessiforme esterno (OPL), lo strato interno dei nuclei (INL), lo strato plessiforme interno (INL), lo strato delle cellule gangliari (GL) e lo strato delle fibre nervose (FL). L'RPE è la parte non nervosa, costituita da un epitelio monostratificato che possiede granuli di melanina, ed ha la funzione di proteggere dal *bleaching* i pigmenti dei fotorecettori, oltre che di fagocitare i dischi dei loro segmenti esterni che man mano vengono eliminati apicalmente. Lo strato dei fotorecettori è composto da bastoncelli (sensibili a basse intensità luminose) e da coni (sensibili ad intensità più elevate e responsabili della visione dei colori), ed a sua volta si suddivide nello strato dei segmenti esterni (che contengono i dischi ricchi di opsine) e nello strato esterno dei nuclei (ONL) che contiene i pirenofori dei fotorecettori. Nell'INL si trovano i corpi di almeno 4 tipi cellulari: le cellule bipolari, le cellule orizzontali, le cellule amacrine e le cellule di Müller. Le bipolari sono il neurone di secondo ordine della via ottica, e fanno da ponte fra i fotorecettori e le cellule gangliari. Le cellule orizzontali, come suggerisce il nome, creano sinapsi laterali fra i fotorecettori, integrando i loro output, e si distribuiscono verso l'esterno dell'INL. Le cellule amacrine svolgono una funzione quasi speculare, distribuendosi sul lato interno dell'INL, creando sinapsi fra più neuroni gangliari orizzontalmente. Le cellule di

Müller sono le più abbondanti nell'INL e occupano la porzione centrale. Sono cellule della glia, quindi non nervose, ed hanno funzione di sostegno e protezione dei corpi cellulari e delle proiezioni dei neuroni bipolari, cellule orizzontali e amacrine. Le cellule gangliari sono il terzo neurone della via visiva, i cui assoni formano lo strato delle fibre, che convergono a formare il nervo ottico.

La retina del tursiope, e dei Cetacei in genere, possiede diverse caratteristiche peculiari che la distingue dalla maggior parte dei mammiferi terrestri, a cominciare dallo spessore marcatamente maggiore (370 – 425 μm) rispetto a loro (110 – 240 μm) (Mass e Supin 1995). Immediatamente dietro la retina si trova un esteso tappeto lucido formato da fibrille collagene, il quale si trova in molti mammiferi notturni ed ha la funzione di riflettere la luce verso i fotorecettori, massimizzando la quantità di radiazione luminosa percepita dalla retina in condizioni di basse intensità. Il *tapetum* occupa l'intero *fundus oculi* (la porzione di retina opposta al polo anteriore del bulbo oculare), e in corrispondenza di esso, l'RPE non è pigmentato, altrimenti impedirebbe il passaggio di luce e la sua riflessione. Il pigmento invece si trova alla periferia della retina, in una zona che si può considerare cieca (Dral 1977). La vascolarizzazione degli strati interni del fondo dell'occhio nel tursiope è fornita in genere una dozzina di diramazioni dell'arteria centrale che emerge dal disco ottico. Di solito la distribuzione dei vasi rivela un'area apparentemente non vascolarizzata, che corrisponde a quella di maggior acuità visiva, come la fovea nei primati. Nel tursiope a lungo non è stata osservata, mentre Dral (1975) ne ha identificate due, una nel quadrante ventro-temporale e una in quello naso-dorsale. La composizione dei fotorecettori nel tursiope è quella tipica di mammiferi notturni, con un'abbondanza di coni pari all'1–2% del totale, osservati da Dral (1977) soprattutto alla periferia della retina, anche in coniglio e ratto. I nuclei dei bastoncelli formano pile di 7–9 unità a diverse altezze nell'ONL, mentre i coni si trovano singoli al confine con lo strato dei segmenti esterni. I due fotorecettori possono essere distinti fra loro per l'aspetto del loro nucleo, che nei coni presenta cromatina dispersa finemente con piccoli granuli, mentre nei bastoncelli è condensata in 3–4 grossi granuli. Per molto tempo non è stato chiaro se i cetacei fossero in grado di vedere i colori, ma recentemente è stato dimostrato che il tursiope possiede solo un tipo di cono, dotato di opsina S, con sensibilità massima intorno ai 525 nm, spostato verso il blu rispetto alla stessa opsina di molti mammiferi terrestri (Jacobs 1993). La visione è quindi monocromatica nel blu-verde, a differenza della maggior parte dei mammiferi in cui è dicromatica, grazie alla presenza di opsina L.

Le cellule orizzontali hanno corpo cellulare molto grande (fino a 30 μm), e in sezioni tangenziali dell'INL formano dei grandi buchi intorno ai quali si ammassano i nuclei delle altre

cellule, principalmente quelle di Müller e dei neuroni bipolari. Le cellule amacrine, come le orizzontali, sono in numero relativamente basso, e la loro funzione non è ancora del tutto chiara. È stato ipotizzato che siano in grado di condurre impulsi antidromicamente dalle cellule gangliari ai fotorecettori (Duke–Elder 1961).

La peculiarità principale della retina nel tursiope, come nella maggior parte dei Cetacei, è la presenza di neuroni gangliari giganti. Esistono due classi dimensionali, analogamente a quanto osservato in antilope, leone marino, maiale, elefante, orso e volpe (Dral 1977), ma nel tursiope quelle di dimensioni maggiori superano quelle massime degli altri mammiferi. Le cellule gangliari di tipo I (GL1) hanno forma ovale, diametro fino a 75–80 μm nucleo chiaro fino a 15 μm di diametro e una fine sostanza di Niessl nel citoplasma. Le gangliari di tipo II (GL2) hanno invece forma stellata o angolata, diametro intorno a 25–35 μm , con nucleo e citoplasma scuri e densa sostanza di Nissl. Esistono poi cellule gangliari con caratteri intermedi, che vengono considerati per lo più sottoforme del tipo I; una particolare variante del tipo II invece è spesso vista circondare quelle di tipo I. La distribuzione della densità di cellule gangliari, piuttosto che quella dei fotorecettori, riflette l'acuità visiva di ogni regione della retina. Una maggiore densità indica la necessità di raccogliere e integrare informazioni più dettagliate dalla luce che colpisce un determinato settore (Hughes 1977). Le gangliari giganti sono più abbondanti alla periferia della retina, mentre quelle di tipo II verso il centro; complessivamente, la loro distribuzione determina due regioni con un picco di densità, caso unico fra i mammiferi. Generalmente infatti quelli con occhi frontali hanno il picco di densità in un'*area centralis* o una fovea (Rapaport e Stone 1984), mentre quelli con occhi laterali presentano una sottile banda centrale detta "striscia visiva" (*visual streak*) (Shinozaki et al. 2010). Sono possibili anche casi intermedi (Mowat et al. 2008) ma i Cetacei sono gli unici a possedere due aree con picchi marcati di densità massima (700–800 cellule/mm²), l'*area centralis*, in posizione naso–ventrale, e l'*area temporalis*, temporo–dorsale. La distanza fra le due aree, di circa 31–32 mm corrisponde a un campo visivo dell'ampiezza di 50–55°. L'area centrale riceve la luce che proviene dal basso, mentre quella temporale dai lati; osservazioni del comportamento del tursiope rivelano che l'area centrale viene utilizzata prevalentemente per la visione aerea, mentre quella temporale per quella acquatica (Supin et al. 2001). Questo utilizzo bimodale potrebbe compensare la limitata mobilità del collo, ed è sottolineato dalla morfologia della pupilla, che viene chiusa da un lembo dell'iride assumendo una forma a fessura con due fori laterali (Mass e Supin 2008).

Il significato di cellule gangliari così grandi però rimane ancora da delucidare. Corpi cellulari e assoni di grandi dimensioni, in animali di grandi dimensioni come i Mysticeti, potrebbero servire ad una trasmissione particolarmente rapida del potenziale d'azione. Tuttavia

nell'elefante le gangliari non superano i 30 μm (Mass e Supin 2008), e certamente il tursiope non è di grande dimensioni. Anche gli assoni hanno diametro ($>15 \mu\text{m}$) superiore a quello della maggior parte dei mammiferi (ca. 8 μm). Il nervo ottico nel tursiope ha un diametro maggiore e una densità di fibre minore ($<50,000 \text{ mm}^2$) rispetto ad esempio al macaco ($>200,000 \text{ mm}^2$), ma il numero totale di fibre rimane sostanzialmente simile (150,000–180,000). Il rapporto di somministrazione, definito come il numero totale di fotorecettori collegati con una singola cellula gangliare, nel tursiope è stato calcolato essere di 800:1 (Dral 1977).

1.4.6 Intestino

L'intestino del tursiope generalmente presenta le stesse caratteristiche istologiche della maggior parte dei mammiferi. Esternamente non è però riconoscibile una distinzione fra intestino tenue e crasso, tranne per un leggero aumento di diametro, ed inoltre manca un cieco (Green 1972). In esemplari di *Tursiops*, *Stenella*, e *Delphinus* con lunghezza totale del corpo tra 1.6 e 2.3 m, la lunghezza totale dell'intestino variava fra 8.8 e 16.5 m (Harrison et al. 1977). Il duodeno è presente, ma manca una differenziazione istologica anche fra digiuno ed ileo. L'analisi al microscopio ottico rivela che la mucosa manca di villi ben sviluppati, ma l'epitelio assorbente ha un orletto a spazzola ben formato. I villi sono intervallati dalle cripte di Lieberkühn, sul cui fondo ricorrono frequentemente cellule di Paneth, in gruppi di 1–3 unità, che contattano il lume. Al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) appaiono dotate di molti grandi granuli elettrondensi che occupano gran parte del volume cellulare. Molto meno frequenti sono invece le cellule enteroendocrine o enterocromaffini (EC), con forma ovale o triangolare, molti piccoli granuli elettrondensi a ridosso della lamina basale ma in grado di raggiungere anche il lume, sul cui lato possiedono microvilli irregolari. Lungo i lati dei villi e soprattutto sul fondo delle cripte, vi sono numerose cellule caliciformi mucipare e cellule indifferenziate, che maturano microvilli e vanno a formare nuovi enterociti che migrano gradualmente verso l'apice del villo.

1.4.7 Ghiandola di Harder

La ghiandola di Harder è una ghiandola lacrimale specializzata, generalmente associata alla membrana nittitante mediana dell'occhio, sulla cui superficie si apre il dotto escretore principale. Essa è presente nella maggior parte dei vertebrati terrestri, compresi anfibi anuri, rettili, pesci e uccelli, ma è assente ad esempio in pesci, anfibi urodela, pipistrelli, bovini, cavalli, carnivori e

primati, compreso l'uomo. Tra i mammiferi appare particolarmente sviluppata in roditori e lagomorfi e nei cetacei in quanto forme secondariamente acquatiche (Payne 1994).

Si trova posteriormente al bulbo oculare, è bilobata e di tipo tubulo-alveolare. La sua funzione rimane per molti versi ancora misteriosa e su di essa sono state formulate svariate ipotesi, in primis quella di fungere da fototrasduttore extra-retinico per regolare i ritmi circadiani, grazie anche alla produzione di melatonina (Pevet et al., 1984; Hoffman et al., 1985; Ortiz et al., 1994). Altre funzioni ipotetiche includono quelle di produrre una risposta immunitaria per proteggere la congiuntiva (Burns 1979), di secernere sale (Chieffi et al. 1996), e di produrre secrezioni fotoprotettive (Spike et al. 1992). Nel tursiope, la ghiandola secerne un abbondante secreto sieromucoso, e l'osservazione diretta ha rivelato il mantenimento di un film lacrimale che protegge la cornea anche sott'acqua. I tipi di secreto della ghiandola di Harder sono genericamente tre: lipidi, porfirine e melatonina (Payne 1994). Nei mammiferi finora studiati, i lipidi sembrano la secrezione maggiore, e possono arrivare a costituire fino al 35% del peso della ghiandola (Watanabe 1980). La funzione principale di una così abbondante secrezione lipidica è probabilmente quella di lubrificante per congiuntiva e cornea, ma è stata messa in relazione anche con la capacità di solvente per feromoni (Sakai 1981) o fattori di crescita (Yokoyama et al. 1989). Nel tursiope la secrezione lipidica lubrifica e probabilmente protegge la cornea dall'acqua salata e da eventuale particolato e riduce l'attrito con l'acqua (Waller e Harrison 1978).

Le porfirine sono dei composti eterociclici derivanti dal pirrolo, e fanno parte integrante di molti enzimi (come i citocromi) e proteine (come l'emoglobina) grazie alla loro capacità chelante di molti metalli. Nella ghiandola di Harder, una volta escrete formano spesso concrezioni solide intra-luminali a strati concentrici. Il loro ruolo rimane ancora poco chiaro, ma grazie alla loro capacità di assorbire gli ultravioletti (UV) è molto probabile che svolgano una funzione protettiva della congiuntiva, schermando la radiazione UV in grado di danneggiare il DNA (Payne 1994). Una volta assorbiti gli UV, le porfirine emettono radiazione visibile nel rosso, e ciò le rende indirettamente individuabili in un preparato istologico illuminato con ultravioletti (Wetterberg et al. 1971). Anche le sezioni di ghiandola del tursiope mostrano questa autofluorescenza rossa, perciò è probabile che anche in questa specie vengano prodotte porfirine (Ortiz et al. 2007). La melatonina, come già descritto, possiede buone proprietà antiossidanti, e la sua secrezione esocrina da parte della ghiandola di Harder ha probabilmente il compito principale di smaltire di radicali, che vengono prodotti dalle porfirine ossidate dagli UV (Reiter et al. 1995).

La ghiandola di Harder ha una struttura con caratteristiche intermedie fra quelle di una ghiandola lacrimale e della ghiandola di Harder di altri mammiferi, che di solito ha un sistema di dotti poco sviluppato (Payne 1994). È suddivisa da setti connettivali in lobuli, contenenti un

numero variabile di unità secernenti o acini, con epitelio composto di cellule piramidali contenenti molti granuli. Nel tursiope ne esistono di tre ordini di dotti: quelli che hanno origine dal lume dell'acino secretorio (III ordine), quelli inter-acinari (II ordine) e quelli inter-lobulari (I ordine). Le cellule secretorie sono state suddivise da Ortiz et al. (2007) in due tipi principali, soprattutto in base al tipo di vescicole secretorie osservate al TEM. Le cellule di tipo I hanno nucleo basale, e con profonde indentazioni, e sono a loro volta suddivise in tre sottotipi in base a tipo e numero di vescicole secretorie. Il sottotipo I ne ha poche, sia chiare che scure, poste all'apice, con Golgi sviluppato, molti mitocondri e reticolo endoplasmatico (RE); il sottotipo II ha organelli molto meno sviluppati, vescicole più centrali e alcune piccole vescicole elettrondense; il sottotipo III ha il citoplasma occupato quasi interamente di vescicole e pochi organelli. Questo fa supporre che in realtà questi sottotipi rappresentino stadi successivi di maturazione delle cellule di tipo I. Le cellule di tipo II invece hanno nucleo tondo/ovale e vescicole con frequente nucleo denso. A seconda che producano poche vescicole diffuse o molte vescicole con organelli fra esse, vengono riconosciuti un sottotipo chiaro e scuro, rispettivamente. Attualmente è impossibile associare un tipo o un sottotipo cellulare a uno dei secreti della ghiandola di Harder. Al confine fra le cellule epiteliali e la sottostante lamina basale si trovano cellule mioepiteliali di aspetto stellato, che hanno funzione di contrarre i dotti ghiandolari e facilitare la secrezione.

2. SCOPO DELLA TESI

Data la presenza di dati discordanti sulla presenza della ghiandola pineale nei Cetacei e in particolare nel tursiope, il primo obiettivo principale di questo elaborato è di ricercare la presenza della ghiandola in un numero sufficientemente elevato di encefali di questa specie. Poiché inoltre in letteratura non è stata mai documentata la secrezione di melatonina in *Tursiops truncatus*, il secondo obiettivo è quello di quantificare i livelli plasmatici di melatonina e di analizzarne le possibili variazioni giornaliere e stagionali. Come terzo ed ultimo obiettivo, investigherò la produzione di melatonina extrapineale dal punto di vista istochimico, biomolecolare e con l'utilizzo di colture cellulari di cute.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni di encefalo di tursiope

La Banca dei Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo (MMMTB, <http://www.mammiferimarini.sperivet.unipd.it/eng/comefunziona/index.htm>), ospitata dalla Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova, raccoglie più di 2500 campioni provenienti sia da animali spiaggiati che da ambiente controllato. Fra di essi, sono conservati oltre 40 encefali, di cui 29 appartenenti ad esemplari di tursiope. Ogni encefalo, una volta estratto dal cranio, viene tenuto a secco a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per almeno 90 minuti per facilitarne il consolidamento. Successivamente viene tagliato in sezioni coronali spesse ca. 1 cm con affettatrice o cefalotomo e conservato in formalina al 10% in PBS pH 7.0 a temperatura ambiente (RT). Le sezioni degli encefali di tursiope sono state esaminate macroscopicamente per individuare eventuali formazioni nell'area epitalamica identificabili come ghiandole pineali. In caso di riscontro positivo, il campione sarebbe stato immerso *overnight* in H_2O corrente per eliminare l'eccesso di formalina e immerso in soluzioni crioprotettive di saccarosio in PBS pH 7.4 a concentrazioni crescenti (0%, 7.5%, 15% e 30%) per 2 h ciascuna. Successivamente il campione sarebbe stato immerso in isopentano mantenuto fra i -20 e i $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ tramite azoto liquido e stoccato alla stessa temperatura prima del taglio al criostato.

3.2 Campioni di ghiandola pineale bovina

Le ghiandole pineali di tre esemplari di bovino (*Bos taurus*) sono stati prelevati da esemplari giunti presso la Sala Necroscopie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova per l'esame autoptico. Due ghiandole sono state trattate con soluzione crioprotettiva come descritto nel paragrafo precedente, una per l'esame istologico con taglio al criostato e una per Western Blot. La pineale rimanente è stata lavata dall'eccesso di sangue con PBS pH 7.4 e conservata in 10 volumi di RNAlater (Qiagen) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per le successive indagini biomolecolari.

3.3 Quantificazione melatonina

3.3.1 Radioimmunosaggio (RIA)

La concentrazione di melatonina nel plasma è stata determinata grazie ad un kit per radioimmunosaggio (RE29301, IBL International), validato per l'uso in diagnostica umana su

campioni sia di sangue che di saliva, senza bisogno di estrazione preventiva. Per ogni campione è stata utilizzata un'aliquota di 200 µl in duplicato per ogni saggio, impostando come valore di sensibilità una concentrazione pari a 2.5 pg/ml. Essendo il kit validato per l'uso nell'uomo, la validazione per i campioni di delfino è stata eseguita mediante un test di diluizione (o parallelismo) e un test di recupero. Nel primo caso i campioni del gruppo C sono stati impiegati tal quali e diluiti 1:2, 1:4 e 1:8, plottando il valore di concentrazione con l'inverso del rispettivo fattore di diluizione. Nel secondo caso, fra i campioni dei gruppi A e B ne è stato scelto uno con sufficiente volume residuo, a cui sono state poi aggiunte aliquote di standards di melatonina a concentrazione nota, forniti dal kit (rispettivamente 7.5 pg/ml, 75 pg/ml e 750 pg/ml), plottando poi i valori attesi con i valori osservati. Il coefficiente di variazione (CV) inter-assay calcolato variava fra 3.2% e 5.8%, mentre il CV intra-assay era 10.8%.

3.3.2 Gruppi sperimentali e disegno di campionamento

Per testare preliminarmente il funzionamento del kit RIA RE29301 (IBL International) sono stati prelevati dei campioni di sangue da quattro esemplari di tursiope, detenuti presso il delfinario C (latitudine 45° 27' N) fra Giugno 2008 e Febbraio 2009, alle ore 10:00. Un totale di nove campioni sono stati raccolti durante i prelievi effettuati dallo staff veterinario per i controlli sanitari di routine. Per la sperimentazione vera e propria sono stati coinvolti due gruppi di tursiopi mantenuti in due delfinari distinti, A (latitudine 41° 37' N; n=4) e B (latitudine 37° 07' N; n=8) (Tab. 3.1).

Tabella 3.1. Elenco degli esemplari con codice identificativo, sesso ed età.

	SESSO	ETA'
Gruppo A		
RM1	M	17
RM2	M	11
RM3	M	10
RM4	F	7
Gruppo B		
PT1	F	27
PT2	M	49
PT3	M	14
PT4	F	31
PT5	F	41
PT6	F	13
PT7	F	13
PT8	F	10

F, femmina; M, maschio

Il disegno di campionamento è stato impostato in modo leggermente diverso per le due strutture, a causa della diversa disponibilità temporale degli staff veterinari e della necessità di coordinare e integrare lo sforzo di campionamento con le ordinarie attività di controllo sanitario. Per la valutazione di fluttuazioni stagionali nei livelli di melatonina un campione di sangue è stato prelevato da ogni esemplare intorno alle 10:00 durante la prima settimana di ogni mese, per un totale di 7 mesi (da Dicembre 2008 a Giugno 2009 per il gruppo A, da Febbraio ad Agosto 2009 per il gruppo B) (Tab. 3.2).

Tabella 3.2. Rappresentazione schematica del disegno di campionamento. I, II e III = giorni consecutivi, a.m. = prelievi del mattino, p.m. = prelievi pomeridiani, sett. = settimana.

		DIC	GEN	FEB	MAR	APR	MAG	GIU	LUG	AGO	
Gruppo A	1° sett.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.			
	2° sett.	I	II	III				I	II	III	
		a.m.	a.m.	a.m.				a.m.	a.m.	a.m.	
		p.m.	p.m.	p.m.				p.m.	p.m.	p.m.	
Gruppo B	1° sett.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	a.m.	
	2° sett.	I	II							I	II
		a.m.	a.m.							a.m.	a.m.
		p.m.	p.m.							p.m.	p.m.

Per valutare variazioni giornaliere, sono stati prelevati due campioni alle 10:00 e alle 17:00 circa, per tre giorni consecutivi durante la seconda settimana di Dicembre e Giugno per il gruppo A, e per 2 giorni consecutivi durante la prima settimana di Febbraio e Agosto per il gruppo B (Tab. 3.2). Ogni prelievo è stato eseguito in *vacutainer* con EDTA, dai vasi superficiali della faccia ventrale della pinna caudale, offerta volontariamente dagli esemplari appositamente addestrati. Il plasma è stato separato per centrifugazione a 2800 g (3500 rpm) per 20 minuti e congelato a -20 °C fino al successivo utilizzo.

3.3.3 Etica della sperimentazione

Tutti i campioni di sangue di tursiope sono stati raccolti durante le normali pratiche di allevamento e allenamento, che rispettano la Direttiva UE 1999/22/CE che disciplina il mantenimento di animali selvatici in cattività (<http://eur-lex.europa.eu>), oltre che gli standard della European Association for Aquatic Mammals (EAAM) riguardanti le strutture che ospitano tursiopi (http://www.eaam.org/jdownloads/Documents%20and%20Guidelines/eaam_standards_and_guideli

[nes for the management of bottlenose dolphins under human care sept 2009.pdf](#)). I campioni di ghiandola pineale di bovino sono stati prelevati da animali trattati in accordo alla Direttiva 86/609/EEC inerente il benessere animale durante il processo di macellazione.

3.3.4 Statistica

Per valutare variazioni significative nell'andamento dei valori medi di ogni mese, separatamente per le due località, è stata utilizzata un'ANOVA ad una via (One-way ANOVA) con test *post hoc* di Tukey. Due diversi Modelli Lineari Generalizzati (GLM), ancora con test *post hoc* di Tukey, sono poi stati impiegati come segue: il primo, per confrontare le medie dei mesi in comune fra le due località (da Febbraio a Giugno), col fattore "mese" nidificato nel fattore "luogo"; il secondo, per confrontare le medie tra i valori mattutini e pomeridiani di ogni esemplare (col fattore "nome esemplare" nidificato nel fattore "periodo del giorno" a sua volta nidificato nel fattore "mese") e secondariamente considerando la media del pool dei valori per ogni mese (in questo caso escludendo il fattore "nome esemplare"). Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il software Statistica (StatSoft Inc.), impostando il valore della significatività per $P < 0.05$.

3.4 Immunoistochimica

3.4.1 Campioni di tessuto e istochimica

I tessuti di cetacei per le indagini istologiche sono stati forniti tutti dalla MMMTB dell'Università di Padova. Oltre che da esemplari di tursiope sono stati considerati campioni provenienti da altre specie a fini comparativi. Queste comprendevano la stenella striata, il grampo (Delphinidae, Odontoceti) e il capodoglio (Physeteridae, Odontoceti). Fra gli animali terrestri sono stati considerati il bovino (*Bos taurus*) e la pecora (*Ovis aries*), i cui campioni appartenevano all'istoteca didattica della Facoltà di Medicina Veterinaria. Da un totale di 12 tursiopi sono stati raccolti 3 campioni di retina, 4 di ghiandola di Harder e 5 di intestino tenue. Gli stessi individui hanno fornito altri tessuti utilizzati come controllo negativo, ovvero fegato, testicolo, ipofisi, rene, cute, intestino crasso, polmone e tiroide. Le altre specie di cetaceo hanno fornito in totale 3 retine (2 di stenella e 1 di capodoglio) e 2 ghiandole di Harder (di grampo). Dalle due specie terrestri sono stati ottenuti campioni di cistifellea (pecora), digiuno e rene (bovino). Tutti i campioni sono stati fissati in formalina al 10% tamponata in PBS pH 7.0. Una parte è stata poi disidratata con alcol e inclusa in paraffina per il taglio al microtomo (10 μ m), un'altra parte è stata trattata con soluzione

crioprotettiva come descritto al paragrafo 2.1 prima del taglio al criostato (4 μm). Tutti i tessuti citati, oltre a quelli citati al paragrafo 2.1 sono stati sottoposti alle classiche colorazioni istologiche, ovvero EE, PAS e Nissl.

3.4.2 Marcaggio anticorpale

Il metodo immunoistochimico impiegato è stato quello del complesso “ABC” (avidina–biotina). Le sezioni dei campioni sono state incubate per 30 minuti a RT in H_2O_2 al 3% in metanolo assoluto, allo scopo di saturare le perossidasi endogene presenti nei tessuti. Per saturare i siti aspecifici (bloccaggio) le sezioni sono state incubate in PBS pH 7,4 con BSA (Sigma–Aldrich) al 5%, NGS (Vector) al 10% e TritonX–100 (Sigma–Aldrich) allo 0.2 %, per 20 minuti a RT. L’anticorpo primario (Ab I), prodotto in coniglio e diretto contro HIOMT umana (dietro gentile concessione del Dott. Fukuda dell’Università di Tokyo), è stato utilizzato a una diluizione finale di 1:2000 nella stessa soluzione usata per il bloccaggio, incubando per 1 h a RT e poi *overnight* a 4 °C. Dopo aver lavato l’eccesso di Ab I con PBS, le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario (Ab II) biotinilato ricavato in capra (Vector) e usato a una diluizione finale di 1:200 in soluzione di bloccaggio, per 1 h a RT. Dopo altri lavaggi in PBS è seguita un’incubazione con il complesso avidina–biotina–perossidasi (Vector) per 1 h a RT. Eliminato l’eccesso di complesso, le sezioni sono state trattate con DAB (Vector) per 2–5 minuti e controcolorate con ematossilina di Harris.

3.5 Western Blot

3.5.1 Preparazione dei campioni

L’analisi delle proteine è stata effettuata su campioni di retina, rene e intestino di tursiope (ID 196) e di ghiandola pineale bovina, conservati a –20 °C in RNAlater (Qiagen). I campioni, scongelati e pesati, sono stati omogenati in 5 volumi di Tris–HCl 125 mM pH 6,8 con cocktail inibitore antiproteolitico (P2714, Sigma–Aldrich). Dopo centrifugazione a 13000 g per 15 minuti a 4 °C per favorire la precipitazione di residui non omogenati, il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf e congelato a –20 °C fino al successivo utilizzo.

3.5.2. Saggio Bradford

I campioni di surnatante precedentemente ottenuti sono stati diluiti in PBS a varie concentrazioni, per determinare il range ottimale di diluizione per l'analisi della concentrazione proteica. I campioni così diluiti sono stati sottoposti a saggio Bradford seguendo il protocollo *Micro Assay* indicato dal datasheet del reagente utilizzato (Bradford Reagent, Sigma–Aldrich). Come prima cosa è stata creata una curva di taratura, diluendo uno standard di BSA 0.1 mg/ml in H₂O con volumi crescenti di PBS pH 7.3, mantenendo un volume totale di 500 µl. A ciascun punto della curva sono stati aggiunti 500 µl di reagente Bradford, e dopo un tempo massimo di 45 minuti a RT, la concentrazione proteica è stata determinata grazie ai valori di assorbanza a 595 nm con uno spettrofotometro (V–630, Jasco). Analogamente, i campioni diluiti in PBS sono stati addizionati con reagente Bradford (lasciato agire per massimo 45 minuti a RT) ed è stata misurata l'assorbanza a 595 nm. Plottando il valore di assorbanza sulla retta di taratura, e moltiplicando per l'appropriato fattore di diluizione, è stata ricavata la concentrazione proteica del campione.

3.5.3 Separazione elettroforetica

Ai campioni appropriatamente diluiti in PBS è stato aggiunto un volume di *Sample Buffer* 2X (Sigma–Aldrich) in rapporto 1:1. Dopo breve agitazione su vortex, sono stati incubati a 100 °C per 2 minuti e congelati a –20 °C fino al successivo utilizzo. La separazione delle proteine è stata eseguita mediante SDS–PAGE, con *stacking gel* al 4% (Tris–HCl 1 M pH 6.8, SDS 10%, Acrilamide 40%, AMPS 10%, TEMED 0.1% in H₂O) e *resolving gel* al 10% (Tris–HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10%, Acrilamide 40%, AMPS 10%, TEMED 0.2% in H₂O) preparati su Hoefer SE 245–Dual Gel Caster (GE Healthcare). Sono stati caricati 3 µg/lane di proteine totali, oltre al *marker* (StoS Protein Marker 10–245 kDa, GeneSpin) diluito in glicerolo al 15%, e la corsa è stata effettuata su Hoefer SE 260 (GE Healthcare) per 90 minuti a 30 mA e per 90 minuti a 60 mA, a una temperatura di 4 °C in tampone di corsa di Laemmli (Tris–HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% in H₂O). Per ciascuna prova sono state allestite due corse elettroforetiche: una per l'elettrotrasferimento su membrana di nitrocellulosa, l'altra per testare le condizioni di corsa e l'integrità dei campioni mediante colorazione con *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma–Aldrich).

3.5.4 Elettrotrasferimento

Le proteine, separate in base al peso molecolare, sono state trasferite dal gel alle membrane di nitrocellulosa spesse 0,45 µm (GE Healthcare) mediante immersione in vasca trans–blot T–B 900

(Elettrofor), in tampone di trasferimento (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20% in H₂O). Il trasferimento è avvenuto a 250 mA e 500 V a 4 °C per 1 h.

Al termine del trasferimento, le membrane di nitrocellulosa sono state immerse per 2 minuti nella soluzione colorante di Ponceau (acido tricloro acetico 3 %, Rosso Ponceau 0,2 % in H₂O) per rendere visibili i pesi molecolari del *marker* e le proteine totali trasferite. Successivamente le membrane sono state lavate con abbondante acqua MilliQ e incubate con latte in polvere al 3% in TPBS (Tween 20 allo 0.05 % in PBS pH 7.3) *overnight* per bloccare i siti di legame aspecifici.

3.5.5 Marcaggio anticorpale

Le membrane sono state incubate su agitatore orizzontale con Ab I anti-HIOMT per 1 h a RT a una diluizione finale di 1:1000 in TPBS. Dopo l'incubazione, le membrane sono state sottoposte a tre lavaggi da 10 minuti con TPBS, per poi essere incubate per 1 h a RT con anticorpo secondario (Ab II) coniugato con HRP (*horseradish peroxidase*).

3.5.6 Reazione chemiluminescente

Il complesso antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante reazione chemiluminescente indotta dall'utilizzo del substrato HRP (Millipore). Il complesso è stato impresso su lastra fotografica (GE Healthcare) utilizzando soluzioni di sviluppo e di fissaggio (Sigma-Aldrich). Tale reazione è stata indotta in stanza buia.

3.6 Biologia molecolare

3.6.1 Disegno dei primer per HIOMT mRNA, SV40 e β -actina

La Tabella 3.3 riporta le sequenze dei primer utilizzati, indicando la sequenza sorgente e la lunghezza del prodotto di amplificazione (ampliconi). Per quanto riguarda l'mRNA di HIOMT, non essendo disponibili sequenze note di alcun cetaceo, sono state disegnate cinque diverse coppie di primer con metodi diversi grazie al programma Primer3 (Rozen e Skaletsky 2000) disponibile online.

Tabella 3.3. Elenco dei primer utilizzati per gli mRNA di HIOMT, β -actina e antigene-T grande del virus SV40, con indicate le sigle, le sequenze dei primer e la lunghezza del prodotto di amplificazione (amplicone). BOV = GenBank no. M81862; BOV act = NM_173979.3; EX14 = Ensembl no. ENSTTRE00000191337; ACT = GenBank no. AB289605; SV40 = GenBank no. NC_001669; nt = nucleotidi.

Nome sequenza	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')	Amplicone (nt)
BOV	TCATGGTCTCCCAGGTTCTC	AGACACTGCTGCTGAGTCCA	95
BOVact	CGTGACATCAAGGAGAAGCTC	CCCGTCAGGAAGCTCGTAG	108
EX14	CCTGCACCTAGTGTGACGACG	AGGCGTTCCTCCTCCATC	156
CONTIG1 ²	CAAGGCCTCATTCGCTACTC	AGCAGCTCCTCTGACAGCTC	339
REG1 ²	GGAGGAGGAACGCCTGTC	tgcagccTCCCAGGTC ¹	158
REG2 ²	CAGATCTGTACGTCCTTTCCAG	GCCACCGCCTGGTTT	118
ACT	GAGATGCATTGTTACAGGAGGTC	GGACTGGCCCTTCTCCTAAG	75
SV40	GTGTCCTGGAAGCTTGTAACAGAG	CAAAGTTCAGCCTGTCCAAGGGCA	577

¹Le lettere minuscole indicano nucleotidi contigui ma non appartenenti a REG1. ²Sequenze non presenti in database on-line e create come descritto nel testo.

La prima coppia è stata ricavata dalla sequenza nota per il bovino (BOV; GenBank no. M81862), specie filogeneticamente vicina al tursiope. La seconda e terza coppia sono state ottenute in base alla sequenza predetta del trascritto del gene di HIOMT per il tursiope, presente nella banca dati genomica ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Tale sequenza (Ensembl no. ENSTTRT00000015400) è stata ottenuta allineando con BLASTZ una sequenza parziale di delfino con quella nota umana, ma essendo incompleta e provvisoria, può presentare delle parti mancanti o inesatte. Dei 21 esoni in cui è suddiviso il trascritto, è stato considerato il più lungo, l'esone 14 (EX14; Ensembl no. ENSTTRE00000191337), sulla cui sequenza è stata disegnata la seconda coppia di primer. La terza coppia è stata disegnata in base alla sequenza ottenuta dall'unione dei primi sette esoni, cercando di ottenere un amplificato più esteso e quindi più affidabile. Per comodità tale sequenza è stata chiamata CONTIG1, per analogia con il termine “*contig*” (abbreviazione di “*contiguous*”) usato per indicare una sequenza nucleotidica senza interruzioni, ottenuta dalla sovrapposizione di numerose sequenze parziali provenienti dalla stessa sequenza sorgente. La sequenza di CONTIG1 (con gli esoni sottolineati alternatamente e i primer in grassetto) è la seguente:

5'–ATGGTGCTGTGCCCCGGTGATCGGGAAGCTGCAGCACAAGCGCGTGGTGTGGCCAG
CGCCTCCCCGCGCCGCCAGGAGATCCTCAGCAACGCGGGCCTCAGGTTGAGGTGGTC
CCTTCCAGGTTCAAGGAGAAGCTGCACAAGGCCTCATTCGCTACTCCGTACGCATAC
GCGGTGGAACAGCCAAGCAGAAGGCCCTGGAGGTGGCCGGCAGGATGCACCAGAAG
GACCTGCGGGCCCCTGACGTTGTTCATCGGAGCAGACACCATCGTGGCGGTGGGAGCGA

TGATCCTGGAGAAGCCTGTGGACAAGCAGGACGCCTACCGCATGCTGTCAAGGCTGAA
CGGGAAGGAGCACAGTGTGTTACGGGCGTGGCCATCGTCCACTGCTGCAGCAAAGAC
GGCCGGCTGGACACGGAGGTCTCGGAGTTCTACGAGGAGACCACGGTGAAGTTCTCAG
AGCTGTCAGAGGAGCTGCTGTGGGAGTACATCAACAGCGGAGAGCCCATGGACAAG
GCTGGCGGCTACGGGATCCAGGCGCTGGGCGGGATGCTCGTGGAGTACGTGCACGGGG
ACTTCCTCAACGTCGTGGGCTTCCCCCTGAACCACTTCTGCAAGT-3’.

Il relativo amplicone si estende fra l’esone 2 (EX2) e l’esone 6 (EX6). Le ultime due coppie sono state ricavate in modo retrogrado, ovvero a partire dalla sequenza amminoacidica della proteina corrispondente al trascritto ENSTTRT00000015400. Questa sequenza (Ensembl no. ENSTTRP00000014595) è stata allineata con quelle note di altri cinque mammiferi, ovvero uomo (*Homo sapiens*, GenBank no. NP_001164509), macaco (*Macaca mulatta*, GenBank no. AAL49966), bovino (GenBank no. M81862), topo (*Mus musculus*, GenBank no. NP_001186141) e ratto (*Rattus norvegicus*, GenBank no. NP_653360), tramite il software ClustalW2 (Larkin et al. 2007) disponibile on-line (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Dall’allineamento multiplo sono state ricavate quattro sequenze amminoacidiche “consenso”, ovvero costituite dagli aminoacidi più conservati fra le sei specie, delimitanti due regioni, chiamate rispettivamente REG1 e REG2 (FIG. 3.1). Ricavando poi la sequenza nucleotidica corrispondente a queste due regioni, sono state disegnate due coppie di primer, forzandoli a insistere sulle porzioni corrispondenti alle sequenze consenso, come indicato in Tab. 3.4.

I primer per l’mRNA codificante l’antigene-T grande del virus SV40 (SV40, GenBank no. NC_001669) sono gli stessi utilizzati da Nobre et al. (2010). In tutte le prove, per monitorare la qualità della retrotrascrizione e della PCR è stata valutata l’espressione dell’mRNA della β -actina, proteina ubiquitaria del citoscheletro, sia per i campioni di bovino (BOVact, GenBank no. NM_173979.3) che per quelli di tursiope (ACT, GenBank no. AB289605).

Figura 3.1. Allineamento multiplo delle sequenze amminoacidiche di HIOMT di *H. sapiens*, *M. mulatta*, *B. taurus*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e *T. truncatus*. Le X indicano sequenze amminoacidiche la cui sequenza codificante non è ancora stata determinata, i trattini (–) corrispondono a delezione o inserzione. Gli asterischi (*) sotto le sequenze indicano residui pienamente conservati, i due punti (:) residui con proprietà molto simili e il punto singolo (.) residui con proprietà poco simili. In giallo sono state evidenziati gli amminoacidi più conservati delle sequenze “consenso” che delimitano REG1 e REG2, in azzurro quelli più conservati di una sequenza “consenso” interna su cui insiste il primer reverse di REG2.

H. sapiens	-----	
M. mulatta	-----	
B. taurus	-----	
M. musculus	-----	
R. norvegicus	-----	
T. truncatus	MVLCPVIGKQLQHKRVVLASASPRRQEILSNAGLRFVPSRFKEKHLKASFATPYAYAVE	60
H. sapiens	-----	
M. mulatta	-----	
B. taurus	-----	
M. musculus	-----	
R. norvegicus	-----	
T. truncatus	TAKQKALEVAGRMHQKDLRAPDVVIGADTIVAVGAMILEKPVDKQDAYRMLSRLNGKEHS	120
H. sapiens	-----	
M. mulatta	-----	
B. taurus	-----	
M. musculus	-----	
R. norvegicus	-----	
T. truncatus	VFTGVAIVHCCSKDGRDLTEVSEFYEETTvkFSELSEELLWEYINSGEPMDKAGGYGIQA	180
H. sapiens	-----	
M. mulatta	-----	
B. taurus	-----	
M. musculus	-----	
R. norvegicus	-----	
T. truncatus	LGGMLVEYVHGDFLNvVGFPLNHFCkXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	240
H. sapiens	----MGSSE-----DQAYRLLN DYANGFMV SQVLFAACELGVFDLLAEAPGPLDVAAVA	50
M. mulatta	----MGSSG-----DDGYRLNNEYTNGFMV SQVLFAACELGVFDLLAEAPGPLDVAAVA	50
B. taurus	----MCSQE-----GEGYSL LKEYANGFMV SQVLFAACELGVFELLAEALEPLDSA AVS	50
M. musculus	----MHRGRSASARQERDFRALMDLAHGFMASQVLFAAGCALRVFDAAALG--PVDA AALA	54
R. norvegicus	----MAPGR--EGELDRDFRVLMSLAHGFMV SQVLFAALDLGIFDLAAQG--PVAAEAVA	52
T. truncatus	XXXXXXXXXXXXTDSAPFP TGLLELMDGFKASKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-XXXXXXX	299
	* . . ** .*	
H. sapiens	AGVRASAHGTELLLDICVSLKLLKVETRGG--KAFYRNTELS SDYLTTVSPTSQC SMLKY	108
M. mulatta	AGVEASSHGTELLLDTCVSLKLLKVETRAG--KAFYQNT ELS SAYLTRVSPTSQC NLLKY	108
B. taurus	SHLGSSPQGTELLLN TCVSLKLLQADV RGG--KAVYANTELASTYLVRGSPRSQRDMLLY	108
M. musculus	RSSGLSPRGTRLLLDACAGLGLLRRRRGAGPRGPAYTNSPLASTFLVAGSPLSQR SLLLY	114
R. norvegicus	QTGGWSPRG TQLLMDACTRLGLLR---GAG--DGSYTNSALSSTFLVSGSPQSQR CMLLY	107
T. truncatus	XXXXXXXXXTEQLLDVCAALGLLEKTRRGY-----SNTEVATLHLVSDGEHSLQGV A EY	353
	* . *:: * . * ** . * : : : * . . * : *	
H. sapiens	MGR TSYRCWGH LADAVREGRNQYLETFGVPAEELFTAIYR-SEGERLQFMQALQEVVSVN	167
M. mulatta	MGR TSYGCWGH LADAVREGKNQYLQTFGVPAEDLFKAIYR-SEGERLQFMQALQEVVSVN	167
B. taurus	AGRTAYVCWRHLAEAVREGRNQYLKAFGIPSEELFS AIYR-SEDERLQFMQGLQDVWRLE	167
M. musculus	LAGT TTYLCWGH LADAVREGRSQYARAVGDADDPFTAIYR-SEAERLLFMRGLQETW SLC	173
R. norvegicus	LAGT TTYGCWAHLAAGVREGRNQYSRAVGISAEDPFS AIYR-SEPERLLFMRGLQETW SLC	166
T. truncatus	NDAHVWG V FTRLGLAVREGAEQTRGALGAMEEERLSQGYHQ SRELTLQFMRAKHSLSKLT	413
	: : : * . ***** * : * : : * : * . * * * : . : :	

REG1

H. sapiens	GRSVLTAFDLSVFPML CDLG GTWIKLETIILSKLSQGQKTKHRVFLIGGAGALAKECMS	227
M. mulatta	GRSVLTAFDLSGFPLM CDLG -----GGPGALAKECLS	199
B. taurus	GATVLAADFDSLFPPLI CDLG -----GGSGALAKACVS	199
M. musculus	GGRVLTAFDLSPPFRVI CDLG -----GGSGALARMAAR	205
R. norvegicus	GGRVLTAFDLSRFRVI CDLG -----GGSGALAQEAAR	198
T. truncatus	AHHVATAFDLSRFASA CDLG -----GCTGILARELAQ	445

. * :***** * **** * . * **:

REG2

H. sapiens	LYPGCKITVFDIPEVVWTAKQHFSFQ----EEEQIDFQEG GDFFKD PLPEADLYILARVL	282
M. mulatta	LYPGCKVTVFDVPEVVRTAKQHFSFP----EEEEIHLQEG GDFFKD PLPEADLYILARIL	254
B. taurus	LYPGCRAIVFDIPGVVQIAKRHFSAS----EDERISFHE GDFFKD ALPEADLYILARVL	254
M. musculus	LYPGSEVTVFETPDVVAARAHAHFPPPADEGAEPRVRFLS GDFFRS PLPPADLYVILARVL	265
R. norvegicus	LYPGSSVCVFDLPDVIAAARTHFLSP----GARPSVRFVA GDFFRS RLPRADLFILARVL	254
T. truncatus	EYPRLQVTVFDLPEVTELSGGFQRGG---RQTERIRFV P GDFFKD SLPEADLYVLSRML	501

** ** : * * : . : : ***** . ** *****:***:**

REG2

H. sapiens	HDWADGKCSHLLERIYHTC KPGGGILV IESLLDEDRRGPLLTQLYSLNMLVQTEGQERTP	342
M. mulatta	HDWADGKCSHLLERVYHTC KPGGGILV IESLLDEDRRGPLLTQLYSLNMLVQTEGQERTP	314
B. taurus	HDWTDAKCSHLLQVYRACRT GGGILV IESLLDTDGRGPLTTLLYSLNMLVQTEGRERTP	314
M. musculus	HDWADAACVELLRRVRGALR PGGAVLL VESVLSPPGAGPRTLLLSLTMLLQARGRETE	325
R. norvegicus	HDWADGACVELLGRLHRACR PGGALL LVEAVLAKGGAGPLRSLLLSLNMMLQAEGWERQA	314
T. truncatus	QDWPDDKLHKLLSRISSSC KPGGGLLV AEEAAEEEGAS-----QSPRLRTLSPQPRSP	554

:**.* .** * : : .**.:** * : . : *

H. sapiens	THYHMLLSSAGFRDFQFKKTGAIYDAILARK-----	373
M. mulatta	THYHMLLSSAGFRDFQFKKTGAIYDAILVRK-----	345
B. taurus	AEYRALLGPAGFRDVRCRRTGGTYDAVLARK-----	345
M. musculus	AEYRAL'TARAGFSRLRLRRPRGPYHAMMAARG-----GG-----A	360
R. norvegicus	SDYRNLATRAGFPRLQLRRPGGPYHAMLARRGPRPGIITGVGSNTTGTGFSFVTGIRRDVP	374
T. truncatus	DEHRLLQRHGFQDVRVARAGDLLCVVLGTRAAP-----	588

.: * ** .: .: .: :

H. sapiens	-----	
M. mulatta	-----	
B. taurus	-----	
M. musculus	GARSDGGG-GDATSQTGSG-----TGSEVGAQD-----	387
R. norvegicus	GARSDAAGTGS GTNTGSGIMLQGETLESEVSAPQAGSDVGGAGNEPRSGTLKQGDWK	432
T. truncatus	-----	

Tabella 3.4. Dettaglio delle sequenze nucleotidiche corrispondenti a REG1 e REG2, con indicate le rispettive sequenze amminoacidiche “consenso” che le delimitano, la posizione dei rispettivi amminoacidi e gli esoni a cui esse corrispondono. In entrambe le sequenze, i nucleotidi sottolineati e in grassetto corrispondono agli amminoacidi “consenso”, quelli evidenziati in giallo al primer forward e quelli in verde al primer reverse. Nella sequenza di REG1 le lettere minuscole indicano 10 basi contigue ma non appartenenti a REG1, utilizzate per disegnare il primer reverse. Nella sequenza REG2 le basi in corsivo corrispondono a una sequenza “consenso” interna su cui insiste il primer forward.

Nome sequenza	Sequenza consenso AA	Posizione AA	Esoni compresi	Sequenza nucleotidica
REG1	AVREG	368 – 372	EX 14	5’– <u>GCCGTGCGGGAGGGG</u> GCAGAGCAGACC CGCGGGGCTCTGGGGGCGAT <u>GGAGGAGG</u> <u>AACGCCTGTC</u> CCAGGGGTACCACCAGAGC AGGGAGCTGACGCTGCAGTTCATGAGGGC CAAGCACAGCCTCAGCAAAGTACCAGCCC ACCACGTGGCCACGGCCTTCGACCTGTCC CGATTCGCCTCTGCCT <u>TGC</u> <u>GACCTGGG</u> agg ctgca _{cgg} -3’
	CDLG	430 – 433	EX 16	
REG2	GDFFKD	482 – 487	EX 17–18	5’– <u>GGTGACTTTTTCAAAGACAGCCTCCCGG</u> AAG <u>CAGATCTGTACGTCCTTCCAG</u> AATGC <u>TGCAGGACTGGCCGGATGAC</u> AAACTCCAC AAGCTACTGAGCCGGATCTCAAGCAGCTG C <u>AAACCAGGCGGTGGC</u> CTCCTGGTG-3’
	KPGGLLV	521 – 528	EX 18–19	

3.6.2 Estrazione e quantificazione RNA

Per le analisi di biologia molecolare sono stati prelevati campioni di diciannove diversi tessuti da un esemplare di tursiope (ID 196), morto da meno di 48 ore, pervenuto presso la Sala Necroscopia della Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università di Padova per le normali attività di necroscopia. Questi comprendevano esofago, ghiandola di Harder, retina, polmone, tiroide, fegato, prima camera gastrica, seconda camera gastrica, terza camera gastrica, testicolo, linfonodo, cute, blubber, intestino crasso, intestino tenue, pancreas, surrene, rene, milza. I campioni sono stati conservati in RNA_{later} (Qiagen) e congelati fino al successivo utilizzo. Di ognuno è stato prelevato un frammento non più grande di ca. 64 mm³ per ottimizzare la capacità estrattiva. Dopo aver asciugato su carta assorbente l’eccesso di RNA later, il tessuto è stato omogenato in *potter* con 1 ml di TRIzol (Invitrogen) e i frammenti non digeriti sono stati lasciati depositare. Il surnatante è stato trasferito in eppendorf e lasciato incubare per 5 minuti a RT. Sono stati aggiunti 0.2 ml di cloroformio, agitando poi delicatamente per circa 15 secondi, e lasciando separare le fasi dopo 2–3 minuti a RT. Dopo centrifugazione per 15 minuti a 4 °C a 12000 g il surnatante, trasparente, è stato trasferito in una nuova eppendorf e addizionato con 500 µl di isopropanolo, incubando poi per 10

minuti a RT. Dopo un'altra centrifugata per 10 minuti a 12000 g a 4 °C il surnatante è stato eliminato, lasciando sul fondo della provetta il pellet bianco di RNA. È stato aggiunto 1 ml di etanolo al 75% in H₂O trattata con DEPC (Invitrogen), e dopo leggera agitazione la provetta è stata centrifugata a 7500 g per 5 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet lasciato asciugare sotto cappa aspirante, per poi risospenderlo in 20–40 µl di H₂O DEPC a seconda della quantità di pellet ottenuto. I campioni così ottenuti sono stati denaturati per 2 minuti a 65 °C e stoccati a –80 °C fino al successivo utilizzo. Per determinare la concentrazione dell'RNA totale di ogni campione è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 260 nm con spettrofotometro V630 (Jasco) diluendo 1 µl di campione in 69 µl di H₂O, moltiplicando poi il valore per l'opportuno fattore di correzione. Per saggiare la qualità dell'estrazione i campioni sono stati allestiti per una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.8% in tampone TAE (Invitrogen), con aggiunta di Et-Br 0.002%, preparati in vasca SHU6 (Sigma–Aldrich) per gel da 40 ml od OA–120 (Elettrofor) per gel di volumi superiori. Di ogni campione, prima della corsa, 1 µl è stato addizionato con 1 µl di RNA *Sample Buffer* (Sigma) e incubato per 10 minuti a 65 °C. Per ogni corsa è stato utilizzato come riferimento il *marker* PCR 100 bp *Low Ladder* (Sigma), caricandone 4 µl con aggiunta di 3 µl di GEL Loading Buffer (Sigma). Dopo la corsa elettroforetica i gel sono stati osservati con lampada ad UV (Elettrofor) e fotografati con fotocamera Optio W60 (Pentax).

3.6.3 Retrotrascrizione a cDNA

Prima di ogni retrotrascrizione è stata misurata nuovamente la concentrazione di RNA totale di ogni campione, come sopra descritto, per assicurarsi di retrotrascrivere sempre la stessa quantità di RNA, in questo caso 2 µg. Al volume di ogni campione contenente tale peso (x) è stata aggiunto un volume di H₂O DEPC pari a 12–x µl, 1.5 µl di 10X *DNase I Reaction Buffer* (Invitrogen), 1.5 µl di *DNase I Amplification Grade* 1 U/µl (Invitrogen). Dopo un'incubazione per 15 minuti a RT è stata inattivata la DNasi I aggiungendo ad ogni campione 1.5 µl di EDTA 25 mM e incubando a 65 °C per 10 minuti. Sono stati aggiunti 1 µl di *Random Hexamer Primer* 10 µM (Fermentas) e 1 µl di dNTPs (soluzione contenente dATP, dCTP, dTTP e dGTP 10 mM) e i campioni sono stati incubati per 5 minuti a 65 °C. Successivamente ad ogni campione sono stati aggiunti 4 µl di 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen), 1 µl di DTT 100 mM, 1 µl di RNase OUT 40 U/µl (Invitrogen) e 1 µl di *SuperScript III Reverse Transcriptase* 200 U/µl. Dopo una prima incubazione a RT per 5 minuti ne è seguita una seconda per 1 h a 50 °C e una terza a 70 °C per 15 minuti (per inattivare la trascrittasi inversa), dopodichè i campioni sono stati conservati a –20 °C fino al successivo utilizzo.

3.6.4 PCR

Da ognuno dei campioni di cDNA precedentemente ottenuti è stata prelevata un'aliquota pari a 2 μ l, a cui sono stati aggiunti 12.7 μ l H₂O DEPC, 2 μ l di 10X *PCR Rxn Buffer*, 0.8 μ l di MgCl₂ 50 mM, 0.4 μ l di dNTPs, 1 μ l degli opportuni primer "senso" (*forward*) e "antisenso" (*reverse*) 20 μ M e 0.1 μ l di *Taq DNA Polymerase* 5 U/ μ l. Per eseguire la PCR è stato utilizzato un termociclatore TC-312 (Techne), seguendo il seguente protocollo per 45 cicli: denaturazione per 1 minuto a 94 °C, *annealing* per 1 minuto a 54 °C ed estensione a 72 °C per 45 secondi. Il numero di cicli è stato impostato sufficientemente elevato per avere una maggiore probabilità che anche i cDNA degli mRNA espressi a basse concentrazioni venissero amplificati. Per saggiare la qualità della PCR sono stati caricati 6 μ l di ogni campione con 3 μ l di GEL Loading Buffer (Sigma), utilizzando lo stesso *marker* e lo stesso tipo di gel descritto al punto 2.6.2. I cDNA amplificati sono stati conservati a -20 °C.

3.6.5 Estrazione e purificazione di DNA genomico

Sono stati utilizzati frammenti non più grandi di ca. 64 mm³ di campioni di esofago e di cute appartenenti all'ID 196, conservati in RNAlater, asciugandone l'eccesso su carta assorbente. Ogni campione è stato omogenato con pestello in 500 μ l di *Extraction Buffer* pH 8.0 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM) con aggiunta di 62 μ l di SDS 10% a una temperatura di 55 °C, lasciando poi incubare per 30 minuti. Sono stati aggiunti 10 μ l di Proteinasi K 20 mg/ml (Norgen) ed i campioni sono stati incubati per 1 h a 55 °C. Dopo l'aggiunta di 143 μ l di NaCl 7 M è seguita un'agitazione con *vortex* per 20 minuti e una centrifugazione a velocità massima per 30 minuti a RT. Il surnatante è stato raccolto evitando qualsiasi residuo solido e sono stati aggiunti 70 μ l di sodio acetato 3 M pH 5.5 e 2 ml di etanolo assoluto, lasciando poi il tutto per almeno 1 h a -20 °C. Dopo una centrifugazione a velocità massima a 4 °C per 30 minuti, il surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso con 500 μ l di etanolo 70%, centrifugando poi per 5 minuti a velocità massima a RT. Il pellet corrispondente a ca. 5 μ g di DNA è stato di nuovo risospeso in 500 μ l di etanolo 70%, centrifugato per 5 minuti a velocità massima a RT, e risospeso in 300 μ l di H₂O MilliQ e conservato a -20 °C. La concentrazione del DNA è stata determinata come descritto al paragrafo 2.6.2, moltiplicando la lettura dell'assorbanza a 260 nm con spettrofotometro V630 (Jasco) per l'opportuno fattore di diluizione, ottenendo una concentrazione di 17 ng/ μ l. Per entrambi i tessuti sono state eseguite le PCR utilizzando tutte e 4 le coppie di primer disegnate sulla sequenza di tursiope e descritte al paragrafo 2.6.1.

3.6.6 Purificazione e sequenziamento REG1 e REG2

Per il sequenziamento è stato scelto il prodotto della PCR ottenuto con la coppia di primer disegnata su EX14. Sono state allestite 2 eppendorf contenenti ciascuna 5 µl di PCR e 3 µl di ExoSAP-IT (USB Corporation), contenente esonucleasi I e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*), incubando poi per 15 minuti a 37 °C e per 15 minuti a 80 °C in termociclatore TC-312 (Techne). Ad ogni eppendorf è stato aggiunto 1 µl di primer *forward* e 1 µl di primer *reverse*, rispettivamente, facendo poi essiccare il tutto a 65 °C. Il sequenziamento è stato eseguito nei laboratori del CRIBI (Centro Ricerche Interdipartimentale Biotecnologie Innovative, <http://www.cribi.unipd.it/>) dell'Università di Padova.

3.7 Colture cellulari

3.7.1 Campioni di cute di *T. truncatus*

Il prelievo di cute è stato effettuato da un esemplare (ID 159) morto da poche ore e pervenuto presso la Sala Necroscopia della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova per le normali attività di necroscopia. Si trattava di un esemplare adulto di sesso maschile, morto per cause naturali, che non presentava segni di patologie a livello cutaneo. La cute è stata disinfettata con etanolo 70% prima del prelievo. Con un bisturi sono state praticate delle incisioni perpendicolari in modo da formare una griglia, per poi tagliare tangenzialmente alla superficie cutanea. In questo modo si sono ricavati dei “tasselli” di 2–3 cm², facendo attenzione a non prelevare il *blubber* sottostante per non contaminare le colture con adipociti. I frammenti sono stati immersi in 4–5 ml di mezzo di coltura primario contenente FBS 10–20% ([Sigma](#)), L-glutamina 200 mM ([Sigma-Aldrich](#)), penicillina 50 µg/ml, streptomina 50 µg/ml in DMEM-F12 ([Invitrogen](#)) e conservati a 4 °C per massimo 24 h prima della successiva processazione sotto cappa aspirante.

Per garantire la disponibilità di campioni da cui ricavare colture, i campioni sono stati sottoposti a trattamento di crioconservazione come segue. I frammenti di cute sono stati depositi su piastra Petri sterile e sono stati lavati 3–4 volte con mezzo primario completo, aspirandolo dopo ogni lavaggio. I frammenti più grandi sono stati ulteriormente sminuzzati, il tutto è stato immerso in mezzo di crioconservazione composto da DMSO 10%, FBS 10%, HEPES₄ 1 M in DMEM-F12 e conservato a –80 °C per massimo una settimana, prima dello stoccaggio in azoto liquido.

3.7.2 Allestimento coltura primaria

Per ottenere la coltura primaria è stato utilizzato il kit Papain Dissociation System (Worthington Biochemical Corp.). I campioni di cute conservati in azoto liquido sono stati scongelati rapidamente in H₂O a 37 °C in bagnetto termostato (Intercontinental Equipment). Dopo aver eliminato la soluzione di crioconservazione i frammenti di cute sono stati sminuzzati il più possibile con bisturi e trasferiti in tubo Falcon con 5.25 ml di EBSS (Worthington) contenenti papaina 20 U/ml (Worthington) e DNasi I 0.005% (Worthington). In caso di viraggio del pH, visibile tramite scala colorimetrica, la soluzione è stata riequilibrata facendo gorgogliare una miscela di O₂ al 95% e CO₂ al 5%. Il tubo è stato posto in agitazione moderata in posizione orizzontale a 37 °C per 30–90 minuti, valutando visivamente il grado di torbidità del mezzo e di consistenza del tessuto. La soluzione è stata risospesa pipettando energicamente, per favorire la frammentazione del tessuto ormai digerito, ed è stata fatta decantare per far depositare i frammenti non digeriti. Il surnatante è stato poi trasferito in un nuovo tubo e centrifugato a 300 g per 5 minuti a RT. Il nuovo surnatante è stato eliminato ed il pellet è stato risospeso in 2.7 ml di EBSS con 300 µl di inibitore albumina–ovomucoide (albumina 10 mg/ml, inibitore ovomucoide delle proteasi 10 mg/ml in EBSS) (Worthington). Delicatamente sono stati depositi sopra la sospensione cellulare altri 5 ml di inibitore, ed il tutto è stato centrifugato per 6 minuti a meno di 100 g a RT. Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet di cellule è stato risospeso in mezzo di coltura primario e posto in fiaschette da 25 cm² (Greiner) in incubatore a 37 °C con atmosfera al 5% di CO₂.

3.7.3 Coltura batterica e isolamento su vasta scala del plasmide pSV3–neo

Per trasformazione batterica si intende un procedimento che permette l'introduzione di un cDNA di interesse (presente in un opportuno vettore, con origini di replicazione batteriche) in batteri competenti. Il plasmide utilizzato in questo caso è stato il pSV3–neo (ATCC), contenente i geni codificanti l'SV40 *large T antigen*, l'antigene di resistenza all'ampicillina (AmpR) e l'antigene di resistenza al G418 (Invitrogen), un analogo sintetico dell'antibiotico gentamicina B1.

I batteri del ceppo DH5α di *Escherichia coli* già trasformati (Invitrogen) sono stati posti a crescere *overnight* a 37 °C in agitazione costante in 100 ml di mezzo Luria–Bertani (LB), contenenti 16 g/l di bacto–triptone (BD), 10 g/l di estratto di lievito (BD) e 5 g/l di NaCl in H₂O Milliq. Per l'estrazione e la purificazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il GenElute HP Endotoxin–Free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma–Aldrich), seguendo il protocollo indicato nel datasheet. La

coltura di batteri è stata centrifugata per 10 minuti a 5000 g ed il surnatante è stato eliminato, poi il pellet è stato risospeso in 12 ml di *Resuspension/Rnase Solution* (Sigma–Aldrich), agitando su *vortex* per omogenare. Sono stati aggiunti 12 ml di *Lysis Solution* (Sigma–Aldrich) per lisare i batteri, agitando delicatamente per qualche secondo e lasciando poi riposare 3–5– minuti per favorire la separazione delle fasi. Il buffer di lisi è stato neutralizzato con 12 ml di *Neutralization Solution* (Sigma–Aldrich), agitando delicatamente per qualche secondo. Il lisato è stata poi filtrato applicando il vuoto utilizzando l'apposito *Endotoxin–Free Maxiprep Filter* con *VacCap* sul *Collection Tube* ed è stata addizionato con 9 ml di *Binding Solution* (Sigma–Aldrich), agitando delicatamente per qualche secondo. La sospensione è stata trasferita in una nuova colonna precedentemente trattata con *Column Preparation Solution* (Sigma–Aldrich) e nuovamente filtrata. Il filtro è stato lavato in successione con 12 ml di Wash Solution 1 e 12 ml di Wask Solution 2, fatti filtrare applicando il vuoto, per poi lasciare asciugare il filtro per almeno 10 minuti mantenendo il vuoto applicato. La colonnina di raccolta è stata inserita in un tubo Falcon, sono stati aggiunti 3 ml di *Endotoxin–Free Water* (Sigma–Aldrich) ed il tutto è stato centrifugato per 5 minuti a 1000 g, facendo eluire il DNA plasmidico nel tubo Falcon. La concentrazione del DNA è stata determinata come descritto al paragrafo 2.6.2, moltiplicando la lettura dell'assorbanza a 260 nm con spettrofotometro V630 (Jasco) per l'opportuno fattore di diluizione. Il plasmide è stato conservato a –20 °C fino al successivo utilizzo.

3.7.4 Immortalizzazione della coltura primaria

Le cellule di cute per l'immortalizzazione sono state fatte crescere in piastre petri da 2ml. Per trasfettare le cellule con il plasmide psv3neo è stato utilizzato il metodo della lipofezione, che sfrutta i liposomi come vettori, mediante il kit *Lipofectamine LTX and Plus Reagent* (Invitrogen). Un'ora prima della trasfezione alle cellule è stato sostituito il vecchio mezzo di coltura con 1.5 ml di mezzo fresco senza antibiotici, mantenendole in incubatore. Per ogni Petri sono stati preparati 500 µl di DMEM–F12, un volume contenente 1–2 µg di psv3neo e un uguale volume di *Plus Reagent* (Invitrogen), incubando poi per 5 minuti a RT. Dopo l'aggiunta di 2 µl di *Lipofectamine LTX* (Invitrogen), agitando con *vortex*, è seguita un'incubazione per 30 minuti per permettere la formazione dei liposomi. La soluzione di trasfezione così ottenuta è stata aggiunta alle Petri ottenendo un volume finale di poco più di 2 ml. Dopo 4 h di incubazione a 37 °C con atmosfera al 5% di CO₂, il mezzo di trasfezione è stato eliminato ed è stato sostituito con mezzo di coltura primario, per evitare eventuali danni citotossici causati dai reagenti del kit. Dopo l'espansione della coltura trasfettata e la comparsa di *foci* di accrescimento, questi ultimi sono stati prelevati con

puntale sterile e trasferiti in incubatore a 37 °C in fiaschette da 25 cm² (Greiner) con 5 ml di mezzo di coltura secondario contenente FBS 10–20% (Sigma), L–glutammina 200 mM (Sigma–Aldrich), penicillina 50 µg/ml, streptomicina 50 µg/ml e G418 100 µg/ml (Invitrogen) in DMEM–F12 (Invitrogen). La coltura derivante dall’espansione di un singolo *focus* è stata considerata come “passaggio 0”.

3.7.5 Propagazione della coltura secondaria

Dopo il raggiungimento da parte della coltura di una confluenza pari all’85–90%, ogni fiasca è stata lavata per 2–3 volte con 2 ml di PBS 1X sterile a 37 °C, aspirandolo dopo ogni lavaggio. E’ stato rapidamente aggiunto 1 ml di soluzione contenente tripsina allo 0.1% ed EDTA 0.5 mM in PBS pH 7.0, per digerire le proteine di adesione cellulare e permettere il distacco dal fondo della fiasca, incubando per meno di 1 minuto a 37 °C. Dopo aver controllato allo stereomicroscopico l’effettivo distacco delle cellule sono stati aggiunti 2 ml di mezzo di coltura secondario a 37 °C, pipettando energicamente sulla parete di plastica per favorire il più possibile il distacco. I peptidi contenuti nel mezzo fresco inibiscono l’azione della tripsina evitando che questa danneggi le cellule. Il contenuto della fiasca è stato raccolto in tubo Falcon e centrifugato per 5 minuti a 300 g, il surnatante è stato eliminato ed il pellet risospeso in 1 ml di mezzo secondario. Sono stati trasferiti 500 µl di sospensione in una nuova fiasca, eseguendo così un nuovo “passaggio”, aggiungendo poi 4.5 ml di mezzo secondario e incubando a 37 °C con atmosfera al 5% di CO₂.

Per rendere sempre disponibile propagare una nuova coltura in caso di inquinamento batterico o fungino, dopo aver staccato le cellule mediante tripsinizzazione, il pellet ottenuto dopo la centrifugazione è stato risospeso in una soluzione crioconservante composta da “glucosata” (D–glucosio 20% in DMEM–F12 e DMSO 7% in H₂O MilliQ in rapporto 3:2) e FBS in rapporto 1:3, e conservato a –80 °C per massimo una settimana, prima dello stoccaggio in azoto liquido in appositi criotubi (Sterilin).

3.7.6 Caratterizzazione della linea stabilizzata

3.7.6.1 Cariotipizzazione

Da una fiaschetta, contenente un monostrato cellulare con confluenza dell’85–90% è stato aspirato il mezzo di coltura e sono stati effettuati alcuni lavaggi con PBS 1X a 37 °C. Sono stati

quindi aggiunti 500 µl di colcemide (Sigma–Aldrich), per bloccare il ciclo cellulare alla metafase, lasciando *overnight* in incubatore. La colcemide è stata aspirata ed è stato ottenuto un pellet tramite tripsinizzazione come descritto al paragrafo precedente. Il surnatante è stato eliminato lasciandone 500 µl, in cui è stato risospeso il pellet. Sono stati aggiunti 5 ml di KCl 0.06 M mantenendo in lieve agitazione e lasciando poi incubare per massimo 15 minuti a RT. Dopo una centrifugazione a 600 g per 10 minuti è stato eliminato il surnatante lasciandone 500 µl, risospingendovi poi il pellet. Sono stati aggiunti 5 ml di fissativo di Carnoy (acido acetico e metanolo in rapporto 1:3) lentamente e mantenendo in agitazione per evitare l'aggregazione delle cellule, lasciando poi incubare per 30 minuti a RT. Dopo una centrifugazione a 600 g per 5 minuti, il surnatante è stato eliminato lasciandone 500 µl, risospingendovi il pellet. Sono stati aggiunti in due turni consecutivi altri 5 ml di fissativo di Carnoy, eliminando 500 µl di surnatante e risospingendovi il pellet. La sospensione cellulare finale è stata aliquotata goccia a goccia su vetrini portaoggetto a una temperatura di –80 °C da un'altezza di almeno 20 cm, lasciando poi essiccare all'aria. I vetrini sono stati immersi in soluzione Giemsa (5 ml di Giemsa 1% in metanolo e glicerolo in rapporto 1:1, 95 ml di H₂O MilliQ e 3–4 gocce di NH₄OH) per 5–6 minuti a RT, per poi essere lavati rapidamente due volte in acetone, una volta in acetone e xilene in rapporto 1:1 e infine in xilene. I vetrini sono stati montati con balsamo a base di xilolo oppure lasciati riposare per massimo 2–7 giorni prima di essere sottoposti a bandeggio cromosomi. Le immagini sono state ottenute con microscopio ottico (Olympus Vanox AHBT3) ed acquisite con software CellB (Olympus). Le immagini acquisite sono state modificate ed elaborate con software Adobe Photoshop Elements 6.0.

3.7.6.2 G–banding

Per il bandeggio dei cromosomi sono stati utilizzati due diversi protocolli di G–banding, il primo secondo Hay et al. (2000), il secondo tratto da Drets e Shaw (1971). Il primo protocollo prevedeva di incubare i vetrini cariotipizzati per 10 minuti in PBS pH 6.8 a 60 °C. Appena prima di utilizzarla è stata preparata la *Staining Solution* (6.5 ml di PBS pH 6.8, 0.55 ml di tripsina 1% in H₂O, 2.5 ml di metanolo assoluto, 0.22 ml di Giemsa 1% in metanolo e glicerolo in rapporto 1:1). Su ogni vetrino è stato depositato 1 ml di *Staining Solution* lasciato agire per 15 minuti. Dopo un lavaggio in H₂O MilliQ i vetrini sono stati montati come descritto al paragrafo precedente. Seguendo il secondo protocollo invece, i vetrini sono stati immersi per 30 secondi in una soluzione NaOH 70 mM e NaCl 112 mM in H₂O pH 12. Dopo tre lavaggi successivi da 5–10 minuti ciascuno in 12X SSC pH 7.0 (105.2 g/l NaCl + 52.9 g/l trisodio citrato in H₂O MilliQ), i vetrini sono stati incubati in 12X SSC a 65 °C per 60–72 h, lavati tre volte in etanolo al 70% per 3 minuti, altre tre

volte in etanolo al 35% per 3 minuti. Dopo altri 5–6 minuti in soluzione Giemsa (5 ml di Giemsa 1% in metanolo e glicerolo in rapporto 1:1, 95 ml di H₂O MilliQ e 3–4 gocce di NH₄OH) i vetrini sono stati lavati in H₂O MilliQ e montati come descritto al paragrafo precedente.

3.7.6.3 Immunocitochimica

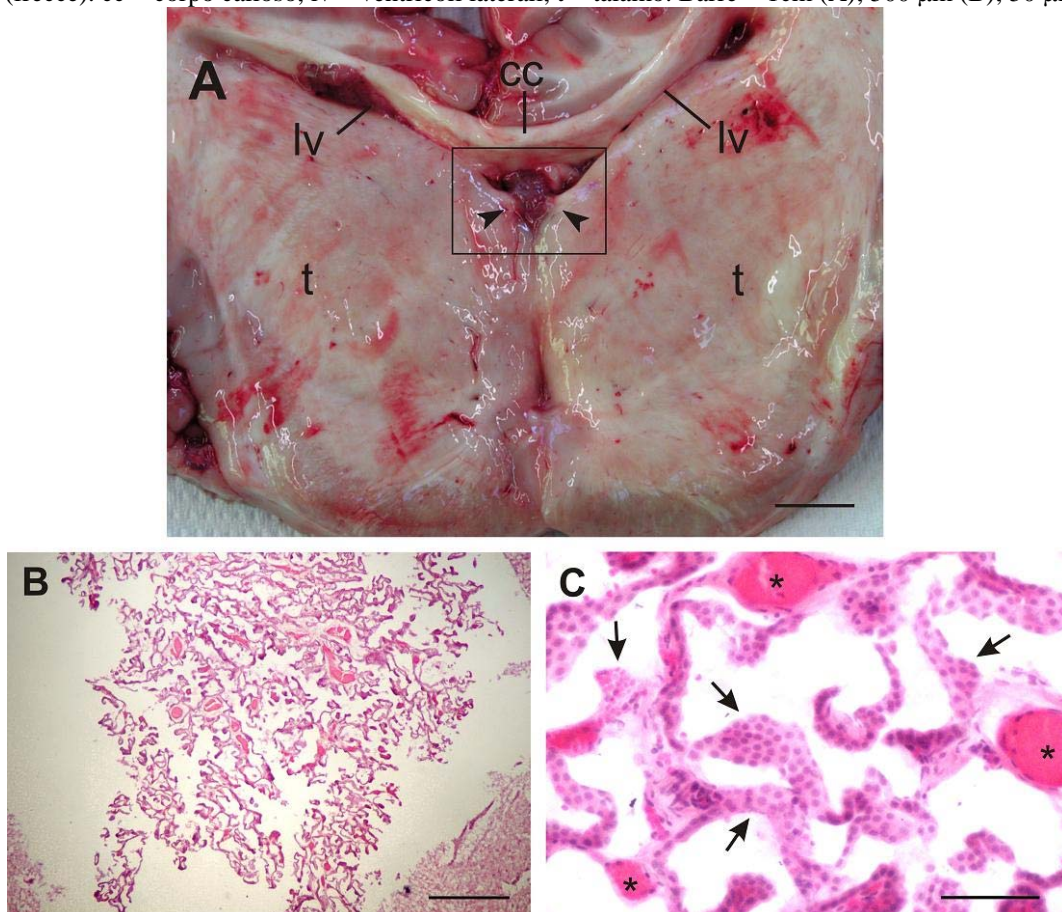
Le colture cellulari per l'immunoistochimica sono state fatte crescere su piastre Petri da 2 ml con un vetrino coprioggetto posto sul fondo. Al raggiungimento di una confluenza dell'85–90% il mezzo è stato eliminato e le cellule sono state fissate per 30 minuti con 2 ml di paraformaldeide al 4% in PBS a RT. La paraformaldeide è stata eliminata, lavando poi la Petri per 2–3 volte con PBS 1X. Per permeabilizzare le cellule sono stati quindi aggiunti in ogni Petri 0.5 ml di Triton X–100 (Sigma–Aldrich) allo 0,3% in PBS. Il tutto è stato messo ad incubare per 10 minuti a 4 °C. Eliminato il Triton X–100, dopo altri 3 lavaggi successivi con PBS, i vetrini sono stati incubati *overnight* a 37 °C con gli anticorpi primari a una diluizione pari a 1:50 in BSA 1% in PBS pH7.0. Per marcare le cellule di origine epiteliale è stato scelto un anticorpo monoclonale prodotto in topo (clone AE1/AE3) contro le citocheratine umane (M3501529, Dako), mentre per le cellule di origine mesodermica (es. fibroblasti, condrociti, endotelociti) è stato scelto un anticorpo monoclonale prodotto in topo contro la vimentina umana (v2258, Sigma). Per verificare l'espressione di HIOMT è stato invece usato lo stesso anticorpo rabbit anti–human HIOMT impiegato per l'immunoistochimica (v. paragrafo 3.4.2). Come controllo positivo è stato omesso l'anticorpo primario. Per eliminare l'anticorpo primario in eccesso sono stati eseguiti tre lavaggi successivi in PBS 1X da 10 minuti ciascuno, poi i vetrini marcati per le proteine citoscheletriche sono stati incubati per 1 h a 37 °C con anticorpo secondario, un goat anti–mouse IgG coniugato con FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*) (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:100 in BSA 1% in PBS. Nel caso delle cellule marcate per HIOMT l'anticorpo secondario era invece un goat anti–rabbit IgG coniugato con TRITC (*Tetramethyl Rhodamine Iso–Thiocyanate*) (Dako) a una diluizione finale di 1:500. Dopo un veloce lavaggio del vetrino in H₂O MilliQ i vetrini sono stati montati con montante a base di Mowiol (Polysciences), e osservati con un microscopio Olympus Vanox AHB3.

4. RISULTATI

4.1 Campioni di encefalo di tursiope

Fra tutti gli encefali di tursiope esaminati, nessuno presentava un corpo pineale riconoscibile macroscopicamente. In unico caso (ID 107) è stata osservata la presenza di una formazione di natura dubbia nel terzo ventricolo, che per posizione e dimensioni era compatibile con quelle di una ghiandola pineale (Fig. 4.1A). Basalmente a questa formazione sono state osservate anche due porzioni simmetriche di tessuto di provenienza talamica, potenzialmente riconducibili alle *striae habenularis thalami* (N.A.V.). L'analisi istologica ha rivelato che il corpuscolo era formato da pliche di tessuto epiteliale cuboidale molto convoluto, che delimitava uno stroma con scarso tessuto connettivo e molti capillari (Fig. 4.1B–C). Queste caratteristiche indicano che non si tratta di una ghiandola pineale ma di una porzione del plesso corioideo, che si sviluppa sul tetto del terzo ventricolo.

Figura 4.1. Encefalo di tursiope (ID 107). (A) Sezione coronale con in evidenza il corpuscolo (rettangolo) somigliante a una ghiandola pineale e le supposte strie midollari del talamo (punte di freccia). (B–C) La colorazione con ematossilina-eosina (EE) delle sezioni del corpuscolo evidenzia la struttura composta da pliche di epitelio cuboidale (freccie) e capillari (asterischi) tipiche del plesso corioideo (freccie). cc = corpo calloso, lv = ventricoli laterali, t = talamo. Barre = 1cm (A); 500 μ m (B); 50 μ m (C).



4.2 Quantificazione melatonina

I risultati della quantificazione di melatonina per entrambi i gruppi sono elencati in Tab. 4.1 e 4.2.

Tabella 4.1. Livelli di melatonina (in pg/ml) nei campioni di plasma usati per valutare le variazioni stagionali.

Gruppo A							
	DIC	GEN	FEB	MAR	APR	MAG	GIU
RM1	12,90	10,57	11,54	9,64	7,13	7,95	12,67
RM2	13,25	11,64	11,93	12,91	11,78	13,03	13,35
RM3	18,04	17,57	20,57	23,01	18,11	20,86	19,20
RM4	20,37	24,33	22,63	25,35	18,38	21,50	16,99
Gruppo B							
	FEB	MAR	APR	MAG	GIU	LUG	AGO
PT1	16,36	21,65	21,36	22,31	14,76	10,94	27,56
PT2	14,21	9,59	14,72	14,16	7,60	12,04	15,24
PT3	11,55	17,65	14,58	11,58	8,73	10,26	25,43
PT4	12,26	12,72	14,77	15,11	8,25	9,77	24,53
PT5	6,02	11,38	14,73	13,88	5,15	6,89	19,35
PT6	15,13	21,71	19,47	16,03	11,35	27,74	/
PT7	/	16,53	15,84	/	7,61	10,77	/
PT8	/	/	/	19,48	11,03	23,04	20,70

/, non determinato; DIC, Dicembre; GEN, Gennaio; FEB, Febbraio; MAR, Marzo; APR, Aprile; GIU, Giugno; LUG, Luglio; AGO, Agosto

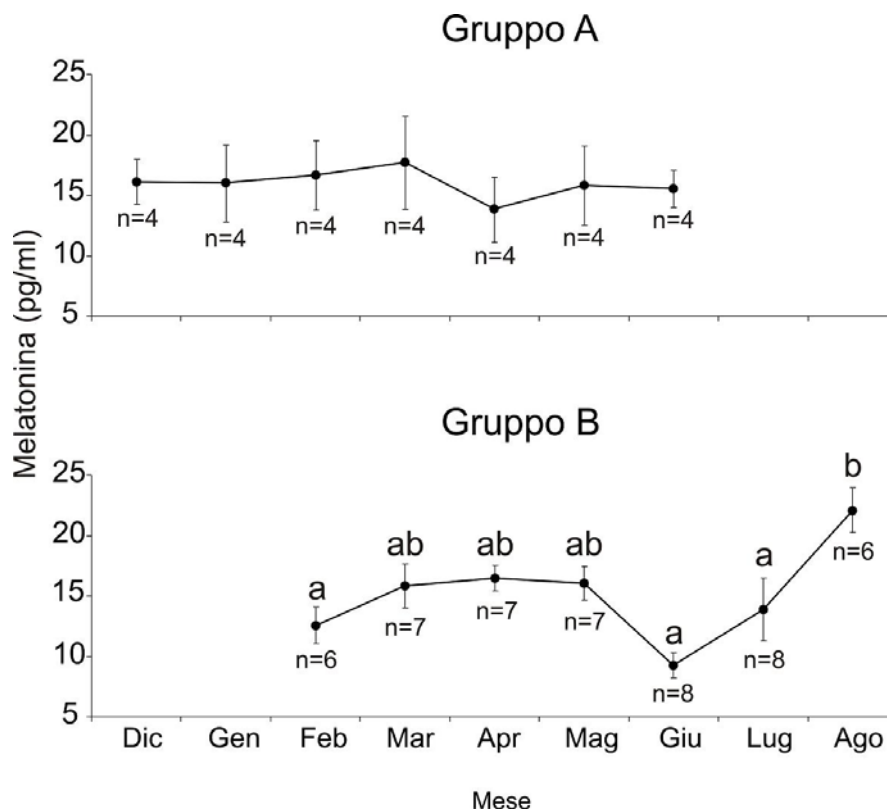
Tabella 4.2. Livelli di melatonina (in pg/ml) nei campioni di plasma usati per valutare le variazioni giornaliere.

Gruppo A												
	DICEMBRE						GIUGNO					
	GIORNO 1		GIORNO 2		GIORNO 3		GIORNO 1		GIORNO 2		GIORNO 3	
	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.
RM1	/	/	9,96	14,38	11,39	15,37	10,93	12,23	17,80	/	9,27	22,94
RM2	11,23	17,48	12,09	17,05	10,94	15,11	9,62	18,15	15,7	/	14,73	14,69
RM3	18,41	24,59	18,33	19,80	19,08	21,95	21,15	27,22	19,83	/	16,61	16,92
RM4	23,62	/	19,1	16,04	22,17	23,17	15,68	/	16,57	/	18,71	29,69
Gruppo B												
	FEBBRAIO				AGOSTO							
	GIORNO 1		GIORNO 2		GIORNO 1		GIORNO 2					
	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.				
PT1	16,80	34,59	15,92	24,57	24,70	/	30,42	42,90				
PT2	15,41	16,71	13,02	49,18	18,80	/	11,68	/				
PT3	8,34	29,28	14,77	28,95	25,88	26,34	24,98	38,74				
PT4	14,50	18,16	10,01	/	26,66	24,67	22,41	33,16				
PT5	/	/	/	/	21,36	19,71	17,33	24,43				
PT6	/	/	/	/	/	/	/	/				
PT7	/	/	/	/	/	/	/	/				
PT8	/	/	/	/	/	/	/	/				

/, non determinato; a.m., antimeridiano (10.00h circa); p.m., pomeridiano (17.00h circa); DIC, Dicembre; GEN, Gennaio; FEB, Febbraio; MAR, Marzo; APR, Aprile; GIU, Giugno; LUG, Luglio; AGO, Agosto

Il disegno di campionamento non è stato pienamente rispettato ed il numero totale di campioni raccolti è stato molto inferiore rispetto a quanto atteso, sia a causa della cooperazione instabile da parte di alcuni individui, sia per l'insufficiente volume di sangue ottenuto durante i prelievi. In Giugno (gruppo A), Febbraio ed Agosto (gruppo B) non è stato fatto un prelievo durante la prima settimana come negli altri mesi (per la valutazione della variazione stagionale). Per questo motivo è stato considerato il primo dei prelievi mattutini dei giorni consecutivi nella seconda settimana come prelievo "mensile". Le concentrazioni dei campionamenti mensili per il gruppo A variano fra 7.13 (RM1, Marzo) e 25.35 pg/ml (RM4, Marzo), mentre per il gruppo B fra 5.15 pg/ml (PT5, Giugno) e 27.74 pg/ml (PT6, Luglio). I valori mostrano un pattern distinto per ogni individuo, con il gruppo A caratterizzato da fluttuazioni modeste, a differenza del gruppo B. In Fig. 4.2 sono rappresentati gli andamenti dei valori medi di ogni mese per entrambe le località.

Figura 4.2. Andamento dei valori medi di melatonina (in pg/ml) per ogni mese, separatamente per i gruppi A e B. Dic, Dicembre; Gen, Gennaio; Feb, Febbraio; Mar, Marzo, Apr, Aprile; Mag, Maggio; Giu, Giugno; Lug, Luglio, Ago, Agosto. Le lettere minuscole indicano valori significativamente diversi.



Per il gruppo A non è stata osservata una variazione significativa (ANOVA; $F = 0.202$, $P = 0.972$), con valori medi compresi fra 13.85 ± 2.71 pg/ml (Aprile) e 17.73 ± 3.82 pg/ml (Marzo). Per il gruppo B invece è stata ottenuta una concentrazione significativamente maggiore ad Agosto (23.02 pg/ml) rispetto a Febbraio (13.27 pg/ml; $P = 0.010$), Giugno (9.31 pg/ml; $P = 0.000$) e Luglio

(14.13 pg/ml; $P = 0.025$). Confrontando le medie dei mesi in comune fra le due località (Febbraio – Giugno) non è stata trovata nessuna differenza significativa (GLM, $F = 1.646$; $P = 0.179$). Per verificare l'eventuale influenza della gravidanza tra le femmine, sono state confrontate le medie dei valori diurni all'interno del gruppo B e poi comprendendo l'unica femmina del gruppo A, non osservando alcuna differenza significativa fra gravide e non gravide né nel primo ($P = 0.803$) né nel secondo caso ($P = 0.921$) (Fig. 4.3). Considerando tutti gli individui di entrambi i gruppi in 3 classi d'età (con meno di 10 di età, fra 10 e 20 anni, con più di 20 anni), si osserva un valore medio significativamente maggiore (ANOVA, $P = 0.000$) negli esemplari più giovani (20.30 pg/ml) rispetto sia a quelli d'età intermedia (11.89 pg/ml) che ai più vecchi (14.51 pg/ml) (Fig. 4.4).

Fig. 4.3. Confronto tra le medie dei valori mattutini di melatonina (in pg/ml) delle femmine gravide (G) e di quelle non gravide (NG). In un caso sono state comprese le femmine del solo gruppo B (A), nell'altro caso è stata compresa anche la femmina RM4 del gruppo A (B)

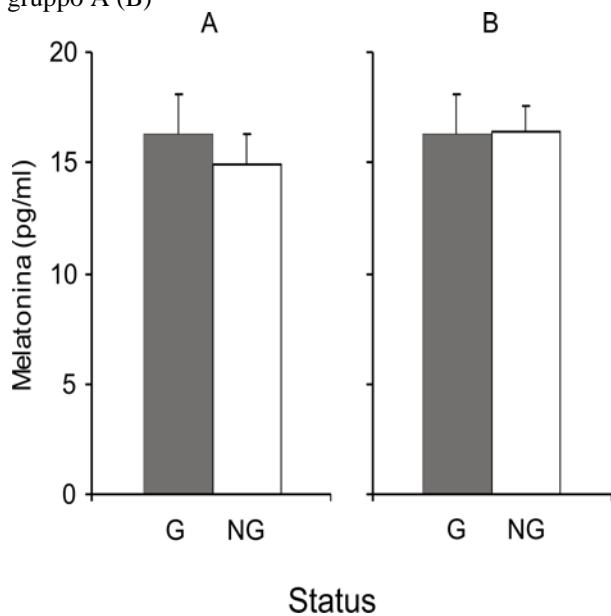
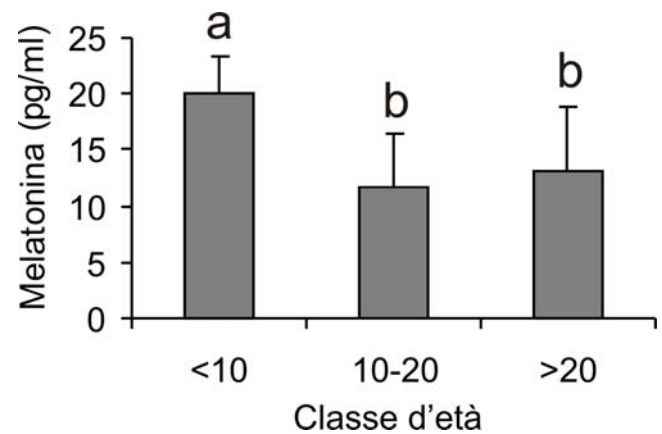


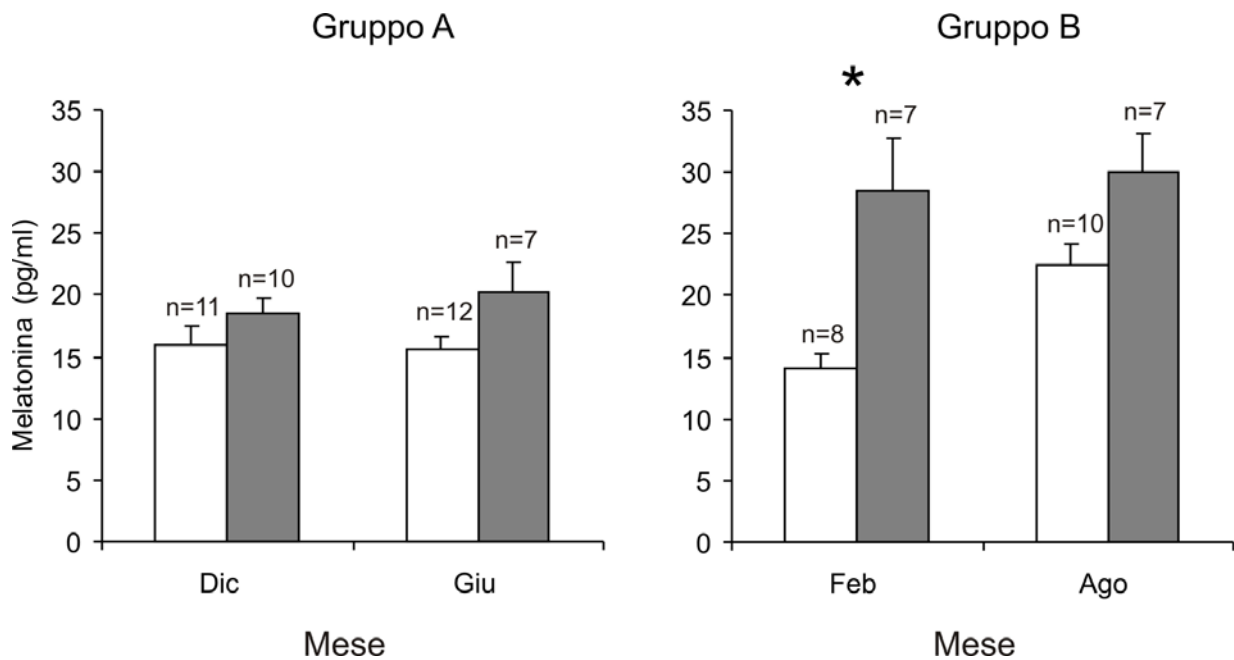
Fig. 4.4. Confronto tra le medie dei valori mattutini di melatonina (in pg/ml) di tutti gli individui dei gruppi A e B suddivisi in classi d'età in anni. Le lettere minuscole indicano valori significativamente diversi.



Per quanto riguarda le variazioni giornaliere della concentrazione, sia nei mesi estivi che in quelli invernali, in tutti gli individui i valori si sono rivelati quasi sempre maggiori per i prelievi pomeridiani rispetto a quelli mattutini. L'aumento percentuale variava tra 101.78% e 377.7%, con una media del 159.9%. Le uniche eccezioni riguardavano quattro confronti su un totale di ventisette, in cui i valori mattutini erano leggermente superiori rispetto a quelli pomeridiani. Per ogni esemplare, il confronto tra la media dei prelievi mattutini e quella dei prelievi pomeridiani non ha rivelato differenze significative, né per il gruppo A (GLM; post-hoc di Tukey, $P = 0.163$) né per il gruppo B ($P = 0.052$). Tuttavia, riunendo in *pool* i prelievi mattutini e quelli pomeridiani separatamente per ogni mese e per ogni località, è stato osservato nel gruppo B un aumento

significativo dei valori pomeridiani di Febbraio rispetto a quelli mattutini ($P = 0.004$), mentre per Agosto ($P = 0,191$) questo non si verificava (Fig. 4.5). Analogamente, nel gruppo A non è emersa una differenza significativa né a Dicembre ($P = 0.627$) né a Giugno ($P = 0.166$).

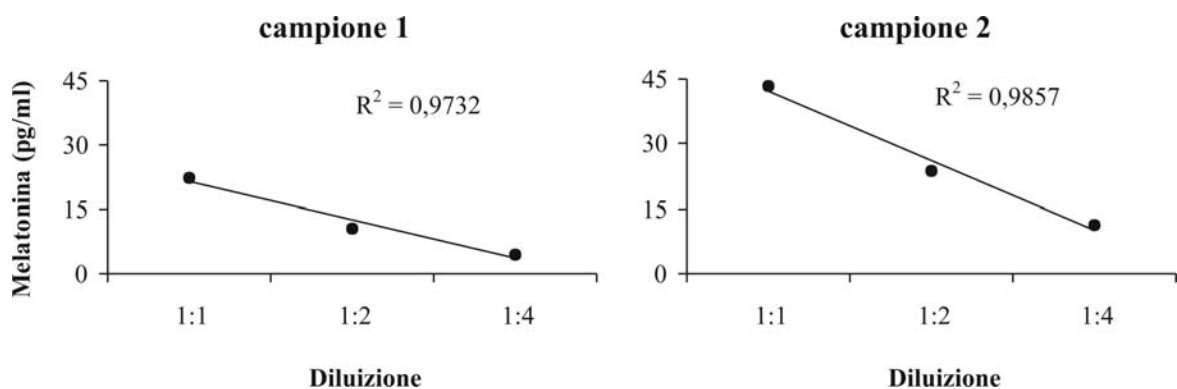
Figura 4.5. Valori medi di melatonina (in pg/ml) per ogni mese calcolati dal pool dei valori di tutti gli individui, separatamente per ogni mese e per i due gruppi. Dic, Dicembre; Feb, Febbraio; Giu, Giugno; Ago, Agosto.



4.2.1 Parallelismo

Il test condotto sui campioni provenienti dal gruppo C (aventi concentrazioni con range 13.7 – 43.5 pg/ml), ha rivelato un buon grado di parallelismo, dimostrato dal valore dei coefficienti di regressione R^2 sempre maggiori di 0.9, come mostrato dagli esempi in Fig. 4.6. Non è stato possibile ricavare i valori di concentrazione corrispondenti alla diluizione 1:8, inizialmente prevista, poiché questi erano sempre sotto la soglia di sensibilità.

Figura 4.6. Esempi di test di parallelismo su due campioni di plasma del gruppo C, che mostra la diminuzione della concentrazione di melatonina (in pg/ml) con diluizioni progressive (1:1, 1:2 e 1:4)



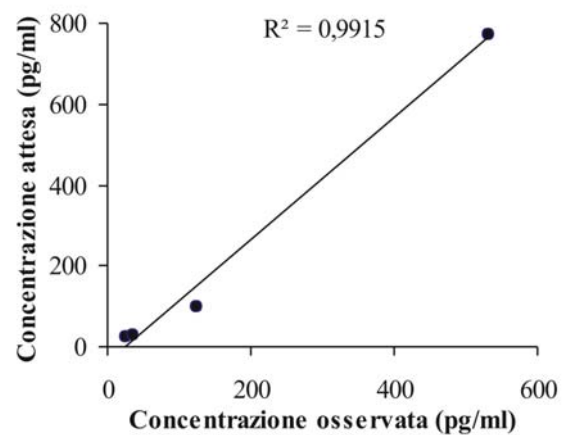
4.2.2 Recupero

Fra i campioni dei gruppi A e B, nessuno aveva un volume residuo sufficiente per effettuare un test di recupero. È stato quindi costituito un *pool* con quattro campioni con concentrazione simile, a cui sono state aggiunte le aliquote di standards di melatonina come descritto al paragrafo 3.3.1. Il test ha dimostrato un buon grado di corrispondenza fra valori attesi ed osservati, con un recupero compreso fra 102.5% e 123.3%, anche se il campione addizionato con lo standard più alto (750 pg/ml) ha mostrato un recupero del 68% (Tab. 4.3). L'elevato valore di R^2 dimostra comunque l'affidabilità del test (Fig. 4.7).

Tabella 4.3. Campioni utilizzati per i test di recupero, con indicati il nome del campione, i livelli di melatonina (in pg/ml) attesi e osservati, e la relativa percentuale di recupero.

CAMPIONE	ATTESI (pg/ml)	OSSERVATI (pg/ml)	RECUPERO (%)
Pool	25,2	25,8	102,46
Pool + 25 pg/ml	32,7	34,7	106,05
Pool + 75 pg/ml	100,2	123,6	123,32
Pool + 750 pg/ml	775,2	531,8	68,60

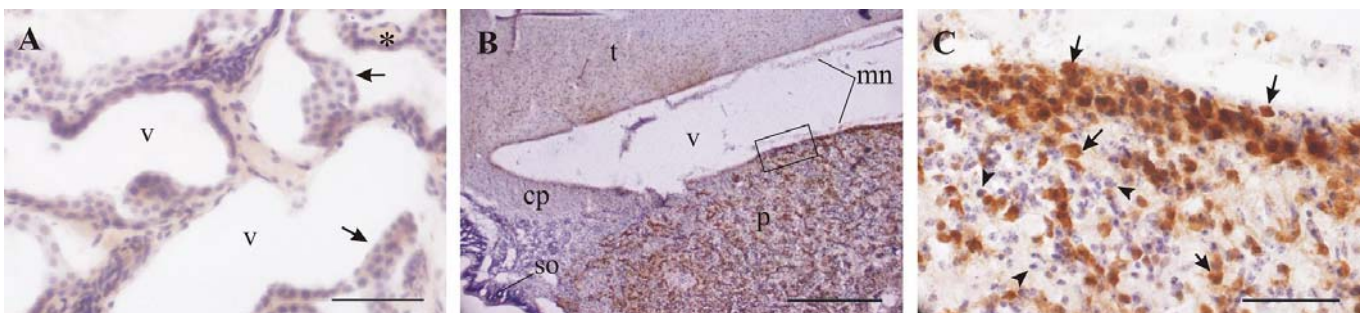
Fig. 4.7. Grafico della retta di interpolazione dei valori di concentrazione di melatonina attesi (in pg/ml) plottati con quelli osservati.



4.3 Immunoistochimica

La ghiandola pineale bovina si è dimostrata fortemente immunoreattiva, con una marcatura omogenea del citoplasma dei pinealociti, diffusi in tutto il parenchima (Fig. 4.8A–B).

Figura 4.8. Immunoistochimica contro HIOMT su sezioni di epitalamo di tursiope (ID 107) (A) e pineale bovina (B–C). (A) L'epitalamo, in cui si riconoscono l'epitelio (frecche) e un capillare (asterisco), è risultato immunonegativo. Nella pineale si notano i numerosi pinealociti immunoreattivi (frecche) e molte altre cellule non positive, probabilmente astrociti (punte di freccia); (C) rappresenta un ingrandimento del particolare nel rettangolo in (B). cp, commissura posteriore; mn, meningi; so, organo subcommissurale; p, pineale; t, talamo; v, spazio ventricolare. Barre = 100 μ m (A), 500 μ m (B), 50 μ m (C).

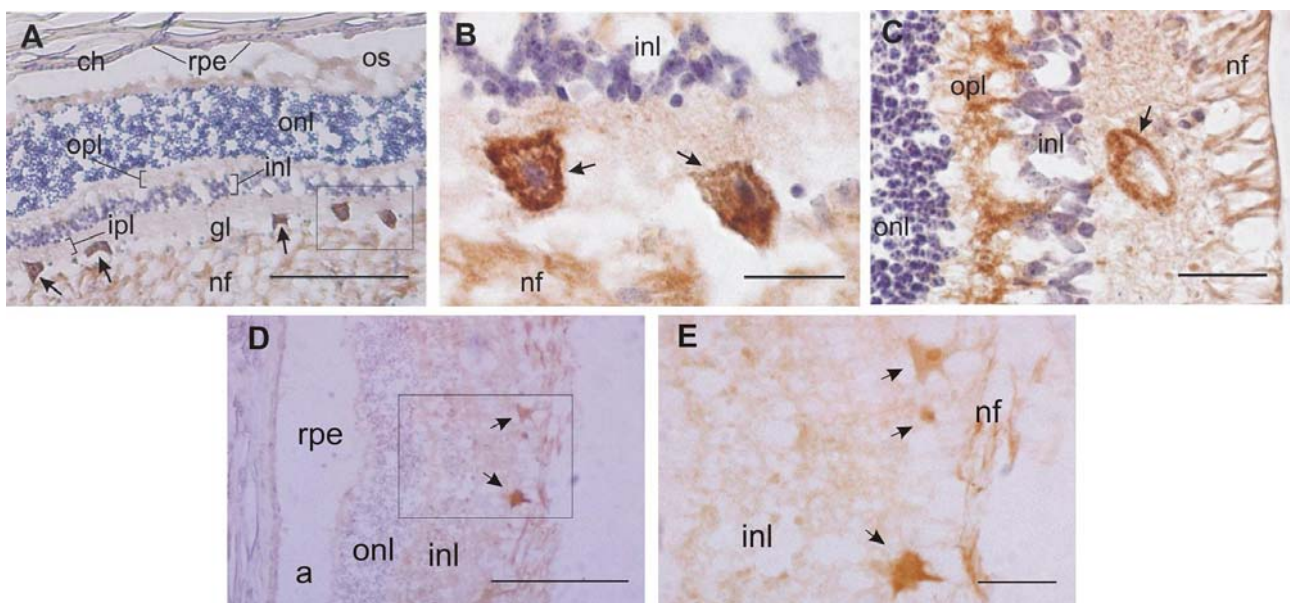


È stata osservata una maggiore abbondanza di pinealociti disposti in uno strato corticale, rispetto al resto della ghiandola, come riportato in letteratura per questa specie (Sato et al 1994). La struttura epitalamica del tursiope ID 107, descritta all'inizio di questa sezione e identificabile come plesso corioideo, non ha mostrato elementi immunopositivi (Fig. 4.8C). In tutti e tre i tessuti non nervosi di tursiope esaminati, al contrario, è stata riscontrata una marcata reattività anti-HIOMT-simile, indicando la possibile produzione dell'enzima.

4.3.1 Retina

Nella retina, la positività è stata riscontrata principalmente a carico di singole cellule, localizzate nello strato delle cellule gangliari (GL), e dello strato delle fibre nervose (NFL), i due strati retinici più interni (Fig. 4.9). Tali cellule si presentano a intervalli regolari lungo il perimetro della retina, suggerendo che si tratti di un tipo specifico di neurone gangliare tra quelli riconosciuti nei mammiferi (Masland 2001). Le cellule gangliari hanno un marcaggio molto forte in tutto il citoplasma, con grandi granuli visibili. In alcune sezioni di retina occasionalmente è stata osservata un'immunoreattività anche a carico dello strato plessiforme esterno (OPL), formato dalle interconnessioni fra i pirenofori dei fotorecettori e i corrispettivi neuro bipolari dello strato interno dei nuclei (IPL). In questo caso il marcaggio era più uniforme ma meno intenso. Lo stesso tipo di reattività è stato riscontrato anche nelle retine di stenella e capodoglio.

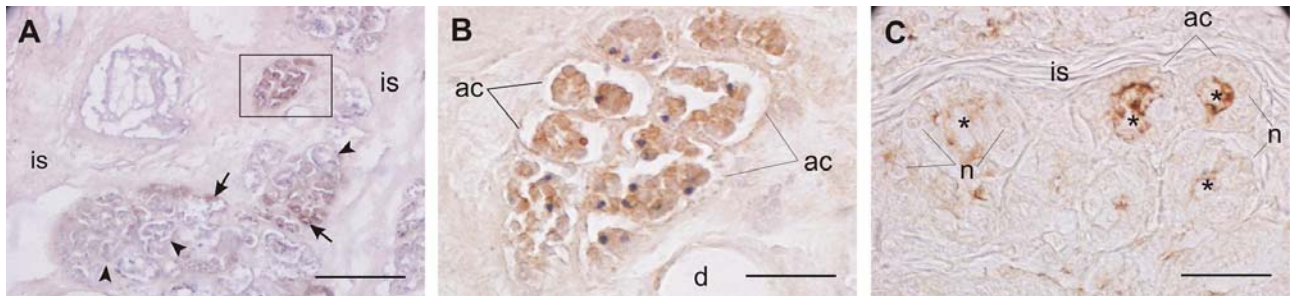
Figura 4.9. Immunoistochimica contro HIOMT su sezioni di retina di tursiope (A–C) e capodoglio (D–E). (B) e (E) rappresentano un ingrandimento del particolare nel rettangolo in (A) e in (D), rispettivamente. Si noti la forte reattività delle cellule gangliari (freccie), delle fibre del nervo ottico (A–E) e dello strato plessiforme esterno (C). a, artefatto; ch, corioide; gl, strato delle cellule gangliari; inl, strato interno dei nuclei; ipl, strato plessiforme interno, nf, strato delle fibre nervose; onl, strato esterno dei nuclei, opl, strato plessiforme esterno, os, strato dei segmenti esterni dei fotorecettori; rpe, strato retinico pigmentato. Barre = 500 µm (A, D), 50 µm (B–C), 100 µm (E).



4.3.2 Ghiandola di Harder

Nella ghiandola di Harder, cellule HIOMT-immunoreattivo-simili sono state trovate solo in alcuni lobuli, costituenti una percentuale molto ridotta dell'organo. All'interno di questi lobuli era presente un numero variabile di cellule immunopositive, con marcaggio prevalentemente diffuso in tutto il citoplasma (Fig. 4.10A–B). Nella ghiandola del tursiope ID 89 la reattività delle cellule era spesso concentrata anche verso il lume degli acini (Fig. 4.10C).

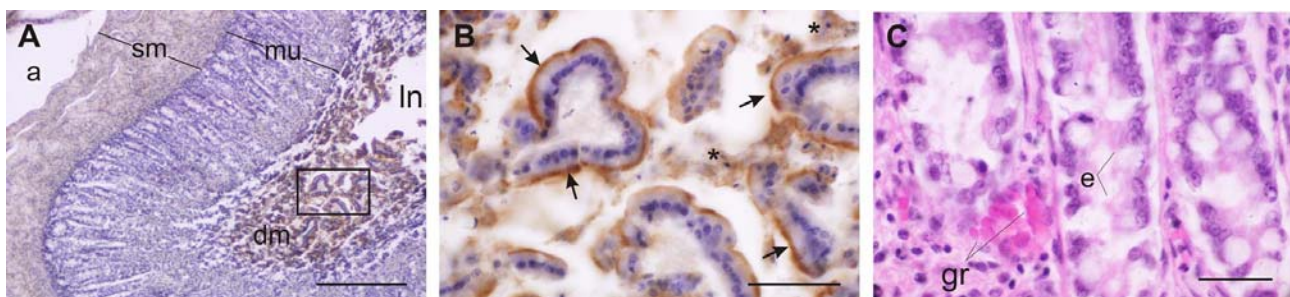
Figura 4.10. Immunoistochimica contro HIOMT su sezioni di ghiandola di Harder di tursiope. Si notano le cellule con reattività diffusa nel citoplasma (A–B) o concentrata verso il lume dell'acino (C) in alcuni lobuli (freccie); (B) rappresenta un ingrandimento del particolare nel rettangolo in (A). ac, acino secretorio; d, dotto secretorio; is, setto interlobare; n, nuclei. Barre = 500 µm (A), 100 µm (B–C).



4.3.3 Intestino

Nell'intestino l'architettura dell'organo era spesso alterata, a causa dei processi autolitici *post-mortem*, con conseguente distacco dell'epitelio dalle cripte di Lieberkühn e dalla mucosa superficiale che andava a riempire il lume (Fig. 4.11A). Erano comunque riconoscibili numerose file di enterociti ancora tenute insieme da giunzione occludenti apicali, sia nelle cripte (Fig. 4.11B) che nel lume intestinale (Fig. 4.11C).

Figura 4.11. Immunoistochimica contro HIOMT su sezioni di intestino di tursiope. Si nota la marcata reattività della parte apicale degli enterociti (freccie) come pure di altri elementi non identificabili (asterischi); (B) rappresenta un ingrandimento del particolare nel rettangolo in (A). a, artefatto; dm, mucosa distaccata; e, enterociti, gr, globuli rossi; ln, lume; mu, mucosa; sm, sottomucosa. Barre = 500 µm (A), 100 µm (B–C).

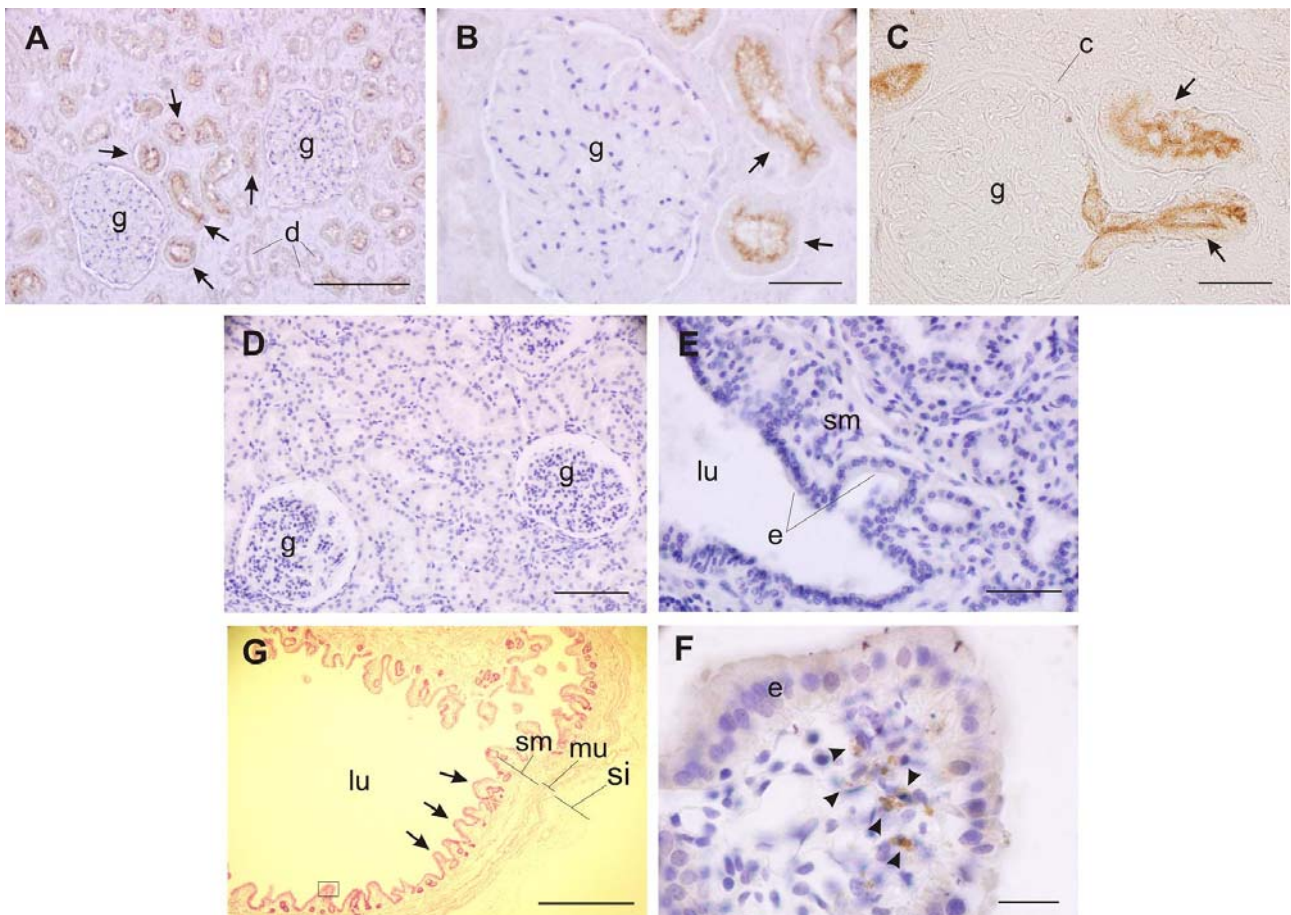


Una forte positività si riscontrava a carico della superficie apicale delle cellule assorbenti, verosimilmente in corrispondenza dell'orletto a spazzola. A volte si riscontrava una marcatura più debole anche a carico di altre cellule nelle vicinanze degli enterociti, di natura non ben definita, probabilmente riconducibili a detrito cellulare (Fig. 4.11B).

4.3.4 Altri tessuti

Fra tutti i tessuti non nervosi di tursiope, l'unico ad aver dimostrato un'immunoreattività anti-HIOMT-simile è stato il rene, mentre tutti gli altri non hanno dato riscontro positivo. Fra tutti i tessuti non nervosi di tursiope, l'unico ad aver dimostrato un'immunoreattività anti-HIOMT-simile è stato il rene, mentre tutti gli altri non hanno dato riscontro positivo.

Figura 4.12. Immunoistochimica contro HIOMT su sezioni di rene di tursiope (A–C), rene di bovino (D), digiuno di bovino (E) e cistifellea di pecora (G–F). Si nota la reattività dei tubuli prossimali del rene di delfino (freccie), al contrario del bovino (D), per il quale anche il digiuno è immunonegativo (E). Un forte marcaggio si nota invece nella cistifellea ovina (G–F) in gruppi di poche cellule nella sottomucosa (punte di freccia) in corrispondenza di pliche luminali della mucosa (freccie). c, capsula di Bowman; d, tubuli distali; e, enterociti g, glomerulo; lu, lume; mu, mucosa, sm, sottomucosa, si, sierosa. Barre = 50 µm (F), 100 µm (B–E), 500 µm (A, D), 1 mm (G).

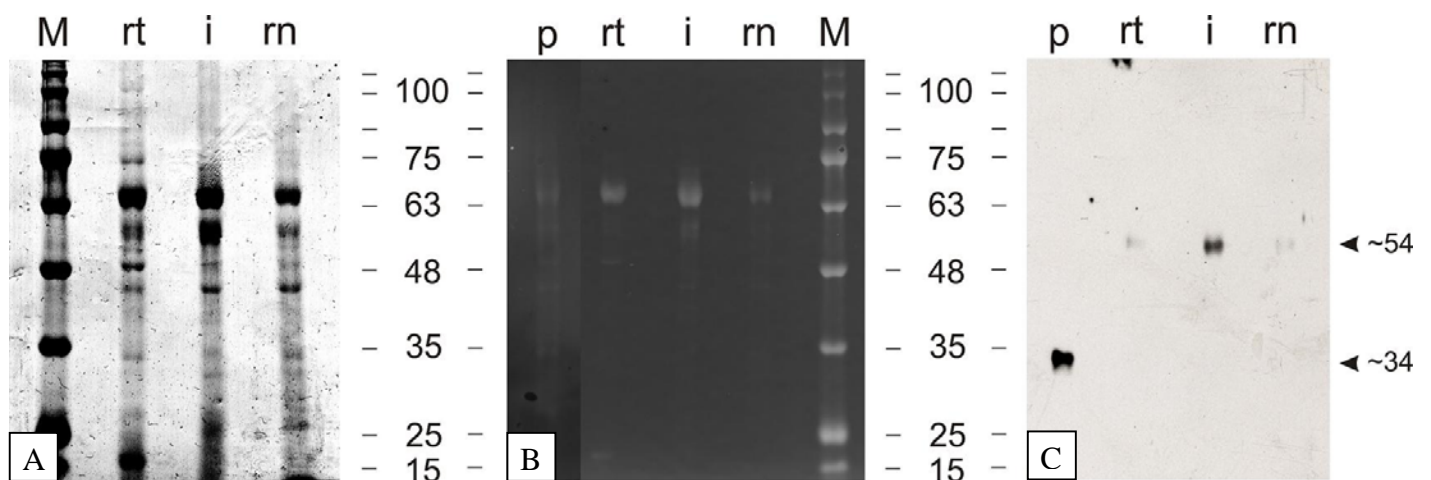


In particolare il marcaggio è stato osservato esclusivamente a carico dei tubuli contorti prossimali, riconoscibili per il maggiore spessore dell'epitelio rispetto a quello dei tubuli distali e per il fatto di trovarsi in continuità con l'epitelio della capsula di Bowman, come illustrato in Fig. 4.12A–C. Il rene di bovino, al contrario, non ha mostrato immunoreattività, nemmeno a carico dei tubuli contorti prossimali (Fig. 4.12D). Anche per quanto riguarda l'intestino di bovino, in cui l'epitelio ghiandolare era intatto, non è stato osservato alcun elemento immunoreattivo (Fig. 4.12E). Nella cistifellea di ovino, invece, è stata riscontrata positività in alcune cellule nello strato sottomucoso della ghiandola. Queste si trovavano in gruppi di 1–4 in corrispondenza dell'apice delle numerose pliche della mucosa (Fig. 4.12F–G).

4.4 Western blot

L'estrazione di campioni conservati a secco a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ha dato rese bassissime, con concentrazioni proteiche inferiori a $0.3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Al contrario, con i campioni conservati in RNAlater il saggio Bradford ha rivelato una buona efficienza di estrazione, con concentrazioni proteiche elevate (pineale bovina = $4.2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, retina bovina = $10.3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, retina tursiope = $3.9\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, intestino tursiope $3.9\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, intestino tursiope = $5.9\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ghiandola di Harder = $3.2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, rene tursiope = $4.0\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Di questi ultimi campioni sono stati caricati $6\text{ }\mu\text{g}$ di proteine totali in ogni *lane*.

Figura 4.13. (A) Corsa elettroforetica, visualizzata con Blu di Coomassie, dei campioni di pineale bovina, retina, intestino tenue e rene di tursiope. (B) Elettrotrasferimento delle bande proteiche su membrana di nitrocellulosa visualizzato con Rosso Ponceau. (C) Western Blot con in evidenza la banda da ca. 34 kDa riscontrata nella pineale bovina (p) e quella da ca. 54 kDa trovata nei tessuti di tursiope. i, intestino tenue; M, marker; p, pineale bovina; rn, rene; rt, retina.



La colorazione con Blu di Coomassie ha rivelato una discreta qualità estrattiva, con diverse bande distinte, in gran parte con pesi molecolari ricorrenti fra i campioni (Fig. 4.13A–B) e

corrispondenti a circa 34 kDa, 47 kDa, 50 kDa, 57 kDa, e 64.5 kDa. Apparentemente le proteine con peso molecolare più basso sembravano non essersi trasferite su membrana di nitrocellulosa, come visualizzato con Rosso Ponceau (Fig. 4.13B), tuttavia il Western Blot ha evidenziato una banda molto intensa di peso molecolare di circa 34 kDa nel campione di pineale bovina. In tutti e tre i tessuti di delfino invece, è emersa una banda corrispondente a circa 54 kDa, più marcata nel campione di intestino rispetto a quelli di retina e rene.

4.5 Estrazione RNA tessuti ID 196

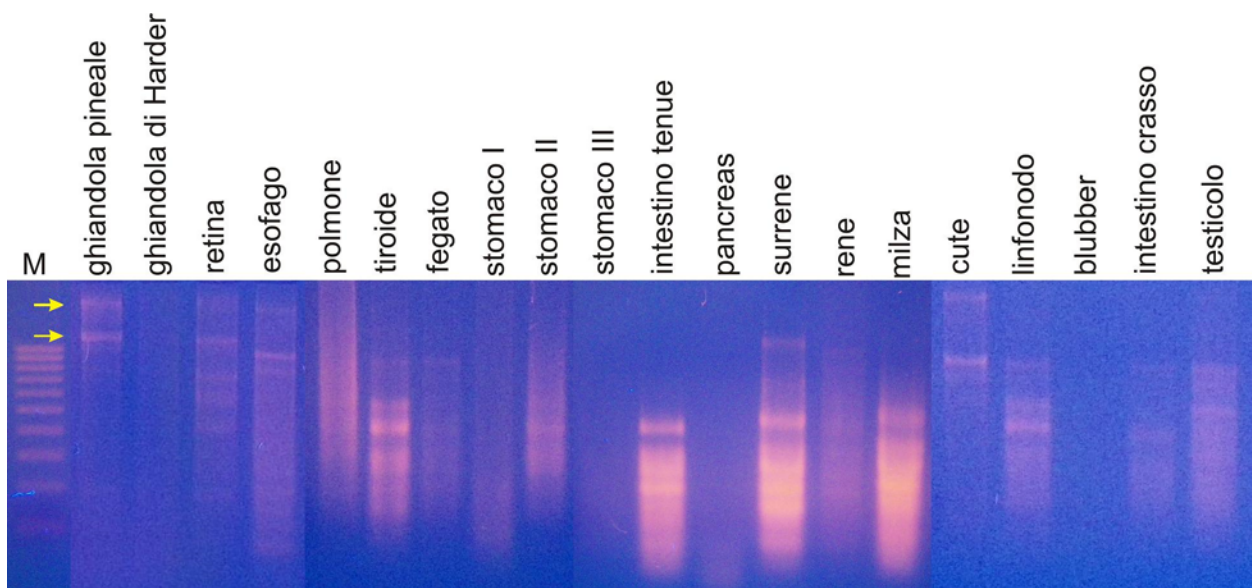
In Tab. 4.4 sono elencati i tessuti da cui è stato estratto l'RNA totale per le successive PCR, con indicata la concentrazione e il grado di purezza, dato dal rapporto fra il valore di assorbanza a una lunghezza d'onda (λ) di 260 nm e quello a $\lambda = 280$ nm.

Tabella 4.4. Concentrazione totale e relativo grado di purezza dell'RNA estratto dai tessuti del tursiopo ID196. Stomaco I, II e III indicano rispettivamente la prima, la seconda e la terza concamerazione gastrica.

TESSUTO	RNA totale ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	PUREZZA
Ghiandola pineale (bovino)	1.8	1.8
Ghiandola di Harder	1.1	1.7
Retina	0.7	1.6
Esofago	1.2	1.8
Polmone	0.7	1.6
Tiroide	2.3	1.7
Fegato	2.4	1.9
Stomaco I	1.5	1.8
Stomaco II	1.4	1.8
Stomaco III	0.4	1.6
Pancreas	0.9	1.6
Intestino tenue	2.4	1.7
Surrene	3.0	1.8
Rene	0.8	1.5
Milza	3.0	1.9
Cute	1.3	1.6
Linfonodo prescapolare	0.5	1.6
Blubber	0.2	1.4
Intestino crasso	0.3	1.6
Testicolo	0.6	1.6

I valori di purezza (adimensionali) più vicini a 2 indicano un maggior grado di purezza, ovvero un minor grado di contaminazione da parte di DNA. Per i tessuti di tursiope i valori erano sempre maggiori di 1.6, tranne per il rene (1.5), indicando nel complesso una buona resa estrattiva. La corsa elettroforetica dei campioni estratti ha rivelato tuttavia una qualità relativamente bassa dell'RNA. I tessuti in cui sono ben evidenti le bande corrispondenti agli rRNA 18S e 28S erano solo 4 (pineale bovina, retina, esofago e cute), mentre era visibile solo il 18S in altri 5 (tiroide, fegato, linfonodo, intestino crasso e testicolo). I campioni di polmone, intestino tenue, surrene, milza e stomaco II presentavano molto *smear*, indice di degradazione dell'RNA, anche se negli ultimi tre era riconoscibile almeno una banda maggiore di 400 bp. I campioni di ghiandola di Harder, stomaco I e III, pancreas e blubber non mostravano alcuna banda, probabilmente per la bassa quantità di RNA estratta.

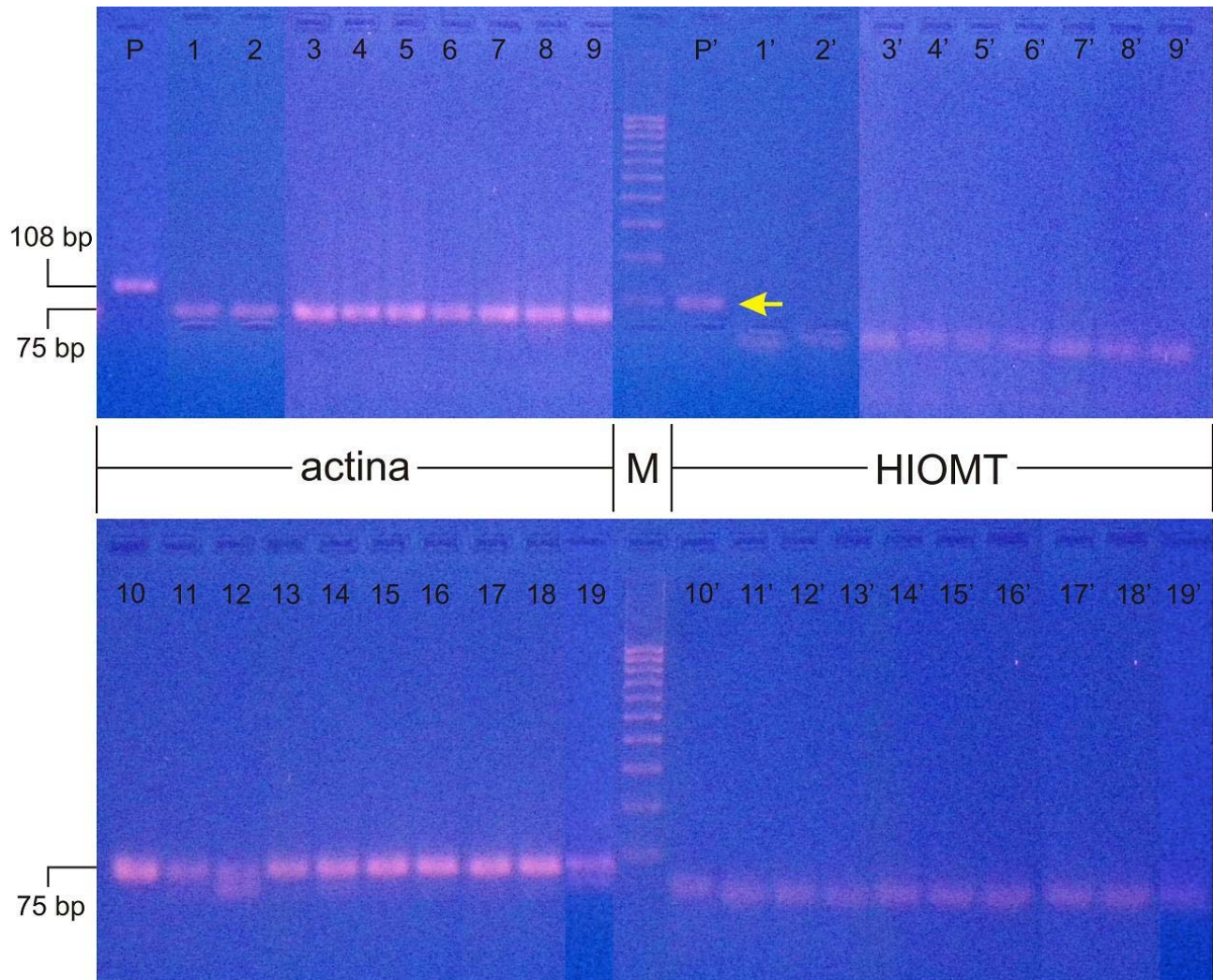
Figura 4.14. Elettroforesi su gel di agarosio dei campioni di RNA estratto da campioni di tursiope e da pineale bovina (*lane P*). Le due frecce gialle indicano le bande corrispondenti agli rRNA 18S e 28S. Nella prima *lane* (*M*) è caricato il marker (100–1000 bp).



4.6 PCR per HIOMT

Fra i diciannove tessuti di tursiope, la PCR con i primer disegnati sulla sequenza di HIOMT di bovino (BOV) non ha fornito alcun riscontro positivo (Fig. 4.25). Per il campione di pineale bovina invece è stata ottenuta una banda del peso molecolare previsto, ovvero 108 bp. La PCR con i primer di β -actina di tursiope, come controllo positivo, ha rivelato l'espressione dell'mRNA della proteina, indicando quindi l'integrità dei campioni di cDNA retrotrascritti. Tuttavia i primer di bovino non si sono dimostrati specifici per la sequenza di HIOMT di tursiope.

Figura 4.15. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti PCR dei cDNA di β -actina di bovino (P), β -actina di tursiope (1–9 e 10–19), e HIOMT di bovino (P', 1'–9' e 10'–19'). Le lane numerate corrispondono a ghiandola di harder (1), retina (2), esofago (3), polmone (4), tiroide (5), fegato (6), stomaco I (7), stomaco II (8), stomaco III (9), intestino tenue (10), pancreas (11), surrene (12), rene (13), milza (14), cute (15), linfonodo (16), blubber (17), intestino crasso (18) e testicolo (19). La freccia gialla indica la banda da 108 bp corrispondente all'amplicone di HIOMT bovina. Le bande di circa 40 bp, ottenute per i campioni di tursiope corrispondono a dimeri di primer. Le M indicano le lane con il marker da 100 bp a 1000 bp.



Data l'affidabilità incerta dei primer disegnati sulle sequenze predette del gene HIOMT di tursiope (v. paragrafo 2.6.1), per le relative PCR sono stati utilizzati solo i principali tessuti d'interesse, ovvero quelli positivi all'immunoistochimica (retina, intestino, ghiandola di Harder), più un campione di intestino crasso. Sia con i primer disegnati sull'esone 14 (EX14) che con quelli disegnati sulla sequenza CONTIG1 non è stato ottenuto alcun segnale positivo (Fig. 4.16). Anche in questo caso l'integrità dei cDNA era dimostrata dalle bande corrispondenti all'actina. Per verificare se il problema potesse essere dovuto all'insufficiente quantità di cDNA caricato, oppure alle condizioni di reazioni non idonee per l'attecchimento dei primer, sono state ripetute delle PCR utilizzando cDNA di retina di tursiope, considerato il tessuto più affidabile. Per aumentare la concentrazione di cDNA è stata condotta un PCR "nidificata" (anche se il termine è improprio)

usando come substrato il prodotto di amplificazione della PCR ottenute precedentemente con i primer per BOV, per EX14 e CONTIG1. Per testare l'influenza di diverse temperature di annealing sulla resa di amplificazione sono state eseguite delle PCR a dieci diverse temperature comprese fra 54 °C e 65 °C.

Figura 4.16. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotto di PCR dei cDNA di β -actina (1-4) e di HIOMT con i primer disegnati su EX14 (1'-4') e su CONTIG1 (1''-4''). Le lane numerate corrispondono a retina (1,1' e 1''), ghiandola di Harder (2, 2' e 2''), intestino tenue (3, 3' e 3'') e intestino crasso (4, 4' e 4'') mentre la lane M è caricata il marker da 100 bp a 1000 bp.

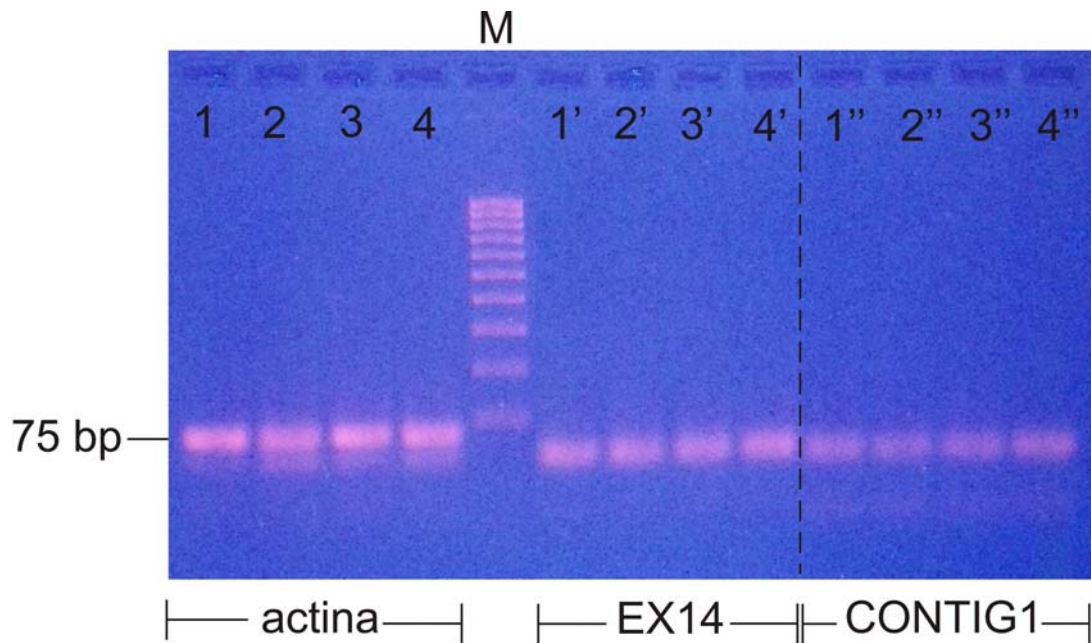
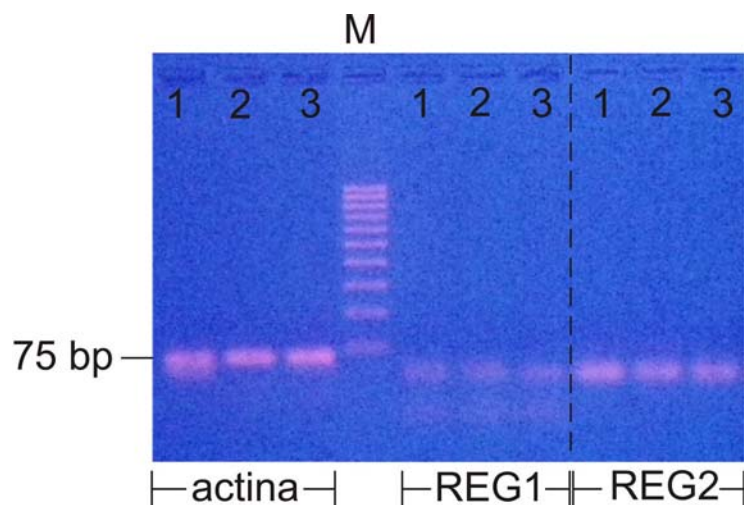
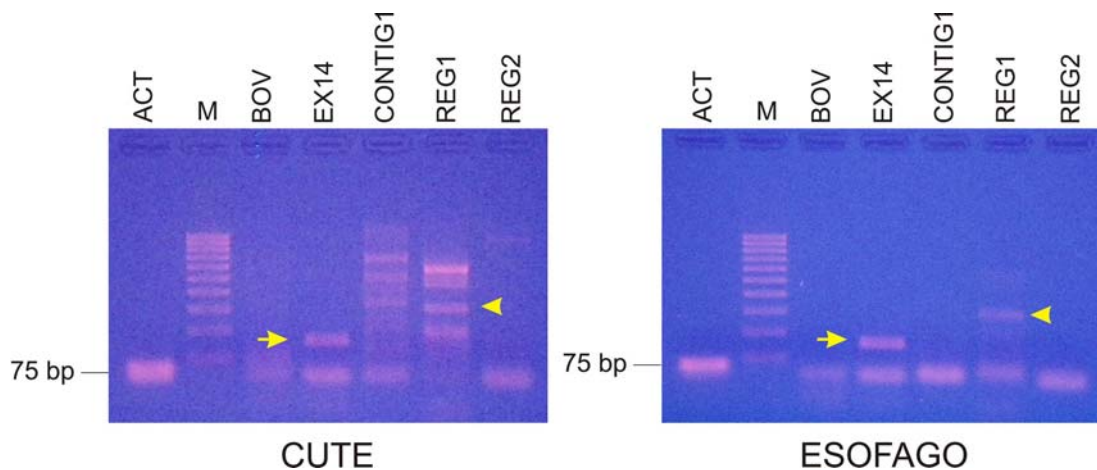


Figura 4.17. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotto di PCR dei cDNA di β -actina (1-3) e di HIOMT con i primer disegnati su REG1 (1'-3') e su REG2 (1''-3''). Le lane numerate corrispondono a retina (1,1' e 1''), ghiandola di Harder (2, 2' e 2''), intestino tenue (3, 3' e 3'') mentre la lane M è caricata il marker da 100 bp a 1000 bp



In nessuno di questi casi sono state ottenute delle bande (dati non mostrati), indicando quindi che nemmeno i primer per EX14 e CONTIG1 sono adatti per riconoscere il cDNA di HIOMT nel tursiope. Anche le PCR con le coppie di primer disegnate su REG1 e REG2 non hanno dato alcun riscontro positivo (Fig. 4.27). Per valutare se la mancata osservazione delle bande di HIOMT nei campioni di delfino potesse essere dovuta a una degradazione degli mRNA o a una bassa efficienza di estrazione (in quanto molto più labile del DNA), è stata effettuata una PCR utilizzando come substrato i campioni di DNA genomico estratti da cute ed esofago di tursiope (Fig. 4.38) e come coppie di primer tutte e cinque quelle già impiegate. I primer di BOV e REG2 non hanno dato riscontro positivo né su cute né su esofago, mentre quelli di CONTIG1 hanno prodotto molte bande aspecifiche a diversa altezza per la cute ma nessuna per l'esofago. Analogamente i primer di REG1 hanno dato molte bande aspecifiche per la cute, di cui 2 ricorrenti anche per l'esofago. L'unico caso di riscontro positivo e concorde (con la banda del corretto peso molecolare atteso) in entrambi i tessuti è stato ottenuto coi primer di EX14, suggerendo che sia l'unica coppia di primer effettivamente specifica per HIOMT di tursiope.

Figura 4.18. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotto di PCR su DNA genomico con tutte e cinque le coppie disegnate per HIOMT (BOV, EX14, CONTIG1, REG1 e REG2) oltre a quella per β -actina (ACT). Le frecce gialle indicano la banda corrispondente all'amplicone di EX14 (165 bp), mentre le punte di freccia la banda di REG1 ricorrente nel campione di cute e di esofago. La lane M è caricata il marker da 100 bp a 1000 bp.



Per verificare se la banda da 165 bp relativa ai primer di EX14 corrispondesse effettivamente alla sequenza giusta, è stato sequenziato l'amplicone ottenuto. I risultati hanno dimostrato l'effettiva corrispondenza con la sequenza originale, sia sul filamento "senso" (95 bp identiche su 165) sia su quello "antisenso" (83 bp identiche su 165) (Tab. 4.5).

Tabella 4.5. Sono indicate le sequenze nucleotidiche “senso” e “antisenso” dell’amplicone relativo alla sequenza EX14. Nella sequenza “senso” sono indicati in azzurro i nucleotidi che dopo il sequenziamento si sono rivelati identici alla sequenza di partenza; analogamente per la sequenza “antisenso” tali nucleotidi sono evidenziati in violetto.

Filamento “senso”

5' –
 GTTACAGCAACACCGAGGTGGCGAC**CCTGCACCTAGTGTGACAGCG**GC GAACACTCTCTCCAGGGCGTG
 GCCGAGTACAATGACGCCC**ACGTCTGGGGCGTCTT**CACACGCCTGGGCCTGGCCGTGCGGGAGGGGGC
AGAGCAGA CCCGCGGGGCTCTGGGGGCGATGGAGGAGGAACGCCTGTCCCAG–3'

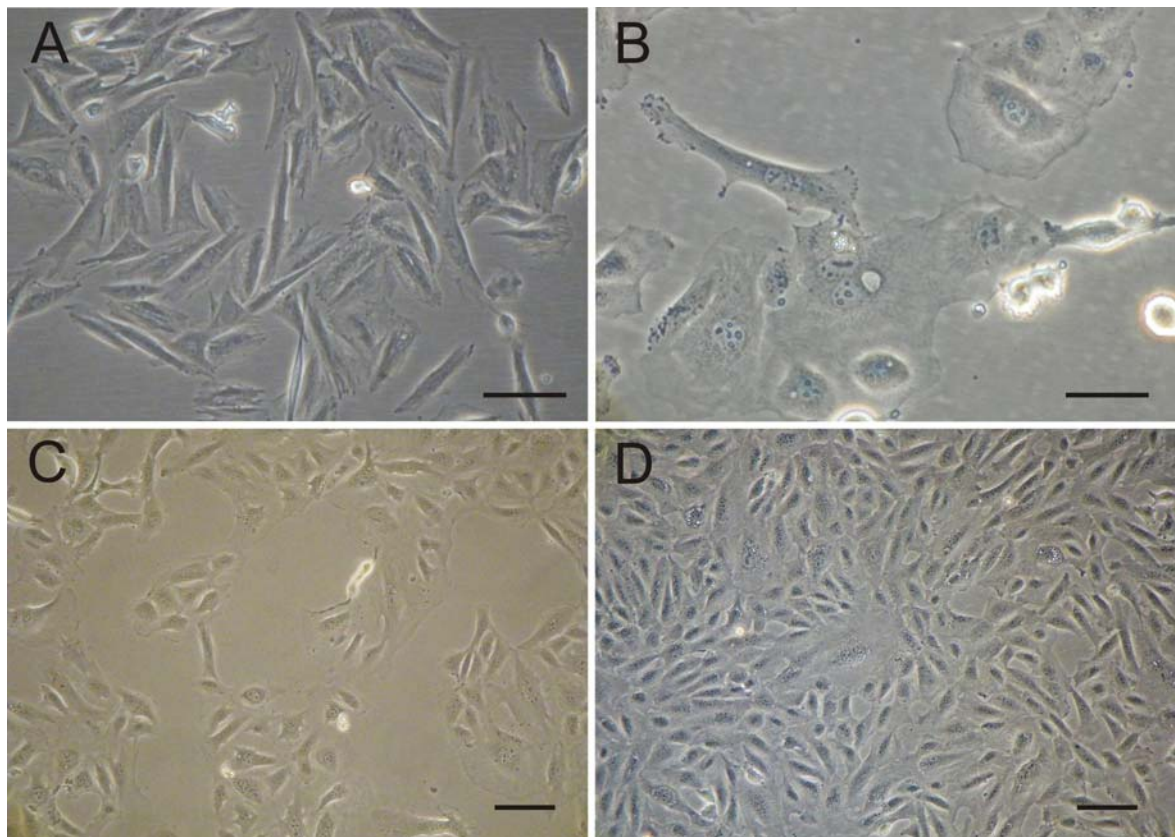
Filamento “antisenso”

5' –
 CTGGGAC**AGGC****GTTCCTCCTCCATC**GCCCCCAGAGCCCCGCGGGTCTGCTCTGCCCCCTCCCGCACGG
 CCAG**GCCCAGGCGTGTGAAGACGCCCCAGACGTGGGCGTCATTGTA**CTCGGCCACGCCCTGGAGAGAG
TGTTGCGCGTCTGACACTAGGTGCAGGGTCCACCTCGGTGTTGCTGTAAC–3'

4.7 Colture cellulari

Le colture cellulari primarie di cute di tursiope (ID 159) sono state immortalizzate con successo, con la trasformazione in cellule di tipo tumorale (secondarie) nell’arco di circa 4 settimane dal momento della trasfezione.

Fig. 4.19. Colture cellulari di cute di tursiope. (A) Massima confluenza generalmente osservata nelle colture primarie. (B–D) Colture secondarie dopo 4 h dalla semina (C), dopo circa un giorno (C) e dopo 3 giorni (D). Barre = 50 µm (A–B), 100 µm (C–D).

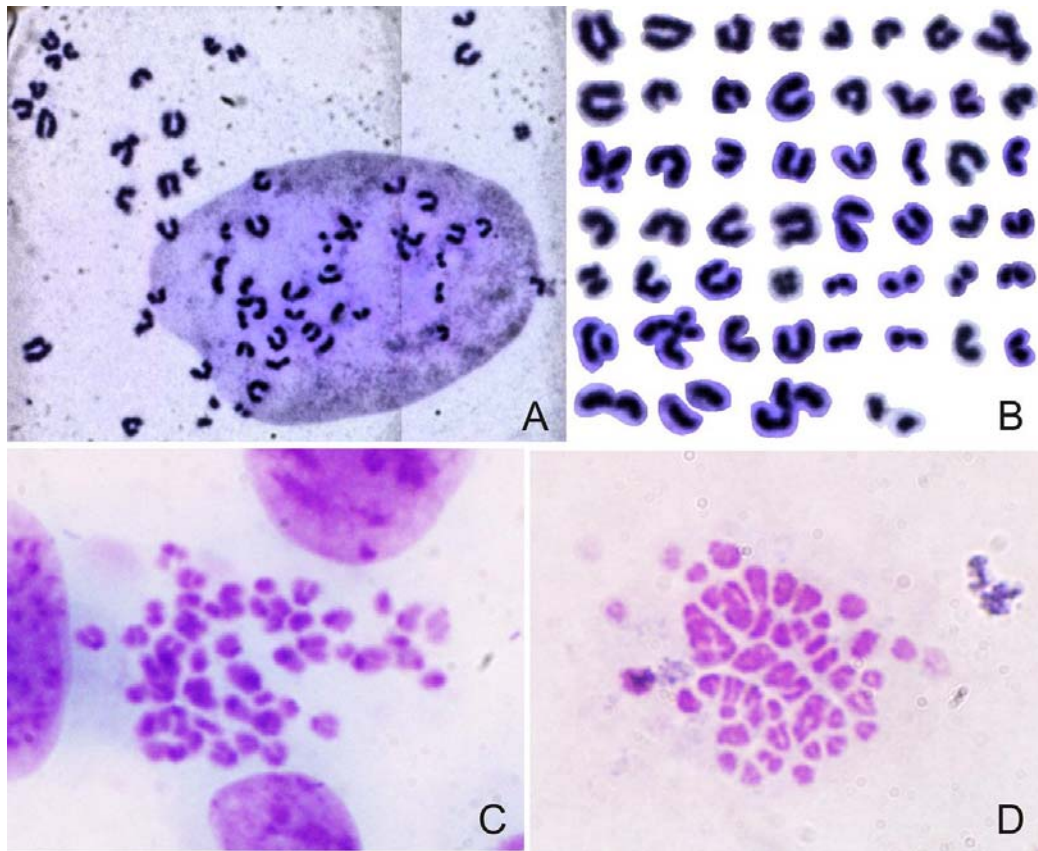


Le cellule avevano cambiato aspetto, soprattutto a carico di quelle di tipo fibroblastoidi, che si trovavano meno affusolate e leggermente più grandi rispetto a quelle normali (Fig. 4.19A–B). I ritmi di crescita sono aumentati notevolmente, raggiungendo al confluenza (percentuale di copertura del fondo della fiasca) totale in genere in due o tre giorni (Fig. 4.19C–D). Sfortunatamente, la propagazione delle colture secondarie ha incontrato molte difficoltà, a causa soprattutto di inquinamenti da parte di muffe e/o batteri. In altre occasioni invece, apparentemente senza una causa precisa, le cellule rallentavano la crescita fino a fermarsi, con conseguente senescenza e morte. Poiché questo fenomeno è stato osservato prevalentemente a carico di cellule giunte circa al ventesimo passaggio è stato verificato se, all'aumentare del numero di passaggi, le cellule perdessero per qualche motivo il plasmide psv3neo dal loro menoma. Senza il plasmide infatti, le cellule perdono la resistenza all'antibiotico di selezione e ne vengono uccise. A questo scopo è stata effettuata una PCR sui cDNA retrotrascritti dagli mRNA estratti da due colture, una al tredicesimo passaggio (P13) e una al ventesimo (20). I risultati hanno evidenziato effettivamente che, a distanza di 7 passaggi, le colture più "vecchie" non esprimono quasi del tutto l'mRNA dell'antigene T grande del virus SV40.

4.7.1 Cariotipo e G–banding

Come descritto al paragrafo precedente, la propagazione delle colture cellulari è stata ostacolata dai numerosi eventi di mortalità. Questo ha inciso anche sulla possibilità di ottimizzare il protocollo di cariotipizzazione, anch'esso con esiti non semplici da interpretare e che purtroppo non ha dato un riscontro definitivo sul numero e il tipo di cromosomi di tursiope. La difficoltà principale nell'interpretare le immagini dei cromosomi constava nella loro sovrapposizione e nell'apparente sovraccarico di colorante Giemsa che non ne rendeva distinguibile la morfologia, oltre alla frequente maggiore numerosità di cromosomi rispetto a quanto atteso ($n=44$) (Fig. 4.20A–B). Per ovviare a ciò sono stati tentati due protocolli di G–banding, per riconoscere più facilmente fra loro cromosomi di lunghezze simili. Purtroppo né il protocollo secondo Drets e Shaw (1971) né secondo Hay et al. (2000) hanno chiarificato la situazione. Nel primo caso i cromosomi appaiono con una sola grossa banda in corrispondenza del centromero, mentre i bracci non appaiono bandeggiati (Fig. 4.20C). Nel secondo caso invece è stato evitato il sovraccarico di Giemsa ma purtroppo non è stato rivelato alcun bandeggio (Fig. 4.20D).

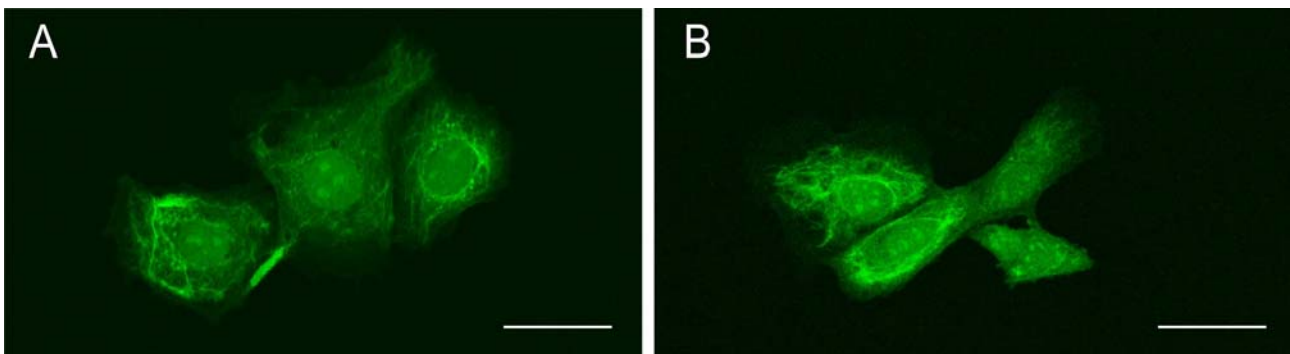
Figura 4.20. (A) Immagine di un nucleo lisato con in evidenza i cromosomi liberati. (B) Cromosomi di (A) ritagliati e disposti in ordine. (C) G-banding ottenuto col protocollo secondo Drets e Shaw (1971). (D) G-banding ottenuto col protocollo secondo Hay et al. (2000).



4.7.2. Immunocitochimica

La caratterizzazione dei tipi cellulari tramite immunocitochimica rivolta contro le proteine citoscheletriche ha dato esito positivo. L'osservazione di cellule immunoreattive per le citocheratine (tipiche di quelle di origine epiteliale) (Fig. 4.21A) e di cellule vimentina-immunoreattive (tipiche di quelle di origine mesodermale) (Fig. 4.21B) conferma la supposizione che le colture secondarie sono composte principalmente da cellule epitelioidei e fibroblastoidi.

Figura 4.21. (A) Cellule immunoreattive per le citocheratine (cloni A1-A3). (B) Cellule immunoreattive per la vimentina. Barre = 50 μ m.



5. DISCUSSIONE

In base alle osservazioni da me riportate in questo studio e ai dati da me raccolti non è stato possibile identificare una ghiandola pineale in una serie di ventinove encefali di tursiope, confermando quindi la maggior parte dei lavori e l'opinione generale secondo i quali un'*epiphysis cerebri* non sia presente in cetacei adulti. Una dissezione imperfetta dell'encefalo, con l'asportazione delle meningi o di strutture vascolari strettamente associate alla ghiandola, potrebbe portare alla lacerazione o alla recisione di un'eventuale piccola struttura ghiandolare. Inoltre, il taglio in sezioni coronali seriali spesse ca. 1 cm potrebbe rendere difficoltoso identificare l'epifisi a un esame macroscopico, soprattutto se la ghiandola fosse costituita, come nel coniglio e in molti altri roditori (Vollrath 1981), da una porzione più piccola e profonda collegata da un peduncolo a una parte più superficiale. L'encefalo dei cetacei tuttavia è stato studiato approfonditamente (Ridgway 1990, Oelschlager et al. 2008, 2010) e, per quanto siano possibili errori occasionali, è molto improbabile che la pineale non venga osservata a causa di una dissezione inaccurata da parte di diversi gruppi di ricerca. In questo studio, durante le dissezioni le meningi sono state attentamente asportate dagli encefali e non è stato osservato alcun indizio di presenza di pineale, eccetto per l'individuo ID107, in cui un corpuscolo ricordava per posizione e dimensioni quelle attese. In realtà l'analisi istologica ha rivelato che tale struttura era formata da un intreccio di epitelio semplice cuboidale plicato e capillari, tipici del plesso corioideo che produce il liquido cefalorachidiano. In un'unica occasione nel tursiope è stata identificata macroscopicamente una ghiandola pineale (Lyamin et al. 2008), anche se non è stata condotta poi un'analisi istologica per avere conferma di quella osservazione. Gli unici casi in letteratura, che invece documentano istologicamente la presenza di tessuto pineale nell'encefalo di cetacei, sono Behrman (1990) nella focena comune e Gersh (1938) nella megattera.

Un mezzo potenzialmente utile per investigare la presenza di una ghiandola pineale potrebbe essere rappresentato dalla diagnostica per immagini di encefali interi, come la risonanza magnetica nucleare (MRI) o la tomografia computerizzata (CT). È noto che la ghiandola pineale dei mammiferi presenta delle peculiari calcificazioni dette "sabbia cerebrale" o "*corpora arenacea*", ovvero depositi di sali di calcio e magnesio che risultano come punti brillanti quando visualizzati con MRI o CT (Wu et al. 2009). Queste calcificazioni possono comparire anche in individui giovani e aumentano progressivamente con l'età, anche se non sembra che esse abbiano un effetto negativo sulla funzionalità pineale (Vigh et al. 1998). Se la sabbia cerebrale fosse presente anche nei cetacei, le ghiandole pineali potrebbero essere più facilmente individuabili, specialmente in esemplari più vecchi. Tuttavia l'analisi MRI dell'encefalo di tursiope non ha rivelato la presenza di tali

formazioni nel talamo dorsale di tursiope (Marino et al. 2001), particolare confermato da altri studi di MRI effettuati su specie strettamente correlate, come il delfino comune (Oelschläger et al. 2010, Marino et al. 2002), la focena comune (Marino et al. 2003a), la stenella dal lungo rostro (Marino et al. 2004a), l'orca (Marino et al. 2004b), il lagenorinco acuto (Montie et al. 2008) e il cogia di Owen (Oelschläger et al. 2010, Marino et al. 2003b).

È interessante notare che una ghiandola pineale distinta sembra essere assente anche in altre specie di mammiferi, sia acquatici come il lamantino (Marsh et al. 1984, Ralph et al. 1985) sia terrestri come l'elefante (Cozzi et al. 2001) e l'armadillo dalle nove fasce (Phillips et al. 1986). Nell'elefante che esiste una situazione di ambiguità che ricorda quella del tursiope. Cozzi et al. (2001) non sono riusciti ad identificare una ghiandola pineale nell'elefante indiano (*Elephas maximus*), come pure Dexler (1907) nella stessa specie. Al contrario, Mayer (1845) nell'elefante indiano ha trovato la ghiandola, e Haug (1972) nell'elefante africano (*Loxodonta africana*) ha descritto macro- e microscopicamente il tessuto pineale, osservandolo nelle pareti del ventricolo e del recesso pineale. Anche Shoshani et al. (2006) hanno osservato un corpo pineale in un esemplare di elefante africano, che istologicamente presentava un'abbondanza di pinealociti, ma che macroscopicamente era molto poco sviluppato. Gli stessi autori però non hanno ritrovato la pineale in un esemplare di elefante indiano. La melatonina nell'elefante non è ancora stata quantificata in nessuna delle due specie.

Nel lamantino (*Sirenia, Trichechus manatus*) Chapman (1875) ha trovato una ghiandola pineale, mentre Ralph et al. (1985) hanno osservato in un esemplare di femmina la presenza di un recesso pineale tubulare ma senza il differenziamento di una ghiandola, e citologicamente non vi era traccia di pinealociti. Anche nel dugongo (*Sirenia, Dugong dugon*) la ghiandola pineale non è stata trovata (Dexler 1912). Apparentemente la melatonina non è ancora mai stata misurata in nessuna delle due specie.

Nell'armadillo dalle nove bande (*Dasybus novemcinctus*) la pineale manca fin dai primi stadi embrionali, in cui non è stata osservata l'evaginazione del tetto del terzo ventricolo che dà origine al recesso pineale (Phillips et al. 1986), mentre negli adulti l'epitalamo è dominato dall'organo subcommissurale (SCO). Anche l'indagine istologica e immunoistochimica dell'epitalamo non ha rivelato presenza di tessuto pineale (Phillips et al. 1986). Ciò nonostante, in questa specie è stata osservata una produzione di melatonina ritmica, che segue un ritmo circadiano come negli altri mammiferi, con livelli in fase buia circa tre volte maggiori di quelli in fase luminosa (Henry et al. 1981). I ritmi circadiani della temperatura corporea e di attività osservati da Harlow et al. (1982) erano appaiati con quello del ciclo luce-buio, e la somministrazione di

melatonina esogena induceva un allungamento del periodo di questi cicli, indicando che in questa specie la ghiandola pineale non sia necessaria per la sincronizzazione dei ritmi circadiani.

Tra i vertebrati non mammiferi, l'alligatore (*Alligator mississippiensis*) rappresenta un altro caso particolare. Come questa specie, la maggior parte dei rappresentanti viventi della sottoclasse degli Archosauria manca di una ghiandola pineale. Nell'alligatore però è stata osservata la produzione di melatonina, in maniera aritmica e a livelli molto bassi (Roth et al. 1980). Un caso simile è stato osservato anche in alcuni uccelli notturni, come il gufo *Strix uralensis* e il gabbiano *Creagrurus furcatus*. Nel primo caso non è stata osservata quasi del tutto produzione di melatonina, e la pineale si presentava molto piccola, con scarso apporto sanguigno e istologicamente degenerata (Taniguchi et al. 1993). Nel secondo caso i livelli di melatonina erano molto bassi e non mostravano alcuna variazione ciclica. Questa assenza di melatonina ritmica è stata interpretata come un prerequisito per mantenere un'elevata attività durante le ore notturne, al contrario della maggior parte degli altri uccelli che hanno un picco notturno (Wikelski et al. 2006).

Un'altra possibile spiegazione per l'apparente mancanza dello sviluppo di un corpo pineale in alcuni cetacei potrebbe essere l'incompleto sviluppo dell'abbozzo fetale in una ghiandola ben distinta. In questo caso il tessuto pineale potrebbe rimanere "nascosto" nelle pareti del recesso pineale e presentarsi in forma di "isole" o strati di pinealociti, come osservato nell'elefante (Haug 1972). Cellule sintetizzanti melatonina potrebbero trovarsi anche nelle commessure abenulare e posteriore, che delimitano la ghiandola basamente al recesso, come descritto nel bovino. In questa specie l'ibridizzazione *in-situ* (ISH) ha rivelato un certo numero di cellule esprimenti l'mRNA di HIOMT in entrambe le commessure ed anche in un gruppo di cellule del nucleo abenulare, tuttavia le stesse cellule non si sono dimostrate immunoreattive contro HIOMT (Sato et al. 1991). Ciò potrebbe implicare che in queste cellule l'enzima, una volta sintetizzato, venga velocemente trasportato in altre cellule.

La massa epitalamica simile alla pineale che ho riscontrato in un esemplare di tursiope non aveva alcuna organizzazione ghiandolare, e l'immunoistochimica contro HIOMT è risultata negativa. Alla luce di quanto documentato nelle specie sopra descritte e delle evidenze sperimentali nel bovino, sarebbe opportuna in studi futuri nell'epitalamo di tursiope un'approfondita indagine biomolecolare per avere riscontri sulla presenza di pinealociti nelle regioni abenulari o in altri loci subcallosali. In particolare, in virtù della comune origine ancestrale dei fotorecettori degli occhi laterali e dei pinealociti (v. Introduzione), è possibile individuare questi ultimi tramite immunoistochimica o ISH contro antigeni retinici comuni, di cui esistono diversi esempi, a partire dalla stessa HIOMT. Gli altri comprendono l'IRBP (*Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein*,

nota anche come RBP3), il SAG (antigene-S retinico), la rodopsina, la recoverina e il CRX (*cone-rod homeobox transcription factor*).

IRBP è una proteina secreta nei mammiferi dai fotorecettori nella propria matrice extracellulare, che funge da trasportatore extracellulare del retinolo-tutto-*trans* e dell'11-*cis*-retinaldeide fra i fotorecettori e le cellule dell'RPE ed è quindi fondamentale per la corretta traduzione del segnale visivo. È stata identificata sia in fotorecettori che in pinealociti, ad esempio di macaco (*Macaca mulatta*) (Kusakabe et al. 2009) e di uomo (Rodrigues et al. 1986). L'antigene-S retinico (SAG) è una proteina prodotta nei fotorecettori, con ruolo di inibizione della cascata di fototrasduzione del segnale luminoso, ad esempio attraverso l'inattivazione della rodopsina fosfatasi (Palczewski et al. 1989). Nella pineale è stata riscontrata ad esempio nell'uomo (Huang et al. 1992, Fukuda et al. 2011), nel bovino (Schomerus et al. 1994), nel riccio, nel gatto (Korf et al. 1985b) e nel ratto (Abe e Shinohara 1990). Nel criceto (Korf et al. 1986) e nel topo (Korf et al. 1990) alcuni pinealociti immunoreattivi si trovavano anche nella commissura posteriore e nel nucleo abenulare, e nel topo è stata individuata positività a SAG anche in un piccolo gruppo di cellule della commissura abenulare (Sunayashiki-Kusuzaki et al. 1997). La rodopsina è il pigmento fotoricettivo espresso nei bastoncelli della retina, una proteina trans-membranale con un gruppo cromoforo (retinale) legato covalentemente, con ruolo primario nella fototrasduzione del segnale luminoso in stimolo nervoso. È stata identificata nella pineale di uomo (Huang et al. 1992) oltre che di topo, ratto, gatto e cavia (Korf et al. 1985a). La recoverina invece è una proteina a basso peso molecolare (26 kDa) scoperta per la prima volta nella retina bovina, che ha un ruolo importante nel ripristino delle condizioni di fase buia del fotorecettore, inducendo un aumento della concentrazione intracellulare di GMP ciclico (Dizohor et al. 1991). L'immunoistochimica ha rivelato la presenza di recoverina nella pineale di rana (*Xenopus laevis*), pecora, uomo e ratto (Korf et al. 1992). CRX, infine, è un fattore di trascrizione che si lega a un elemento regolatorio pineale (PIRE), una sequenza nucleotidica che si trova a monte del promotore dei geni di AANAT e HIOMT, i due enzimi terminali della biosintesi di melatonina. Li et. al (1998) lo hanno identificato nella pineale di ratto, come pure Chen et al. (1997) che lo hanno trovato anche nell'uomo.

I lavori appena citati sono solo alcuni esempi della letteratura disponibile e costituiscono uno stimolo per effettuare lo stesso tipo di studi nell'epitalamo del tursiope, oltre che di altri cetacei. L'esistenza di altre specie, come l'elefante e il lamantino, in cui la ghiandola pineale viene identificata in certi esemplari ma non in altri conspecifici rappresenta certamente un paradosso biologico ed evolutivo. Un determinato organo infatti non può essere sia presente che assente nella stessa specie, e finora non sono stati riportati altri casi simili in letteratura. Dal punto di vista evolutivo, un organo viene "perso" nel corso di decine o centinaia di migliaia di anni quando la sua

funzione non è più necessaria, rimanendo però come abbozzo rudimentale nell'adulto o almeno nella fase embrionale, venendo poi riassorbito durante lo sviluppo. A questo proposito, nonostante esistano diversi studi sullo sviluppo embrionale dell'encefalo di tursiope e di altri odontoceti (Oelschläger e Buhl 1985, Buhl e Oelschläger 1988, Kemp e Oelschläger 2000, Marino 2004, Rauschmann et al. 2006), si rende necessaria un'indagine più approfondita dell'ontogenesi delle formazioni epitalamiche. Questo aiuterebbe a comprendere se negli esemplari adulti in cui manca la ghiandola pineale, la sua assenza sia dovuta un riassorbimento dell'abbozzo embrionale o se esistano casi in cui l'abbozzo non si forma, come riportato nell'armadillo (Phillips et al. 1986) e nell'alligatore (Roth et al. 1980) e come documentato per il primordio del sistema olfattorio nei delfinidi del genere *Stenella* (Sinclair 1966).

A dispetto dell'assenza di una ghiandola pineale negli encefali di tursiope da me esaminati, questo lavoro ha dimostrato per la prima volta la produzione di melatonina circolante nella specie *Tursiops truncatus*. Complessivamente, i livelli in fase luminosa variavano fra 5.15 pg/ml e 27.74 pg/ml. Questi valori sono coerenti con quanto riportato per altri mammiferi, come ratto (26.1 pg/ml) (Bubenik et al. 2000), criceto dorato (11 pg/ml) (Maywood et al. 1993), maiale (9.8 – 30 pg/ml) (Bubenik et al. 2000, Andersson 2001), bovino (12.4 pg/ml) (Rodriguez et al. 2004), elefante marino (19.4-24.5 pg/ml) (Griffiths et al. 1979) e uomo (2-10 pg/ml) (Reiter 1991). Le fluttuazioni annuali dei livelli di melatonina erano simili fra i gruppi A e B, senza differenze significative fra i mesi estivi ed invernali. L'unica eccezione riguardava Agosto per il gruppo B, durante il quale è stato osservato un aumento significativo rispetto a Febbraio, Giugno ed Agosto. Questo aumento è piuttosto inaspettato, poiché durante l'anno le concentrazioni di melatonina in fase luminosa non cambiano significativamente nemmeno in riproduttori stagionali. La variazione stagionale dei livelli di melatonina si verifica piuttosto come differenze nella durata e nell'ampiezza del picco di concentrazione notturna (acrofase) al cambiare della lunghezza del fotoperiodo durante l'anno (Arendt 1995). Questo spostamento del ritmo giornaliero viene percepito nel complesso in maniera specie-specifica, come segnale per l'instaurarsi della stagionalità riproduttiva nei diversi tipi di riproduttori stagionali (es. brevidiurni come la pecora o longidiurni come il cavallo) (Gerlach e Aurich 2000).

Il tursiope mostra una considerevole flessibilità nella stagionalità riproduttiva, come stimato in natura dalla frequenza di avvistamenti o spiaggiamenti di cuccioli, con picchi diffusi durante l'arco dei mesi primaverili ed estivi (Thayer et al. 2003). Nell'impianto sperimentale qui adottato non è stata valutata la relazione fra la concentrazione di melatonina e uno specifico stadio del ciclo riproduttivo. Nonostante diversi studi abbiano investigato l'andamento degli ormoni sessuali in questa specie (es. Sawyer-Steffan et al. 1983, Robeck et al. 2005, Yuen 2007, Biancani et al. 2009),

nessuno di essi ha mai confrontato quei profili con i livelli della melatonina, considerato che è un ormone il cui principale effetto nei mammiferi è quello di inibire l'attività gonadica.

Un fattore che potrebbe aver contribuito ai maggiori livelli di melatonina verso la fine dell'estate, negli individui del gruppo B, è la gravidanza. Tre degli otto delfini di questo gruppo infatti, erano giovani femmine gravide, in particolare PT6 (10 anni), PT7 e PT8 (entrambe 13 anni. Nei pipistrelli (Haldar et al. 2006), nel ratto (Velázquez et al. 1992) e nell'uomo (Nakamura et al. 2001), i livelli plasmatici notturni di melatonina si sono dimostrati significativamente maggiori nelle femmine gravide rispetto a quelle non gravide. Nell'uomo le differenze non erano significative per i valori in fase luminosa, mentre nei ratti la differenza era marcata sia per i livelli diurni che per quelli notturni. Nel mio caso purtroppo non disponevo, per le femmine gravide, di prelievi né pomeridiani né notturni da poter paragonare con quelle non gravide, ed ho quindi confrontato la concentrazione media diurna. Considerando tutte le femmine del gruppo B (PT4, PT5, PT6, PT7 e PT8), non ho osservato una differenza significativa ($P = 0.803$) tra le gravide (16.89 pg/ml) e le non gravide (16.40 pg/ml), anche includendo successivamente nel confronto l'unica femmina del gruppo A, non gravida (RM4) ($P = 0.921$). È interessante notare però, che se dal confronto delle medie mensili di tutti gli otto esemplari del gruppo B venivano escluse le tre femmine gravide, emergeva un maggior numero di confronti significativi ($P = 0.000$) nel pattern annuale. Infatti agosto (23.48 pg/ml) aveva concentrazione maggiore anche rispetto a marzo (14.6 pg/ml) e maggio (15.41 pg/ml), oltre che a febbraio (12.22), giugno (8.90 pg/ml) e luglio (9.98 pg/ml), come già evidenziato. Le medie mensili risultavano infatti più basse in tutti i mesi, anche se in maniera non significativa ($P = 0.303$). Ciò suggerisce che le tre femmine in gestazione potrebbero fornire un contributo di melatonina maggiore rispetto alle altre, e che la gravidanza sia un fattore che altera i normali livelli di melatonina anche nel tursiopo. L'influenza della gravidanza sui livelli di melatonina circolante in questa specie rimane però ancora da stabilire. Inoltre il disegno di campionamento di entrambi i gruppi presenta diversi prelievi mancanti, e non si sa se il profilo annuale di melatonina dopo giugno mostri un aumento anche per i delfini del Gruppo A. In futuro sarebbe opportuno quindi estendere il periodo di campionamento ad almeno dodici mesi per entrambi i gruppi, confrontando inoltre i profili di melatonina con quelli degli ormoni sessuali o delle gonadotropine, e valutando l'influenza di eventuali gravidanze.

I profili degli ormoni sessuali servirebbero anche a distinguere individui sessualmente maturi (con assenza di loro fluttuazioni significative) da quelli immaturi. La maturità sessuale dei tursiopi viene raggiunta ad approssimativamente 10 anni d'età (Mead e Potter 1990), sebbene con una certa variabilità (Wells e Scott 2008), con le femmine sessualmente mature fra i 5 e i 13 anni e i maschi per lo più fra i 9 e i 14 anni. Ho suddiviso tutti e dodici gli individui in classi d'età, per

confrontare quelli con meno di 10 anni, teoricamente immaturi, con quelli di età intermedia e quelli più vecchi. Per evitare un'eventuale interferenza da parte delle femmine gravide queste sono state escluse, osservando un livello maggiore negli individui più giovani (20.3 pg/ml) rispetto sia a quelli di età intermedia (11.89 pg/ml) sia a quelli più vecchi (14.5 pg/ml) (ANOVA, $P = 0.000$). Questo ricorda quanto riportato in letteratura, in quanto la melatonina ha generalmente livelli maggiori negli individui immaturi rispetto a quelli maturi (Reiter 1998), poichè ha un ruolo chiave nel controllo dello sviluppo e dell'attività delle gonadi, determinando l'instaurarsi della pubertà. Nell'uomo ad esempio, i livelli massimi vengono raggiunti intorno ai tre anni per poi declinare stabilmente fino a quelli tipici dell'adulto quando inizia la pubertà (Waldhauser et al. 1993). Questo però riguarda i valori notturni, quindi per avere un confronto più affidabile fra le classi d'età nel tursiope è necessario disporre di prelievi in fase buia.

I valori notturni negli esemplari di questo studio sfortunatamente non erano disponibili; i prelievi sono stati eseguiti il più tardi possibile, in accordo con la disponibilità degli staff veterinari e con la necessità di coordinare ed integrare lo sforzo di campionamento con i normali prelievi di routine a scopo clinico. La fase buia dei campionamenti corrispondeva quindi al tardo pomeriggio, e ciò ha ovviamente comportato una significatività molto ridotta dei confronti fra i valori mattutini e quelli pomeridiani, i quali variavano fra 12.23 pg/ml e 49.18 pg/ml. Tali valori sono molto inferiori rispetto alle concentrazioni medie osservate per esempio nell'uomo (circa 100 pg/ml) (Kennaway e Voultios 1998, Zeitzer et al. 2009) o nella foca di Weddell (131.8 pg/ml) (Griffiths et al. 1986), anche se apparentemente altre specie non raggiungono livelli molto alti, come il cavallo (50 pg/ml) (Haritou et al. 2008), il bovino (55.6 pg/ml) (Rodriguez et al. 2004) e il maiale (23.5 pg/ml) (Andersson 2001). Il fatto che solamente in febbraio (nel gruppo B) sia stata osservata una differenza significativa tra i valori mattutini e quelli pomeridiani non può essere spiegato con i soli dati in mio possesso, ma rappresenta una minima prova che nel tursiope possa esistere una variazione giornaliera. Un numero maggiore di campioni, anche con aumento del numero di esemplari, aiuterebbe certamente a investigare in modo appropriato il pattern delle oscillazioni circadiane e circannuali della produzione di melatonina in questa specie.

L'unico altro lavoro in letteratura che abbia documentato la produzione di melatonina in un cetaceo risale a fine 2011, precedendo di poco i risultati di questo studio. Funasaka et al. (2011) hanno misurato la concentrazione plasmatica dell'ormone in quattro esemplari di tursiope Indo-pacifico (*Tursiops aduncus*), una specie riconosciuta come geneticamente distinta da *T. truncatus* solo recentemente, anche se questa distinzione è ancora oggetto di dibattito (Wang et al. 1999, Chilvers e Corkeron 2003). I livelli di melatonina sono stati quantificati in 3 giornate distinte (solstizio d'inverno, equinozio di primavera e solstizio d'estate) con prelievi ogni 3 h per 24 h,

quindi anche durante le ore notturne, con l'ausilio di una semplice torcia elettrica coperta da cellophane rosso. L'intensità luminosa generata è stata monitorata con un illuminometro, e durante i prelievi notturni variava fra 0.1 e 0.45 lux (lx), un valore giudicato dagli autori insufficiente per poter influenzare la secrezione di melatonina. Come termini di paragone, il valore di 1 lx è equivalente all'intensità (anche se tecnicamente sarebbe più corretto "illuminamento") prodotta da una candela ad una distanza di 1 m, 10 lx a quella misurabile durante il crepuscolo e 100 lx a quella di un cielo nuvoloso durante il giorno.

In letteratura esistono diversi studi in cui è stato documentato l'effetto inibitorio della luce sulla secrezione notturna dell'ormone, ed alcuni hanno cercato di determinare i valori soglia di intensità luminosa sufficienti ad esercitare questo effetto. Il grado di inibizione dipende sia dalla durata che dall'intensità della radiazione luminosa (Reiter 1998). In animali diurni è stato testato l'effetto di intensità pari o superiori a quella diurna, in genere attorno ai 300 lx, come nella pecora (Earl et al. 1985) o nell'uomo (Bojkowski et al. 1987, Aoki et al. 1998), in cui almeno 1 h di esposizione causava un sensibile e stabile decremento dei livelli di melatonina. Nell'uomo l'effetto negativo è stato verificato anche per intensità inferiori, fra i 100 lx e i 200 lx, con effetto inibitorio parziale ma significativo (McIntyre et al. 1989, Arendt 1998). In altri animali diurni la soglia è molto inferiore, come nel caso del macaco giapponese (*Macaca fuscata*), in cui appena 10 lx d'intensità nell'arco di 1-2 h portano le concentrazioni di melatonina ai livelli in fase luminosa (Nozaki et al. 1990). Anche negli animali notturni, come in quelli diurni, esiste una certa variabilità specie-specifica nel valore minimo efficace. Nel criceto siberiano (*Phodopus sungorus*) un'intensità di 10 lx non influenza la secrezione in fase buia (Wagner et al. 2007), mentre nel criceto dorato (*Mesocricetus auratus*) sono sufficienti valori di appena 1.08 lx per deprimere la concentrazione di melatonina (Brainard et al. 1982), ma potenzialmente la soglia potrebbe trovarsi a livelli ancora inferiori. La soglia più bassa degli animali notturni è in relazione alla struttura della propria retina, che a differenza degli animali diurni, è composta prevalentemente di bastoncelli, responsabili della visione scotopica, ovvero sensibile alle basse intensità luminose (Peichl 2000).

La composizione della parte fotosensibile della retina del tursiope è essenzialmente quella di un animale notturno, ovvero quasi completamente formata da bastoncelli, con solo l'1-2% di coni (Peichl et al. 2001), perciò è molto probabile che la soglia d'intensità luminosa in grado di inibire la secrezione notturna di melatonina sia simile a quella del criceto. Rimane perciò da stabilire se l'intensità di 0.46 lx registrata da Fukuda et al. (2011) interferisca con la secrezione dell'ormone, e di fatto gli stessi autori ammettono di non poterlo escludere. In futuro sarebbe quindi molto importante individuare l'effettivo valore soglia per entrambe le specie di tursiope.

Le concentrazioni di melatonina misurate dal gruppo giapponese sono apparentemente in contraddizione con quanto atteso per la maggior parte dei mammiferi, dato che non è stata osservata alcuna variazione significativa giornaliera. L'acrofase, cioè il momento al quale la concentrazione di melatonina è massima, si verificava ad orari casuali, senza quindi relazione con l'ora del giorno o della notte, e non vi era differenza significativa nell'ampiezza dei livelli dell'ormone fra le tre stagioni. Nonostante i prelievi notturni, nel gruppo giapponese il massimo valore è stato osservato al mattino (23.3 pg/ml, 09:00 h), mentre nel mio caso al pomeriggio, ed era due volte maggiore (49.18 pg/ml). A differenza dei tursiopi giapponesi, inoltre, i delfini di entrambi i gruppi del mio studio mostravano quasi sempre valori più alti il pomeriggio rispetto al mattino, il che indica un tipo di secrezione più simile alla situazione tipica dei mammiferi. Anche la concentrazione media complessiva per ogni stagione era molto maggiore nei miei tursiopi (15.46 – 21.80 pg/ml) rispetto a quelli giapponesi (2.2 – 4.2 pg/ml). Le differenze tra la produzione di melatonina nel gruppo di *T. aduncus* e quella nei due gruppi di *T. truncatus* potrebbero essere legate a fattori specie-specifici, all'influenza della cattività o all'età degli esemplari, tutti aspetti che meriterebbero di essere delucidati in studi futuri. Ciò che sorprende dei tursiopi giapponesi è che, nonostante l'aritmicità della produzione di melatonina, gli esemplari mostrano significative variazioni giornaliere sia nel cortisolo e nel testosterone plasmatici, sia nella temperatura rettale, con valori significativamente maggiori nelle prime ore del mattino, coerentemente con quanto osservato in molti mammiferi terrestri diurni (Piccione et al. 2002; Wakamura e Tokura 2002; Kinahan et al. 2007). Nel tursiope sono stati documentati altri ritmi, ad esempio per quanto riguarda l'attività locomotoria (Sekiguchi e Koshima 2003) e la produzione di cortisolo e ormoni sessuali (Suzuki et al. 2003). Emerge quindi un quadro complesso, in cui il genere *Tursiops*, con adattamenti estremi alla vita acquatica, apparentemente senza ghiandola pineale, produce comunque melatonina, ma in maniera atipica e senza apparente legame con gli altri ritmi biologici. La scarsità di dati sui profili di melatonina dei due gruppi di *T. truncatus* e sui rapporti con i profili di altri ormoni sottolinea la necessità di studi futuri più approfonditi.

Data l'assenza di ghiandola pineale negli encefali di tursiope qui esaminati, e dopo aver verificato e misurato la produzione di melatonina in questa specie, mi sono posto il problema di individuare quale possa essere la fonte alternativa dell'ormone, attraverso l'immunoistochimica. Fra i possibili marcatori, ho considerato più affidabile HIOMT rispetto ad AANAT in quanto ultimo enzima della via biosintetica dell'ormone, ed anche per la maggiore stabilità del primo enzima. HIOMT ha infatti emivita maggiore di 24 h (Gastel et al. 1998), mentre AANAT ha emivita di appena 3–5 minuti) (Bernard et al. 1996). Inoltre la melatonina e i suoi precursori (NAS) sono ritenuti scarsamente antigenici essendo molecole molto piccole e molto simili tra loro, e necessitano

di essere coniugati con una proteina, solitamente BSA (Yang et al. 2006). L'anticorpo generato contro HIOMT umana ha rivelato nella ghiandola pineale bovina una diffusa reattività del parenchima, anche se non in maniera completamente omogenea. La distribuzione di pinealociti immunoreattivi in uno strato corticale a maggiore densità è stata già osservata nel bovino da Sato et al. (1994), sia con immunistochemica contro HIOMT che con ibridizzazione *in-situ* del suo mRNA, come pure è stato documentato che non tutti i pinealociti si dimostrano HIOMT-immunoreattivi, probabilmente a causa di un diverso turnover dell'enzima, che varia a seconda della cellula (Kuwano et al. 1983).

I miei risultati indicano che una specifica popolazione di cellule HIOMT-immunoreattivo-simili (-ir-like) nello strato delle cellule gangliari della retina potrebbe contenere l'enzima. Nei mammiferi, il compartimento di elezione che produce melatonina è lo strato dei nuclei esterno (ONL), composto dai nuclei dei fotorecettori, in virtù della loro comune origine ancestrale con i pinealociti (Falcò et al. 2009). Nei fotorecettori la produzione di melatonina ha un ruolo importante nella regolazione della normale fisiologia retinica. Essa modulerebbe la contrazione e l'espansione dei granuli di melanina nello strato retinico pigmentato (RPE) (Pang e Yew 1979), che protegge i segmenti esterni dei fotorecettori. A livello dei fotorecettori stessi induce il rilascio dei dischi più apicali dai segmenti esterni, i quali poi vengono fagocitati ed eliminati dalle cellule dell'RPE (Kevany e Palczewski 2010; Young e Bok 1969). Colture cellulari di RPE umano sono in grado a loro volta di secernere melatonina (Zmijewski et al. 2009), che potrebbe quindi agire sia in maniera autocrina sull'aggregazione dei granuli di melanina, sia in maniera paracrina sul riciclo dei dischi dei fotorecettori.

Molteplici studi hanno rilevato la presenza di melatonina o del suo precursore N-acetilsetotonina (NAS) nei fotorecettori di roditori (Bubenik et al. 1973, Bubenik et al. 1976a, Vivien-Roels et al. 1981), di macaco (Bubenik et al. 1973 MT-NAS) e di uomo (Bubenik et al. 1973 MT-NAS). Tuttavia, molti considerano la retina dei primati e del bovino sostanzialmente incapace di sintetizzare melatonina (Craft et al. 1999, Coon e Klein 2002). Questo è probabilmente dovuto al diverso pattern di espressione dei due enzimi terminali della biosintesi. Infatti, l'mRNA di AANAT è espresso a livelli più elevati, con variazioni circadiane significative (Niki et al. 1998, Coon et al. 2002), mentre l'mRNA di HIOMT è espresso a livelli molto bassi, rintracciabili solo con tecniche particolarmente sensibili, come il Southern Blot (Bernard et al. 1995), e con variazioni circadiane minime (Klein et al. 1974). Ciò è comprensibile se si tiene conto che AANAT è molto labile e necessita quindi un tasso di sintesi maggiore, al contrario di HIOMT che essendo più stabile non richiede ritmi elevati di espressione. HIOMT è stata rintracciata con immunistochemica in alcuni mammiferi, come ratto, cavia (Wiechmann et al. 1985, Wiechmann e Hollyfield 1989, Wiechmann

e O'Stehen 1990) coniglio (Wiechmann e Hollyfield 1989), bovino e uomo (Wiechmann et al. 1985). La positività si riscontrava sempre a carico dei fotorecettori e spesso anche nello strato interno dei nuclei (INL). Tuttavia gli autori degli studi appena citati si sono smentiti in un lavoro successivo (Wiechmann 1993), dove constatavano che l'immunopositività per HIOMT nelle retine esaminate era dovuta ad una cross-reattività con la recoverina, anch'essa espressa nell'ONL e nell'INL (Korf et al. 1992, Wiechmann e Hammarback 1993). È interessante notare che Schomerus et al. (1994) individuano la recoverina con IHC nella retina di bovino, a carico sia dei fotorecettori, sia di singole cellule gangliari intervallate da ampi spazi, in modo simile a quanto osservato nelle retine dei mie esemplari. In questi ultimi però, l'assenza di marcaggio nei fotorecettori potrebbe indicare che non si tratti di una cross-reattività dell'anticorpo anti-HIOMT con la recoverina. Ancora nel bovino, Kuwano et al. (1983) non sono riusciti ad identificare l'enzima con IHC nella retina, ma Fukuda et al. (2011) invece l'hanno individuato nell'uomo, nello strato dei fotorecettori. Nonostante l'apparente assenza di HIOMT, la sua attività enzimatica è stata dimostrata in estratti di retina in roditori (Cardinali e Wurtman 1972, Balemans et al. 1980) e nell'uomo (Wiechmann e Hollyfield 1987), in cui è stata documentata anche l'espressione dell'mRNA, tramite PCR e Southern Blot (Rodriguez et al. 1994).

Nei miei campioni di retina di tursiope, stenella e capodoglio non ho osservato alcuna risposta positiva nell'ONL, mentre un marcaggio molto intenso era presente in una popolazione di cellule del GL, nello strato delle fibre nervose (FL) e a volte nell'OPL. La distribuzione monostratificata e gli ampi intervalli intercellulari che separano le cellule gangliari HIOMT-ir-like corrispondono alla topografia del GL descritta nel tursiope (Mass e Supin 2007). La presenza di HIOMT nelle cellule gangliari sarebbe una caratteristica unica delle retine di cetaceo, e pone interrogativi sul significato funzionale dell'enzima in quel comparto. La capacità della retina di secernere melatonina in maniera endocrina rimane ancora da dimostrare nei vertebrati superiori (Hueter 1993). Anche se alcuni lavori dimostrano la persistenza dei livelli circolanti dell'ormone dopo pinealectomia nel ratto (Yu et al. 1981, Yaga et al. 1993), e addirittura aumenti compensatori nel pollo a distanza di settimane dall'asportazione (Osol et al. 1985), gli elementi presenti in letteratura sono ancora insufficienti per provare una secrezione endocrina. Analogamente, alcuni autori hanno ipotizzato una produzione endocrina di melatonina dalla retina, ad esempio nella trota (Gern e Ralph 1979) e nella rana (Delgado e Vivein-Roels 1989), ma altri ancora escludono invece questa proprietà nella retina di trota (Zachman et al. 1992) e di branzino (Sánchez-Vázquez et al. 1997).

Diversi studi hanno invece documentato che la secrezione retinica dell'ormone, oltre a quelli sui fotorecettori e sull'RPE già citati, ha importanti effetti di modulazione del rilascio di alcuni

neurotrasmettitori, per esempio inibendo quello di dopamina (Ribelayga et al. 2004) e acetilcolina (Mitchell e Redburn 1991) o stimolando quello di glutammato (Faillace et al. 1996). Questi tre neurotrasmettitori sono rilasciati dai neuroni bipolari dell'INL (dopamina) (Kramer 1971) o dalle cellule amacrine (Masland et al. 1984, Mitchell e Redburn 1991), connessi direttamente con il GL, o dagli stessi neuroni gangliari (Saenz et al. 2004). Inoltre è stato dimostrato che le cellule amacrine che esprimono i recettori per la melatonina di tipo 1 (MT1) sono espressi in tutti i comparti cellulari appena nominati (Fujieda et al. 1999, 2000). Alla luce di quanto descritto e di quanto riportato in letteratura, la melatonina prodotta dalle cellule gangliari o dall'OPL nel tursiope (e negli altri cetacei) potrebbe agire in maniera paracrina come nei casi appena descritti.

Nella ghiandola di Harder del tursiope sono stati descritti due tipi principali di cellule (Ortiz et al. 2007, 2009). La mia indagine immunoistochimica ha rivelato solo un numero molto ristretto di cellule secretici HIOMT-ir-like, in alcuni lobuli delle ghiandole, ma la corrispondenza di questi elementi immunoreattivi con uno dei due tipi cellulari è attualmente difficile da stabilire. Tuttavia, l'apparente scarsità di cellule immunopositive è coerente con quanto osservato in roditori, (Vivien-Roels et al. 1981, Bubenik et al. 1976b, Menendez-Pelaez et al. 1993, Meusy-Dessolle e Tillet 1992), nel visone (Meusy-Dessolle e Tillet 1992) e nel babbuino (Menendez-Pelaez et al. 1993). In tutti questi lavori però, gli antigeni bersaglio dell'immunoistochimica erano o la stessa melatonina o il suo precursore NAS (N-acetil-serotonina), mentre per la prima volta in questo tessuto ho usato come marcatore HIOMT. L'attività dell'enzima è comunque stata documentata in estratti di ghiandola di alcuni roditori, come ratto (Cardinali e Wurtman 1972, Vlahakes e Wurtman 1972), criceto (Pevet et al. 1980) ed eterocefalo glabro (Balemans et al. 1980). Lo scarso numero di cellule HIOMT-ir-like potrebbe essere dovuto ad una bassa attività sintetica della ghiandola o alla fase circadiana di produzione in cui si trovava l'organo al momento del prelievo. È stato dimostrato infatti che anche in questa ghiandola la produzione di melatonina segue un ritmo circadiano (Payne 1994), e Vivien-Roels et al. (1981) hanno riportato che in roditori soppressi durante la notte, la ghiandola di Harder mostrava un'intensità di immunofluorescenza maggiore che in roditori soppressi durante il giorno.

L'osservazione più difficile da interpretare fra i tre principali tessuti sottoposti a immunoistochimica riguarda l'intestino tenue. Uno studio pionieristico di Raikhlin et al. (1975), condotto tramite biosaggi su pelle di rospo con omogenato di appendice umana, ha indicato che una potenziale importante fonte extrapineale di melatonina potevano essere le cellule enteroendocrine (EC), di cui l'appendice è particolarmente ricca. Da allora, diversi altri lavori hanno dichiarato di aver provato la produzione di melatonina nelle cellule EC, attraverso immunoistochimica rivolta contro l'indolo nel ratto (Bubenik et al. 1974, Menendez-Pelaez et al. 1993, Bubenik et al. 1977,

Bubenik 1980, Holloway et al. 1980, Kvetnoy et al. 2002) e nell'uomo (Kvetnoy et al. 2002). La melatonina però non è molto affidabile come marcatore, in quanto, oltre alla scarsa antigenicità, la sua presenza in una determinata sezione di tessuto potrebbe essere il risultato dell'assorbimento e dell'accumulo locale dal circolo sanguigno, come documentato nel ratto (Bubenik 1980, Messner et al. 1998). Inoltre la risoluzione e la specificità delle tecniche immunistochemiche impiegate nei primi studi non era ottimale (Menendez-Pelaez e Reiter 1993). Solo recentemente Fukuda et al. (2011) hanno usato per la prima volta HIOMT come marcatore immunoistochemico in diversi tessuti umani, compreso l'intestino, dando supporto alla teorica produzione di melatonina da parte delle cellule EC, almeno nello stomaco e nel duodeno. In alcuni studi condotti sul ratto, invece, è stata documentata l'espressione degli mRNA sia AANAT che di HIOMT nell'ileo e nel duodeno (Stefulj et al. 2001, Al-Ghoul et al. 2010), oltre ad una debole attività enzimatica di HIOMT in duodeno e colon (Quay e Ma 1976).

Nelle mie sezioni di intestino non ho riconosciuto nessun elemento immunoreattivo con le caratteristiche di cellule enterocromaffini, ovvero cellule singole marcate e disperse lungo il bordo dell'epitelio della ghiandola intestinale. Purtroppo anche in questo caso il tessuto con la maggiore integrità fra quelli disponibili era compromesso dai processi autolitici post-mortem, e non avendo quindi un epitelio intatto era estremamente difficile identificare questo tipo di cellule. Ho osservato invece una forte positività a livello dell'orletto a spazzola o del citoplasma apicale degli enterociti, di cui si riconoscevano moltissime file ancora tenute insieme dalle giunzioni occludenti apicali. Dispersi fra le file di enterociti si notavano alcuni elementi immunoreattivi, di forma non definita e apparentemente dotati di nucleo, evidenziato dalla controcolorazione con ematossilina. Per cercare di chiarire l'esatta natura di questi elementi, sarebbe utile in futuro effettuare un'immunoistochemica contro appositi marcatori generici delle cellule neuroendocrine, come ad esempio la sinaptofisina e la cromogranina A (Eriksson e Lloyd 2004). Quale può essere il significato funzionale della presenza dell'enzima che sintetizza melatonina nel polo luminale delle cellule assorbenti?

La melatonina ha dimostrato di possedere potenti proprietà antiossidanti (Reiter et al. 1994, Tan et al. 2002), e potrebbe essere rilasciata come prodotto esocrino, in modo simile a quanto avviene con le Ig-A coniugate al proprio recettore (Mantis e Forbes 2010). La produzione esocrina di melatonina è ben documentata nella ghiandola di Harder, dove la concomitante secrezione di porfirine induce la produzione di radicali liberi a causa della loro interazione con la radiazione UV, che li ossida (Payne 1994). La melatonina fungerebbe da smaltitore di radicali liberi (o *scavenger*) evitando il danneggiamento dell'epitelio della congiuntiva, che è bagnata dal secreto della ghiandola di Harder, oltre che da quelle delle ghiandole lacrimali. In modo simile, nella bile di molti mammiferi, compreso l'uomo, è stata misurata una concentrazione estremamente elevata di

melatonina, che sarebbe responsabile della protezione della mucosa intestinale dal danno ossidativo causato dagli acidi biliari (Tan et al. 1999). Tali elementi sono a favore della potenziale produzione di melatonina esocrina anche nell'intestino di tursiope, anche sono necessari studi futuri per verificare perché l'ormone è apparentemente prodotto dagli enterociti invece che dalle cellule EC.

Per capire se il marcaggio atipico osservato a livello apicale negli enterociti fosse dovuto ad un'eventuale cross-reattività dell'anticorpo con una proteina dell'orletto a spazzola, ho eseguito l'immunoistochimica su altri tessuti dotati di orletto, in primo luogo nel rene di tursiope. Come tessuti di animali terrestri da confrontare ho scelto invece rene ed intestino di bovino, e cistifellea di pecora. La colecisti nei cetacei è invece assente (Mead 2008) e quindi impossibile da testare. Fra tutti i tessuti extrapineali di tursiope esaminati, oltre a retina, ghiandola di Harder e intestino, l'unico immunoreattivo era il rene, che mostrava un marcaggio intenso a carico dei tubuli contorti prossimali, riconoscibili per il maggiore spessore dell'epitelio rispetto ai tubuli distali, immunonegativi. In letteratura la capacità del rene di sintetizzare melatonina rimane ancora da dimostrare, anche se non è stata investigata a fondo, ed i pochi studi che se ne sono interessati lo hanno fatto collateralmente ad altri obiettivi. Stefulj et al. (2001) hanno dimostrato l'espressione degli mRNA di AANAT e HIOMT nel rene di ratto con PCR, a 40 e 35 cicli rispettivamente, con il secondo enzima apparentemente espresso a livelli maggiori. Fukuda et al. (2011), usando il mio stesso anticorpo, hanno riscontrato una buona immunoreattività nei tubuli renali di uomo, anche se non viene specificato se si trattasse di tubuli prossimali o distali. Al contrario, Klein et al. (1996) non osservano l'mRNA di AANAT nel rene di uomo né con PCR né con Northern Blot, e Axelrod e Weissbach (1961) non rinvennero attività di HIOMT in rene di ratto, coniglio e macaco.

La positività nei miei campioni di rene era spesso concentrata apparentemente verso l'apice della cellula epiteliale anche in questo caso, anche se l'integrità del tessuto era sempre compromessa dai processi post-mortem e una localizzazione più precisa non è stata possibile. Nell'intestino e nel rene di bovino, non si riscontrava invece immunopositività, né nell'epitelio intestinale né in quello dei tubuli prossimali. Anche Kuwano et al. (1983) nell'intestino bovino non hanno trovato immunoreattività per HIOMT, suggerendo quindi che, nel caso dell'intestino e del rene di tursiope, il marcaggio potrebbe non essere dovuto ad una cross-reattività dell'anticorpo con una proteina dell'orletto a spazzola. Un altro elemento a favore di ciò è l'osservazione nella cistifellea di pecora che l'orletto a spazzola non risulta immunoreattivo, al contrario invece di piccoli gruppi di cellule nello strato sottomucoso. La produzione di melatonina da parte della cistifellea non è stata ancora dimostrata, ma come ricordato poco fa, nella bile sono stati misurati elevatissimi livelli di melatonina diurni dell'indolo ad esempio in ratto, cavia, coniglio, maiale, macaco e uomo (Tan et al. 1999). L'unico studio ad essersi occupato direttamente della cistifellea a questo proposito è quello di Aust et al.

(2004), che nell'uomo hanno documentato l'espressione dell'mRNA di HIOMT sia in omogenati dell'organo, sia in colture di epitelio della colecisti, anche se apparentemente non vi era espressione di mRNA di AANAT. Poiché è il fegato a produrre la bile, mentre la cistifellea la concentra grazie all'assorbimento di acqua, potrebbe essere quest'organo a produrre attivamente melatonina, anche nel caso del tursiope. Axelrod e Weissbach (1961) non trovano attività di HIOMT nel fegato di ratto, macaco e coniglio. Tuttavia, Menendez-Pelaez e Reiter (1993) individuano la melatonina sia tramite RIA sia con immunistochemica nel fegato di ratto, e nella stessa specie, Stefulj et al. (2001) osservano la presenza dell'mRNA di AANAT e HIOMT nel fegato di ratto dopo 40 cicli di PCR, suggerendo livelli bassi di espressione. Infine, Fukuda et al. (2011) trovano immunoreattività per HIOMT nel fegato di uomo. L'unico campione di fegato di tursiope da me analizzato non ha dimostrato immunoreattività, anche se in futuro sarebbe interessante sapere se anche in questa specie la bile presenta elevate concentrazioni di melatonina come in altri mammiferi (Tan et al. 1999).

Per avere un riscontro della presenza di HIOMT nei tessuti immunoreattivi, ho indagato l'espressione del suo mRNA attraverso PCR. Come spiegato al paragrafo 3.6.1, il disegno di primer specifici per la sequenza del tursiope è reso molto difficile dalla mancanza della sequenza completa per questa specie. Le quattro coppie alternative da me disegnate, oltre a quella basata sulla sequenza nota del bovino, non hanno purtroppo dato nessun riscontro positivo, suggerendo quindi che l'mRNA dell'enzima non fosse presente. L'individuo di tursiope da cui ho prelevato i campioni per le analisi di biologia molecolare era morto da meno di due giorni, ed anche se mantenuto a -20°C prima della necropsia, è molto probabile che l'intervallo post-mortem relativamente lungo abbia portato a una sostanziale degradazione dell'RNA, molto meno stabile del DNA in mancanza di appositi reagenti protettivi (Vennemann e Koppelkamm 2010, Koppelkamm et al. 2011). Tuttavia, Bernard et al. (1995) e Rodriguez et al. (1994), nei loro studi sull'espressione di HIOMT nella retina di uomo, hanno osservato che la PCR apparentemente non individuava alcuna banda corrispondente al cDNA dell'enzima, mentre l'analisi dello stesso prodotto di amplificazione tramite Southern Blot ha dimostrato la sua presenza. La seconda tecnica, come già ricordato in precedenza, è molto più sensibile e in grado di rilevare concentrazioni minime di mRNA, al contrario della prima, che in quei casi forniva un falso negativo. L'mRNA di HIOMT è infatti espresso a livelli molto bassi e con variazioni giornaliere pari al 50-100% (Craft 1993, Gauer e Craft 1996), mentre il trascritto di AANAT ha un incremento notturno di espressione fra il 700% e il 1500% (Borjigin et al. 1995, Roseboom et al. 1996), che lo rende più facilmente individuabile con le tecniche più comuni di biologia molecolare. In futuro quindi, sarebbe interessante riesaminare i prodotti di PCR ottenuti con i miei campioni di tursiope con Southern Blot, prima di escludere del tutto l'espressione

dell'mRNA di HIOMT nei tessuti d'interesse. A questo proposito, l'amplicone ottenuto con i primer disegnati sull'esone 14 della sequenza genomica di HIOMT di tursiope potrebbe essere il più adatto allo scopo, poiché è l'unico che ha dato un riscontro positivo (banda del peso molecolare atteso) e univoco (senza bande multiple) nelle PCR condotte su DNA genomico, sia nel campione di cute che di esofago. Ciò significa che fra tutte le coppie di primer da me disegnate, quella basata su EX14 riconosce effettivamente una sequenza codificante del gene di HIOMT nel tursiope.

I risultati del Western Blot complicano il quadro interpretativo. Nessuno dei campioni utilizzati, né di bovino né di tursiope, mostra la banda corrispondente al peso molecolare atteso, che dovrebbe essere di circa 38 kDa, secondo quanto osservato da Fukuda et al. (2011), che mi hanno fornito l'anticorpo primario. Gli stessi autori hanno ottenuto risultati positivi sia con immunistochemica che per Western Blot; la foto della relativa lastra fotografica però è priva del marcatore dei pesi molecolari, perciò il confronto con i miei risultati ne risente. Per il bovino il peso molecolare atteso dovrebbe essere di 39 kDa (Nakane et al. 1993), mentre nel mio caso ottengo una banda di poco inferiore ai 35 kDa, il che potrebbe spiegarsi con una parziale degradazione della proteina, oppure con il riconoscimento di una particolare isoforma. Jackson e Lovenberg (1971) infatti hanno descritto l'esistenza di specie a diverso peso molecolare di HIOMT estratta da pineale bovina, con pesi molecolari fra ca. 38 kDa e 40 kDa, suggerendo la possibilità che l'enzima formi anche aggregati polimerici. Nell'uomo è ben documentata l'esistenza di 3 isoforme di HIOMT, la prima con peso ~38 kDa, la seconda ~33 kDa e la terza ~42 kDa (Bernard et al. 1995, Donohue et al. 1993). Nel caso del tursiope invece, i campioni di retina, intestino e rene che erano risultato immunoreattivi hanno tutti rivelato una banda alla stessa altezza del peso di circa 52-54 kDa. Un risultato piuttosto inaspettato, dato che nella maggior parte dei mammiferi il peso molecolare si aggira sui 38 kDa come appena descritto, con un massimo di ~45 kDa nel ratto (Gauer e Craft 1996).

Poiché la preparazione dei campioni per il Western Blot è avvenuta in condizioni denaturanti, le eventuali subunità di una proteina si dovrebbero dissociare ed osservare come bande distinte alla fine del marcaggio. HIOMT è un enzima dimerico, formato da due subunità di peso molecolare identico (Jackson e Lovenberg 1971), per cui le due subunità formano un'unica banda di intensità marcata, come effettivamente avviene nel campione di pineale bovina. Nei campioni di tursiope, l'osservazione di una singola banda da ~54 kDa potrebbe quindi indicare che l'enzima è formato da due subunità di 26-27 kDa. Se invece per qualche motivo la denaturazione non avesse avuto effetto allora sarebbe una proteina singola. In letteratura ho riscontrato solo due casi che presentavano analogie con il mio. Nel primo caso, Weichmann et al. (1985) hanno condotto con Western Blot contro HIOMT in pineale e retina di bovino, osservando due bande da ~39 kDa e da

~26 kDa nel primo, e solo la banda da ~26 kDa nel secondo tessuto. Questo peso molecolare corrisponderebbe a quella osservata anche nei miei campioni (in caso di proteina denaturata), tuttavia Wiechmann e i suoi collaboratori, come già citato, hanno smentito in uno studio successivo i loro precedenti risultati (Wiechman 1993), dichiarando che questi ultimi erano dovuti a una cross-reattività del loro anticorpo con la recoverina. Nel secondo studio invece, Bernard et al. (1995) hanno condotto Western Blot su campioni di pineale, cellule di retinoblastoma in coltura (Y79) e retina di uomo. Ad un primo esame risultavano due bande piuttosto intense sia nella pineale che nella retina, da ~42 kDa (corrispondente al peso dell'isoforma 3 di HIOMT umana) e da ~54 kDa.

Quest'ultimo peso molecolare corrisponderebbe a quello da me osservato nei campioni di tursiope, nel caso di proteina non denaturata. Gli autori dello studio però, dopo una seconda incubazione dei campioni con antisiero con antigene puro preadsorbito, hanno osservato la sparizione della banda da 42 kDa nel campione di ghiandola pineale, indicando la specificità dell'anticorpo in quel campione. Nella retina però la stessa banda non scompariva, suggerendo perciò un falso positivo. Tuttavia, nel campione di retinoblastoma, una terza banda da ~130 kDa veniva riconosciuta dall'antisiero senza antigene, mentre scompariva dopo trattamento con antisiero preadsorbito, indicando una specificità anche per una proteina diversa da HIOMT, oppure per un suo aggregato polimerico. Gli autori invece non discutono il significato della banda da 54 kDa, che rimaneva anche dopo preadorbimento dell'antisiero solo nella retina, ma complessivamente la specificità del loro anticorpo, policlonale, risulta non priva di dubbi. Alla luce di queste considerazioni, i risultati del mio Western Blot sembrerebbero rivelare che l'anticorpo primario policlonale contro HIOMT umana, qui utilizzato, non riconosca l'enzima del tursiope ma una proteina diversa, che però viene espressa sia in retina, sia in intestino che in rene. Se questa proteina fosse un'isoforma particolare di HIOMT specifica del tursiope, la maggiore intensità della banda del campione di intestino sarebbe coerente con la maggiore quantità di melatonina prodotta da quest'organo, rispetto alla stessa pineale (Bubenik et al. 1999). In base ai miei risultati, non ho elementi sufficienti per dimostrare se le bande osservate nei miei campioni corrispondono ad un'aspecificità oppure no. L'unico modo per individuare in modo inequivocabile l'enzima nei tessuti di tursiope sarebbe quella di disporre dell'antigene purificato, che permetterebbe di ricavare un anticorpo specifico. Al momento ciò non è fattibile, perché la sequenza di HIOMT del tursiope è ancora in fase di sequenziamento. In studi futuri si rende quindi necessario completare il sequenziamento del gene, caratterizzarlo e ricavare la proteina purificata.

Nelle colture cellulari di cute di tursiope sia l'immunocitochimica che la PCR non hanno dato alcun riscontro positivo, indicando che la cute in questa specie non sia in grado di sintetizzare melatonina. Come descritto nell'Introduzione, questa capacità biosintetica è stata dimostrata nella

cute di alcuni mammiferi, come topo (Slominski et al. 2003), criceto (Slominski et al. 1996) e uomo (Slominski et al. 2002), ma in altri mammiferi la produzione di melatonina cutanea rimane ancora da dimostrare.

In conclusione, i dati preliminari di questo studio dimostrano per la prima volta nella specie *Tursiops truncatus* che la melatonina è presente nel sangue, a dispetto dell'apparente assenza di una ghiandola pineale. I livelli plasmatici dell'indolo mostrano alcuni accenni di variazione circadiana e annuale, che necessitano studi futuri più approfonditi. La produzione extrapineale di melatonina in questa specie merita particolare attenzione, per le sue caratteristiche apparentemente diverse da quanto riportato in letteratura per la maggior parte dei mammiferi. In futuro è necessario disporre delle corrette sequenze nucleotidiche degli enzimi AANAT e HIOMT, per poter disegnare primer specifici o per ricavarne le proteine purificate, necessarie per produrre anticorpi specifici. In merito alla ghiandola pineale, è fondamentale continuare le indagini a livello di sviluppo embrionale delle formazioni epitalamiche e della loro caratterizzazione immunoistochimica nell'adulto. In particolare, sarebbe d'interesse primario investigare la presenza della ghiandola pineale anche nella specie *Tursiops aduncus*, considerata anche l'apparente diversità nel pattern di secrezione di melatonina rispetto a *T. truncatus*.

6. BIBLIOGRAFIA

- AARSETH JJ, STOKKAN KA. Quantitative differences in the pineal ultrastructure of perinatal and adult harp (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*). *J Pineal Res* 2003; **35**:188–195.
- ABE T, SHINOHARA T. S-antigen from the rat retina and pineal gland have identical sequences. *Exp Eye Res.* 1990; **51**:111–112.
- AHLBORN F. Untersuchungen über das Gehirn der Petromyzonten. *Zeit Wiss Zool* 1883; **39**:191–294.
- AL-GHOUL WM, ABU-SHAQRA S, PARK BG, FAZAL N. Melatonin plays a protective role in postburn rodent gut pathophysiology. *Int J Biol Sci* 2010; **6**:282–293.
- ANDERSSON H. Plasma melatonin levels in relation to the light–dark cycle and parental background in domestic pigs. *Acta Vet Scand* 2001; **42**:287–294.
- ANDRÉ E, CONQUET F, STEINMAYR M, STRATTON SC, PORCIATTI V, BECKER-ANDRÉ M. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J* 1998; **17**:3867–3877.
- AOKI H, YAMADA N, OZEKI Y, YAMANE H, KATO N. Minimum light intensity required to suppress nocturnal melatonin concentration in human saliva. *Neurosci Lett* 1998; **252**:91–94.
- ARENDDT J. Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London, 1995.
- ARENDDT J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* 1998; **3**:13–22.
- ARNASON U, GULLBERG A, GRETARSDOTTIR S, URSING B, JANKE A. The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *J Mol Evol* 2000; **50**:569–578.
- ARVY L. Endocrine glands and hormonal secretion in cetaceans. *Invest Cetacea* 1971; **3**:229–300.
- ASHKENAZY T, EINAT H, KRONFELD-SCHOR N. We are in the dark here: induction of depression- and anxiety-like behaviours in the diurnal fat sand rat, by short daylight or melatonin injections. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; **12**:83–93.
- AUST S, THALHAMMER T, HUMPELER S, JÄGER W, KLIMPFINGER M, TUCEK G, OBRIST P, MARKTL W, PENNER E, EKMEKCIOGLU C. The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res* 2004; **36**:43–48.
- AXELROD J, WEISSBACH H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960; **131**:1312.
- AXELROD J, WEISSBACH H. Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem* 1961; **236**:211–213.

- BADIU C, BADIU L, COCULESCU M, VILHARDT H, MØLLER M. Presence of oxytocinergic neuronal-like cells in the bovine pineal gland: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *J Pineal Res* 2001; **31**:273–280.
- BADIU C, COCULESCU M, MØLLER M. Arginine vasotocin mRNA revealed by in situ hybridization in bovine pineal gland cells. *Cell Tissue Res* 1999; **295**:225–229.
- BALEMANS MGM, PEVET P, LEGERSTEE WC, NEVO E. Preliminary investigations on melatonin and 5-methoxytryptophol synthesis in the pineal, retina and Harderian gland of the mole rat and in the pineal of the mouse “eyeless.” *J Neural Transm* 1980; **49**: 247–255.
- BARLOW-WALDEN LR, REITER RJ, ABE M, PABLOS M, MENENDEZ-PELAEZ A, CHEN LD, PÖEGGELER B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; **26**:497–502.
- BECKER-ANDRÉ M, WIESENBERG I, SCHAEREN-WIEMERS N, ANDRÉ E, MISSBACH M, SAURAT JH, CARLBERG C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; **269**:28531–28534.
- BEHRMAN G. The pineal organ (*epiphysis cerebri*) of the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*, Linne, 1758). *Aquat Mamm* 1990; **16**:96–100.
- BENOT S, GOBERNA R, REITER RJ, GARCIA-MAURINO S, OSUNA C, GUERRERO JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res* 1999; **27**:59–64.
- BERG GR, KLEIN DC. Pineal gland in organ culture. II. Role of adenosine 3’–5’-monophosphate in the regulation of radiolabeled melatonin production. *Endocrinology* 1971; **89**:453–464.
- BERNARD M, DONOHUE SJ, KLEIN DC. Human hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal gland, retina and Y79 retinoblastoma cells. *Brain Res* 1995; **696**:37–48.
- BERNARD M, VOISIN P, KLEIN DC. Hydroxyindole-O-methyltransferase in Y-79 cells: regulation by serum. *Brain Res* 1996; **727**:118–124.
- BIANCANI B, DA DALT L, LACAVE G, ROMAGNOLI S, GABAI G. Measuring fecal progestogens as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Theriogenology* 2009; **72**:1282–1292.
- BISHNUPURI KS, HALDAR C. Impact of photoperiodic exposures during late gestation and lactation periods on the pineal and reproductive physiology of the Indian palm squirrel, *Funambulus*
- BLASK DE, HILL SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm Suppl* 1986; **21**:433–449.
- BOISSERIE JR, LIHOREAU F, BRUNET M. The position of Hippopotamidae within Cetartiodactyla. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:1537–1541.
- BOJKOWSKI CJ, ALDHOUS ME, ENGLISH J, FRANNEY C, POULTON AL, SKENE DJ, ARENDT J. Suppression of nocturnal plasma melatonin and 6-sulphatoxymelatonin by bright and dim light in man. *Horm Metab Res* 1987; **19**:437–440.

BORJIGIN J, WANG MM, SNYDER SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* 1995; **378**:783–785.

BOTHOREL B, BARASSIN S, SABOUREAU M, PERREAU S, VIVIEN-ROELS B, MALAN A, PÉVET P. In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur J Neurosci* 2002; **16**:1090–1098.

BRAINARD GC, RICHARDSON BA, PETTERBORG LJ, REITER RJ. The effect of different light intensities on pineal melatonin content. *Brain Res* 1982; **233**:75–81.

BREATHNACH AS. The surface features of the brain of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *J Anat* 1955; **89**:343–354.

BREZIS M, ROSEN S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *N Engl J Med* 1995; **332**:647–655.

BRYDEN MM, BUCKENDAHL P, SANDERS J, ORTIZ CL, KENNAWAY DJ. Plasma melatonin concentration in neonatal northern elephant seals, *Mirounga angustirostris*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1994; **109**:895–904.

BRYDEN MM, GRIFFITHS DJ, KENNAWAY DJ, LEDINGHAM J. The pineal gland is very large and active in newborn antarctic seals. *Experientia* 1986; **42**:564–566.

BUBENIK GA. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Hormone Res* 1980; **12**:313–323.

BUBENIK GA, BROWN GM, GROTA LJ. Immunohistochemical localization of melatonin in the rat Harderian gland. *J Histochem Cytochem* 1976; **24**:1173–1177.

BUBENIK GA, BROWN GM, GROTA LJ. Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia* 1977; **33**:662–663.

BUBENIK GA, BROWN GM, UHLIR, GROTA LJ. Immunohistological localization of N-acetyldol-alkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res* 1974; **81**:233–242.

BUBENIK GA, HACKER RR, BROWN GM, BARTOS L. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1999; **26**:56–63.

BUBENIK GA, PANG SF, COCKSHUT JR, SMITH PS, GROVUM LW, FRIENDSHIP RM, HACKER RR.. Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *J Pineal Res* 2000; **28**:9–15.

BUHL EH, OELSCHLÄGER HA. Morphogenesis of the brain in the harbour porpoise. *J Comp Neurol* 1988; **277**:109–125.

BUIJS RM, PÉVET P. Vasopressin- and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. *Cell Tissue Res* 1980; **205**:11–17.

- BUIJS RM, WORTEL J, VAN HEERIKHUIZE JJ, FEENSTRA MG, TER HORST GJ, ROMIJN HJ, KALSBECK A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* 1999; **11**:1535–1544.
- BURNS RB. Histological and immunological studies on the fowl lacrimal gland following surgical excision of Harder's gland. *Res Vet Sci* 1979; **27**:69–75.
- CARDINALI DP, WURTMAN RJ. Hydroxyindole-O-methyltransferase in rat pineal, retina and Harderian gland. *Endocrinology* 1972; **91**:247–252 .
- CARLBERG C, HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN R, STAPLE JK, DELAMARTER JF, BECKER-ANDRÉ M. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; **8**:757–770.
- CARTER DS, GOLDMAN BD. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 1983; **113**:1261–1267.
- CELINSKI K, KONTUREK PC, SLOMKA M, CICHOZ-LACH H, GONCIARZ M, BIELANSKI W, REITER RJ, KONTUREK SJ. Altered basal and postprandial plasma melatonin, gastrin, ghrelin, leptin and insulin in patients with liver cirrhosis and portal hypertension without and with oral administration of melatonin or tryptophan. *J Pineal Res* 2009; **46**:408–414.
- CHAPMAN HC. Observations on the structure of the manatee. *Proc Nat Acad Sci* 1875;452–462.
- CHEMINEAU P, PELLETIER J, GUÉRIN Y, COLAS G, RAVVAULT JP, TOURÉ G, ALMEIDA G, THIMONIER J, ORTAVANT R. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod Nutr Dev* 1988; **28**:409–422.
- CHEN S, WANG QL, NIE Z, SUN H, LENNON G, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, ZACK DJ. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 1997; **19**:1017–1030.
- CHIEFFI G, BACCARI GC, DI MATTEO L, D'ISTRIA M, MINUCCI S, VARRIALE B. Cell biology of the harderian gland. *Int Rev Cytol* 1996; **168**:1–80.
- CHILVERS BL, CORKERON PJ. Abundance of indo-pacific bottlenose dolphins, *Tursiops aduncus*, off point lookout, Queensland, Australia. *Mari Mamm Sci* 2003; **19**:85–95.
- CHULUYAN HE, ROSENSTEIN RE, CHANG SM, GALVEZ MM, CARDINALI DP. Presynaptic effects of melatonin on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. *J Pineal Res* 1991, **10**:165–173.
- CLEMENTZ MT, GOSWAMI A, GINGERICH PD, KOCH PL. Isotopic records from early whales and sea cows: Contrasting patterns of ecological transition. *J Vertebr Paleontol* 2006; **26**:355–370.
- COON SL, DEL OLMO E, YOUNG WS 3RD, KLEIN DC. Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**:4699–4706.

- COON SL, KLEIN DC. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **252**:2–10
- COON SL, MAZURUK K, BERNARD M, ROSEBOOM PH, KLEIN DC, RODRIGUEZ IR. The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization and tissue expression. *Genomics* 1996; **34**:76–84.
- COON SL, ROSEBOOM PH, BALER R, WELLER JL, NAMBOODIRI MAA, KOONIN EV, KLEIN DC () Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 1995; **270**:1681–1683.
- COTO-MONTES A, MASSON-PÉVET M, PÉVET P, MØLLER M. The presence of opioidergic pinealocytes in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*, L.). An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1994; **278**:483–491.
- COZZI B, MIKKELSEN JD, RAVVAULT J-P, MØLLER M. Neuropeptide Y (NPY) and C-flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. *J Comp Neurol* 1992; **316**:238–250.
- COZZI B, MOREI G, RAVVAULT JP, CHESNEAU D, REITER RJ. Circadian and seasonal rhythms of melatonin production in mules (*Equus asinus* x *Equus caballus*). *J Pineal Res* 1991; **10**:130–135.
- COZZI B, SPAGNOLI S, BRUNO L. An overview of the central nervous system of the elephant through a critical appraisal of the literature published in the XIX and XX centuries. *Brain Res Bull* 2001; **54**:219–227.
- CRAFT CM. Molecular biology of the pineal gland: melatonin synthesizing enzymes. In: Yu H-S, Reiter RJ (Eds.), *Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 17–37.
- CRAFT CM, MURAGE J, BROWN B, ZHAN-POE X. Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Mol Brain Res* 1999; **65**:44–51.
- CUELLO AC, TRAMEZZANI JH. The epiphysis cerebri of the Weddell seal: its remarkable size and glandular pattern. *Gen Comp Endocrinol* 1969; **12**:154–164.
- DAVID GFX, HERBERT J. Experimental evidence for a synaptic connection between habenula and pineal ganglion in the ferret. *Brain Res* 1973; **64**:327–343.
- DELGADO MJ, VIVIEN-ROELS B. Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen Comp Endocrinol* 1989; **75**:46–53.
- DEXLER H. Zur Anatomie des Zentralnervensystems von *Elephas indicus*. *Arb Neur Inst Wein* 1907; **15**:137–81.
- DEXLER H. Das Him von *Halicore dugong*. *Erxl Morphol Jahrb* 1912; **45**:97–189.

- DIZHOOR AM, RAY S, KUMAR S, NIEMI G, SPENCER M, BROLLEY D, WALSH KA, PHILIPPOV PP, HURLEY JB, STRYER L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 1991; **251**:915–918.
- DJÉRIDANE Y, PITROSKY B, VIVIEN–ROELS B, SIMONNEAUX V, KIRSCH R, PÉVET P. Long–term daily melatonin infusion induces a large increase in Nacetyltransferase activity, hydroxyindole–O–methyltransferase activity and melatonin content in the Harderian gland and eye of pinealectomized male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Pineal Res* 2000; **29**:65–73.
- DONOHUE SJ, ROSEBOOM PH, ILLNEROVA H, WELLER JL, KLEIN DC. Human hydroxyindole–O–methyltransferase: presence of LINE–1 fragment in a cDNA clone and pineal mRNA. *DNA Cell Biol* 1993; **12**:715–727.
- DOYLE SE, GRACE MS, MCIVOR W, MENAKER M. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci* 2002; **19**:593–601.
- DRAL A. Some quantitative aspects of the retina of *Tursiops truncatus*. *Aquat Mamm* 1975; **2**:28–31.
- DRAL A. On the retinal anatomy of cetacea (mainly *Tursiops truncatus*). In: Harrison R (Ed.), *Functional anatomy of marine mammals*, Academic Press, London, 1977, pp. 81–134.
- DRETS ME, SHAW MW. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**:2073–2077.
- DUBOCOVICH ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 1983, **306**:782–784.
- DUBOCOVICH ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEBJ* 1988; **2**:2765–2773.
- DUBOCOVICH ML, RIVERA–BERMUDEZ MA, GERDIN MJ, MASANA MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003; **8**:d1093–d1108.
- DUFFIELD DW, HALDIMAN JT, HENK WG. Surface morphology of the forebrain of the bowhead whale, *Balaena mysticetus*. *Mar Mammal Sci* 1992; **8**:354–378.
- DUFFIELD DA, WELLS RS. The molecular profile of a resident community of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. In: Pfeiffer CJ (Eds.), *Molecular and cell biology of marine mammals*, Krieger Publishing Company, Melbourne, 2002, pp. 3–11.
- DUKE–ELDER S. System of ophtalmology. II: The anatomy of the visual system. Kimpton, Londra, 1961.
- EAKIN RM, WESTFALL JA. Further observations on the fine structure of the parietal eye of lizards. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; **8**:483–499.
- EARL CR, D'OCCHIO MJ, KENNAWAY DJ, SEAMARK RF. Serum melatonin profiles and endocrine responses of ewes exposed to a pulse of light late in the dark phase. *Endocrinology* 1985; **117**:226–230.

- EGLI M, LEENERS B, KRUGER TH. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction. *Reproduction*. 2010; **140**:643–654.
- EKSTRÖM P, MEISSL H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; **358**:1679–1700.
- ERICKSON LA, LLOYD RV. Practical markers used in the diagnosis of endocrine tumors. *Adv Anat Pathol* 2004; **11**:175–189.
- FAILLACE MP, SARMIENTO MIK, ROSENSTEIN RE. Melatonin effect on [³H]glutamate uptake and release in the golden hamster retina. *J Neurochem* 1996; **67**:623–628.
- FALCÓN J, BESSEAU L, FUENTÈS M, SAUZET S, MAGNANOU E, BOEUF G. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann NY Acad Sci* 2009; **1163**:101–111.
- FISCHER TW, SLOMINSKI A, TOBIN DJ, PAUS R. Melatonin and the hair follicle. *J Pineal Res*. 2008; **44**:1–15.
- FRAZER A, HENSLER JG. Understanding the neuroanatomical organization of serotonergic cells in brain provides insight into the functions of this neurotransmitter. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Fisher SK, Albers RW, Uhler MD (Eds.), *Basic Neurochemistry*, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 1999, pp 264–268.
- FREIRE F, CARDINALI DP. Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the structural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. *J Neural Transm* 1975; **37**:237–257.
- FUJIEDA H, HAMADANIZADEH SA, WANKIEWICZ E, PANG SF, BROWN GM. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* 1999; **93**:793–799.
- FUJIEDA H, SCHER J, HAMADANIZADEH SA, WANKIEWICZ E, PANG SF, BROWN GM. Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. *Vis Neurosci* 2000; **17**:63–70.
- FUKUDA T, AKIYAMA N, IKEGAMI M, TAKAHASHI H, SASAKI A, OKA H, KOMORI T, TANAKA Y, NAKAZATO Y, AKIMOTO J, TANAKA M, OKADA Y, SAITO S. Expression of hydroxyindole-O-methyltransferase enzyme in the human central nervous system and in pineal parenchymal cell tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; **69**:498–510.
- FUNASAKA N, YOSHIOKA M, SUZUKI M, UEDA K, MIYAHARA, UCHIDA S. Seasonal difference of diurnal variations in serum melatonin, cortisol, testosterone, and rectal temperature in Indo-Pacific Bottlenose Dolphins (*Tursiops aduncus*) *Aquat Mamm* 2011; **37**:433–442.
- FUSE G. Sober die Epiphyse bei einigen wasserbewohnenden Säugetieren. *Arb Anat Inst Sendai* 1936; **18**:241–341.
- GANNON DP, BARROS NB, NOWACEK DP, READ AJ, WAPLES DM, WELLS RS. Prey detection by bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): an experimental test of the passive-listening hypothesis. *Anim Behav* 2005; **69**:709–720 .

- GASTEL JA, ROSEBOOM PH, RINALDI PA, WELLER JL, KLEIN DC. Melatonin production: proteosomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998; **279**:1358–1360.
- GAUER F, CRAFT CM. Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res* 1996; **737**:99–109.
- GAUER F, MASSON-PÉVET M, PÉVET P. Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res* 1993; **602**:153–156.
- GAUER F, POIREL VJ, GARIDOU ML, SIMONNEAUX V, PÉVET P. Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Mol Brain Res* 1999; **71**:87–95.
- GEISLER JH, UHEN MD. Phylogenetic relationships of extinct cetartiodactyls: results of simultaneous analyses of molecular, morphological, and stratigraphic data. *J Mamm Evol* 2005, **12**: 145–160.
- GERLACH T, AURICH JE. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci* 2000; **58**:197–213.
- GERN WA, RALPH CL. Melatonin synthesis by the retina. *Science* 1979; **204**:183–184.
- GERSCH I. Note on the pineal gland of the humpback whale. *J Mammal* 1938; **19**:477–480.
- GIBBS FP, VRIEND J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 1981; **109**:1796–1798.
- GIGUÈRE V, TINI M, FLOCK G, ONG E, EVANS RM, OTULAKOWSKI G. Isoform-specific aminoterminal domains dictate DNA-binding properties of ROR α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 1994; **8**:538–553.
- GINGERICH PD, HAQ MU, ZALMOUT IS, KHAN IH, MALKANI MS. Origin of whales from early artiodactyls: hands and feet of Eocene Protocetidae from Pakistan. *Science* 2001; **293**:2239–2242.
- GINGERICH PD, WELLS NA, RUSSELL DE, SHAH SMI. Origin of whales in epicontinental remnant seas: new evidence from the early Eocene of Pakistan. *Science* 1983; **220**:403–406.
- GOLDMAN BD. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. *Sci STKE* 2003; **2003**:PE29.
- GRAY NM, KAINEC K, MADAR S, TOMKO L, WOLFE S. Sink or swim? Bone density as a mechanism for buoyancy control in early cetaceans. *Anat Rec (Hoboken)* 2007; **290**:638–653.
- GREEN, RF 1972. Observations on the anatomy of some cetaceans and pinnipeds. In: Ridgeway SH (Ed.), *Mammals of the sea: biology and medicine*, Charles C Thomas Publisher, Springfield, IL, pp. 247–297.
- GRIFFITHS DJ, BRYDEN MM, KENNAWAY DJ. A fluctuation in plasma melatonin level in the Weddell seal during constant natural light. *J Pineal Res* 1986; **3**:127–134.

- GRIFFITHS D, SEAMARK RF, BRYDEN MM. Summer and winter cycles in plasma melatonin levels in the elephant seal (*Mirounga leonina*). Aust J Biol Sci. 1979;**32**:581–586.
- GRUENBERGER HB. On the cerebral anatomy of the Amazon dolphin *Inia geoffrensis*. Invest Cetacea 1970; **2**:129–144.
- GUÉRIN MV, DEED JR, KENNAWAY DJ, MATTHEWS CD. Plasma melatonin in the horse: measurements in natural photoperiod and in acutely extended darkness throughout the year. J Pineal Res 1995; **19**:7–15.
- HALDAR C, YADAV R, ALIPREETA A. Annual reproductive synchronization in ovary and pineal gland function of female short-nosed fruit bat, *Cynopterus sphinx*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2006; **144**:395–400.
- HAM M, KAUNITZ JD. Gastroduodenal defense. Curr Opin Gastroenterol 2007; **23**:607–616.
- HAMADA T, OOTOMI M, HORIKAWA K, NIKI T, WAKAMATU H, ISHIDA N. The expression of the melatonin synthesis enzyme: arylalkylamine N-acetyltransferase in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. Biochem Biophys Res Commun 1999; **258**:772–777.
- HARITOU SJ, ZYLSTRA R, RALLI C, TURNER S, TORTONESE DJ.. Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod. J Neuroendocrinol 2008; **20**:988–996.
- HARLOW HJ, PHILLIPS JA, RALPH CL. Circadian rhythms and the effects of exogenous melatonin in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*: a mammal lacking a distinct pineal gland. Physiol Behav 1982;**29**:307–313.
- HARRISON RJ, JOHNSON FR, YOUNG BA. The small intestine of dolphins (*Tursiops*, *Delphis*, *Stenella*). In: Harrison RJ (Ed.), Functional anatomy of marine mammals, Academic Press, New York, 1977, pp. 297–331.
- HAUG, H. Die Epiphyse und die circumventrikulären strukturen des epithalamus im gehirn des elefanten (*Loxodonta africana*). Z Zellforsch 1972; **129**:533–547.
- HAY RJ, CLELAND MM, DURKIN S, REID YA. Cell line preservation and authentication. In: Masters JRW (Ed.), Animal cell culture: a practical approach, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 2000, pp. 69–103.
- HENRY J. HARLOW, JOHN A. PHILLIPS, CHARLES L. RALPH. Day-night rhythm in plasma melatonin in a mammal lacking a distinct pineal gland, the nine-banded armadillo. Gen Comp Endocrinol 1981; **45**:212–218.
- HERSHKOVITZ P. A catalogue of living whales. Bull US Natl Mus 1966; **246**:1–259.
- HEYNING JE. Functional morphology involved in intraspecific fighting of the beaked-whale, *Mesoplodon carlhubbsi*. Can J Zool 1984; **62**:1645–1654.
- HEYNING JE. Comparative facial anatomy of beaked whales (Ziiphidae) and a systematic revision among the families of extant Odontoceti. Contrib Sci 1989; **405**:1–64.

- HOFFMAN RA, JOHNSON LB, REITER RJ. Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J Pineal Res* 1985; **2**:161–168.
- HOHN AA. Age estimation. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2008, pp. 6–13.
- HOLLOWAY WR, GROTA LJ, BROWN GM. Determination of immunoreactive melatonin in the colon of the rat by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1980; **28**:255–262.
- HOLZMANN T. Morphologie und mikroskopische Anatomie des Gehirns beim fetalen Narwal, *Monodon monoceros*, Ph.D. Thesis. University of Frankfurt am Main, Frankfurt am Main, 1991.
- HUANG SK, KLEIN DC, KORF HW. Immunocytochemical demonstration of rod-opsin, S-antigen, and neuron-specific proteins in the human pineal gland. *Cell Tissue Res* 1992; **267**:493–498.
- HUETHER G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 1993; **49**:665–670.
- HUGHES A. The topography of vision in mammals of contrasting life style: comparative optics and retinal organization. In: Crescitelli F (Ed.), *Handbook of sensory physiology: the visual system in vertebrates*, Vol. VII, Springer, Berlin, 1977, pp. 613–756.
- HULBERT RC. Postcranial osteology of the North American middle Eocene protocetid *Georgiacetus*. In: Thewissen JGM (Ed.), *The emergence of whales, evolutionary patterns in the origin of Cetacea*, Plenum Press, New York, 1998, pp. 235–268.
- ILLNEROVA H, VANECEK J. Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of a year. *Neuroendocrinology* 1980; **31**:321–326.
- JACKSON RL, LOVENBERG W. Isolation and characterization of multiple forms of hydroxyindole-o-methyltransferase. *J Biol Chem* 1971; **246**:4280–4285.
- JACOBS GH. The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1993; **68**:413–471.
- JANSEN J, JANSEN JKS. The nervous system of Cetacea. In: Andersen HT (Ed.), *The biology of marine mammals*, Andersen Academic Press, New York, 1969, pp. 175–252.
- KADO M, YOSHIDA A, HIRA Y, SAKAI Y, MATSUSHIMA S. Light and electron microscopic immunocytochemical study on the innervation of the pineal gland of the tree shrew (*Tupaia glis*), with special reference to peptidergic synaptic junctions with pinealocytes. *Brain Res* 1999; **842**:359–375.
- KALSBECK A, GARIDOU ML, PALM IF, VAN DER VLIET J, SIMONNEAUX V, PÉVET P, BUIJS RM. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 2000; **12**:3146–3254.
- KEMP B, OELSCHLÄGER HHA. Evolutionary strategies of odontocete brain development. *Historical Biology* 2000; **14**:41–45.

KENNAWAY DJ, VOULTSIOS A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**:1013–1015.

KEVANY BM, PALCZEWSKI K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* 2010; **25**:8–15.

KINAHAN AA, INGE–MOLLER R, BATEMAN PW, KOTZE A, SCANTLEBURY M. Body temperature daily rhythm adaptations in African savanna elephants (*Loxodonta africana*). *Physiol Behav* 2007; **92**:560–565.

KING TS, STEINLECHNER S. Pineal indolalkylamine synthesis and metabolism: kinetic considerations. *Pineal Res Rev* 1985; **3**:69–113.

KLEIN DC. Circadian rhythms in indole metabolism in the rat pineal gland. In: Schmitt FO, Worden FG (Eds.), *The neurosciences – third study program*. MIT Press, Cambridge, MA, 1974, pp. 509–515.

KLEIN DC, COON SL, ROSEBOOM PH, WELLER JL, BERNARD M, GASTEL JA, ZATZ M, IUVONE PM, RODRIGUEZ IR, BÉGAY V, FALCÓN J, CAHILL GM, CASSONE VM, BALER R. The melatonin rhythm–generating enzyme: molecular regulation of serotonin N–acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; **52**:307–358.

KLEIN DC, MOORE RY, REPPERT SM. *Suprachiasmatic nucleus: the mind’s clock*. Oxford University Press, New York, 1991.

KLEIN DC, ROSEBOOM PH, COON SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view. *Trends Endocrinol Metab* 1996; **7**:106–112.

KONTUREK SJ, KONTUREK PC, BRZOZOWSKA I, PAWLIK M, SLIWOWSKI Z, CZEŚNIKIEWICZ-GUZIŁ M, KWIECIEŃ S, BRZOZOWSKI T, BUBENIK GA, PAWLIK WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol* 2007; **58**:381–405.

KOPIN IJ, PARE CMB, AXELROD J, WEISSBACH H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 1961; **236**:3072–3075.

KOPPELKAMM A, VENNEMANN B, LUTZ–BONENGEŁ S, FRACASSO T, VENNEMANN M. RNA integrity in post–mortem samples: influencing parameters and implications on RT–qPCR assays. *Int J Legal Med* 2011; **125**:573–580.

KORF HW, FOSTER RG, EKSTRÖM P, SCHALKEN JJ. Opsin–like immunoreaction in the retinae and pineal organs of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 1985b; **242**:645–648.

KORF HW, MØLLER M. The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. *Pineal Res Rev* 1984; **2**:41–86.

KORF HW, MØLLER M, GERY I, ZIGLER JS, KLEIN DC. Immunocytochemical demonstration of retinal S–antigen in the pineal organ of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 1985a; **239**:81–85.

- KORF HW, OKSCHE A, EKSTRÖM P, GERY I, ZIGLER JS JR, KLEIN DC. Pinealocyte projections into the mammalian brain revealed with S-antigen antiserum. *Science* 1986; **231**:735–737.
- KORF HW, SATO T, OKSCHE A. Complex relationships between the pineal organ and the medial habenular nucleus–pretectal region of the mouse as revealed by S-antigen immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* 1990; **261**:493–500.
- KORF HW, WHITE BH, SCHAAD NC, KLEIN DC. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res* 1992; **595**:57–66.
- KOTLER M, RODRIGUEZ C, SAINZ RM, ANTOLIN I, MENENDEZ–PELAEZ A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998; **24**:83–89.
- KRAMER SG. Dopamine: a retinal neurotransmitter. I. Retinal uptake, storage, and light-stimulated release of H³-dopamine in vivo. *Invest Ophthalmol* 1971; **10**:438–452.
- KRAMM CM, DE GRIP WJ, KORF HW. Rod-opsin immunoreaction in the pineal organ of the pigmented mouse does not indicate the presence of a functional photopigment. *Cell Tissue Res* 1993; **274**:71–78.
- KÜKENTHAL W, ZIEHEN T. Vergleichend-anatomische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Walthieren. In: Fisher G (Ed.) *Das Centralnervensystem der Cetaceen*. Denkschrift der Medizinisch–Naturwissenschaftlichen Gesellschaft, Vol. 3, Jena, 1889, pp. 80–200.
- KUMAR K, SAHNI A. *Remingtonocetus harudiensis*, new combination, a Middle Eocene archaeocete (Mammalia, Cetacea) from Western Kutch, India. *J Vertebr Paleontol* 1986; **6**:326–349.
- KUSAKABE TG, TAKIMOTO N, JIN M, TSUDA M. Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Phil Trans R Soc B* 2009; **364**:2897–2910.
- KUWANO R, IWANAGA T, NAKAJIMA T, MASUDA T, TAKAHASHI Y. Immunocytochemical demonstration of hydroxyindole O-methyltransferase (HIOMT), neuron-specific enolase (NSE) and S-100 protein in the bovine pineal gland. *Brain Res* 1983; **274**:171–175.
- KVETNOY IM, INGEL IE, KVETNAIA TV, MALINOVSKAYA NK, RAPOPORT SI, RAIKHLIN NT, TROFIMOV AV, YUZHAKOV VV. Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; **23**:121–132.
- LANDE R. Evolutionary mechanisms of limb loss in tetrapods. *Evolution* 1978; **32**:73–92.
- LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 2007; **23**:2947–2948.
- LARKIN JE, JONES J, ZUCKER I. Temperature dependence of gonadal regression in Syrian hamsters exposed to short day lengths. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; **282**:R744–R752.

- LARSEN PJ, ENQUIST LW, CARD JP. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur J Neurosci* 1998; **10**:128–145.
- LARSEN PJ, MØLLER M, MIKKELSEN JD. Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat. A *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J Comp Neurol* 1991; **306**:462–479.
- LEATHERWOOD S. Some observations of feeding behavior of bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Gulf of Mexico and (*Tursiops cf. gilli*) off southern California, Baja California, and Nayarit, Mexico. *Mar Fish Rev* 1975; **37**:10–16 .
- LERNER AB, CASE JD, TAKAHASHI Y, LEE TH, MORI W. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc* 1958; **80**:2587.
- LI X, CHEN S, WANG Q, ZACK DJ, SNYDER SH, BORJIGIN J. A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retina-specific transcription factor CRX. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:1876–1881.
- LING JK. Vibrissae of marine mammals. In: Harrison RJ (Ed.), *Functional anatomy of marine mammals*, Academic Press, New York, 1977, pp. 387–415.
- LITTLE GJ, BRYDEN MM. The pineal gland in newborn southern elephant seals, *Mirounga leonina*. *J Pineal Res* 1990; **9**:139–148.
- LIU C, WEAVER DR, JIN X, SHEARMAN LP, PIESCHL RL, GRIBKOFF VK, REPPERT SM. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997; **19**:91–102.
- LOTUFO CM, LOPES C, DUBOCOVICH ML, FARSKY SH, MARKUS RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*. 2001; **430**:351–357.
- LOVENBERG W, JEQUIER E, SJOERDSMA A. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. *Science* 1967; **155**:217–219.
- LYAMIN OI, MANGER PR., RIDGWAY SH, MUKHAMETOV LM, SIEGEL JM. Cetacean sleep: an unusual form of mammalian sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; **32**:1451–1484.
- MACCHI MM, BRUCE JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; **25**:177–195.
- MAESTRONI GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; **10**:467–476.
- MALPAUX B, DAVEAU A, MAURICE-MANDON F, DUARTE G, CHEMINEAU P. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 1998; **139**:1508–1516.

- MANN J, SARGEANT B. Like mother, like calf: the ontogeny of foraging traditions in wild Indian Ocean bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.). In: Fragaszy D, Perry S (Eds.), *The biology of traditions: models and evidence*, Cambridge University Press, Cambridge, 2003, pp. 236–266.
- MANTIS NJ, FORBES SJ. Secretary IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol Invest* 2010; **39**:383–406.
- MARINO L. Cetacean Brain Evolution: Multiplication Generates Complexity. *Int J Comp Psychol* 2004; **17**:1–16.
- MARINO L, SHERWOOD CC, DELMAN BN, TANG CY, NAIDICH TP, HOF PR. Neuroanatomy of the killer whale (*Orcinus orca*) from magnetic resonance images. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; **281A**:1256–1263.
- MARINO L, SUDHEIMER K, McLELLAN WA JOHNSON JI. Neuroanatomical structure of the spinner dolphin (*Stenella longirostris orientalis*) brain from magnetic resonance images. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; **279A**:601–610.
- MARINO L, SUDHEIMER KD, MURPHY TL, DAVIS KK, PABST DA, McLELLAN WA, RILLING JK, JOHNSON JI. Anatomy and three-dimensional reconstructions of the brain of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from magnetic resonance images. *Anat Rec* 2001; **264**:397–414.
- MARINO L, SUDHEIMER KD, PABST DA, McLELLAN WA, FILSOOF D, JOHNSON JI. Neuroanatomy of the common dolphin (*Delphinus delphis*) as revealed by magnetic resonance imaging (MRI). *Anat Rec* 2002; **268**:411–429.
- MARINO L, SUDHEIMER K, PABST DA, McLELLAN WA, JOHNSON JI. Magnetic resonance images of the brain of a dwarf sperm whale (*Kogia simus*). *J Anat* 2003; **203**:57–76.
- MARINO L, SUDHEIMER K, SARKO D, SIRPENSKI G, JOHNSON JI. Neuroanatomy of the harbor porpoise (*Phocena phocena*) from magnetic resonance images. *J Morphol* 2003; **257**:308–347.
- MARSH H, HEINSOHN GE, GLOVER TD. Changes in the male reproductive organs of the dugong (*Sirenia*, Dugongidae) with age and reproductive activity. *Aust J Zool* 1984; **32**:721–742.
- MASANA MI, DUBOCOVICH ML. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE*. 2001; **2001**:pe39.
- MASLAND RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 2001; **4**:877–886.
- MASLAND RH, MILLS JW, CASSIDY C. The functions of acetylcholine in the rabbit retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1984; **223**:121–139.
- MASON R, BROOKS A. The electrophysiological effects of melatonin and a putative melatonin antagonist (N-acetyltryptamine) on rat suprachiasmatic neurones in vitro. *Neurosci Lett* 1988; **95**:296–301.
- MASS AM, SUPIN AY. Ganglion cell topography of the retina in the bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *Brain Behav Evol* 1995; **45**:257–265.

MASS AM, SUPIN AYA. Adaptive features of aquatic mammals' eye. *Anat Rec (Hoboken)* 2007; **290**:701–715.

MASS AM, SUPIN AYA. Vision. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2008, pp. 472–477.

MATSUSHIMA S, SAKAI Y, HIRA Y. Peptidergic peripheral nervous systems in the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech* 1999; **46**:265–280.

MATSUSHIMA S, SAKAI Y, HIRA Y, OOMORI Y, DAIKOKU S. Immunohistochemical studies on sympathetic and non-sympathetic nerve fibers and neuronal cell bodies in the pineal gland of cotton rats, *Sigmodon hispidus*. *Arch Histol Cytol* 1994; **57**:47–58.

MAYER, C. Beitrage zur Anatomie des Elephanten und der übrigen Pachydermen. *Nova Acta Acad Leop, Phys-Med* 1847; **22**:1–88.

MAYWOOD ES, HASTINGS MH. Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 1995; **136**:144–153.

MAYWOOD ES, HASTINGS MH, MAX M, AMPLEFORD E, MENAKER M, LOUDON AS. Circadian and daily rhythms of melatonin in the blood and pineal gland of free-running and entrained Syrian hamsters. *J Endocrinol* 1993; **136**:65–73.

MEAD JG. Gastrointestinal Tract. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2008, pp. 472–477.

MEAD JG, POTTER CW. Natural history of bottlenose dolphins along the central atlantic coast of the United States. In: *The bottlenose dolphin*, Leatherwood S, Reeves R (Eds.), Academic Press, New York, 1990, pp. 165–195.

MENENDEZ-PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ, BARLOW-WALDEN L, PABLOS MI, TAN DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 1993; **53**:373–382.

MENENDEZ-PELAEZ A, REITER RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993; **15**:59–69.

MESSNER M, HARDELAND R, RODENBECK A, HUETHER G. Tissue retention and subcellular distribution of continuously infused melatonin in rats under near physiological conditions. *J Pineal Res* 1998; **25**:251–259.

MEUSY-DESSOLLE N, TILLET Y. Immunohistochemical demonstration of melatonin in the female mink harderian gland. *Anat Rec* 1992; **234**:549–554.

McFARLAND WL, MORGANE PJ, JACOBS MS. Ventricular system of the brain of the dolphin, *Tursiops truncatus*, with comparative anatomical observations and relations to brain specializations. *J Comp Neurol* 1969; **135**:275–368.

- MIGUEZ JM, SIMONNEAUX V, PÉVET P. Evidence for a regulatory role of melatonin on serotonin uptake and release from rat pineal glands. *J Neuroendocrinol* 1995; **7**:944–956.
- MIKKELSEN JD, HAUSER F, DELECEA L, SUTCLIFFE JG, KILDUFF TS, CALGARI C, PÉVET P, SIMONNEAUX V. Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline–induced release of melatonin. *Eur J Neurosci* 2001; **14**:419–425.
- MIKKELSEN JD, MØLLER M. A direct neuronal projection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus to the deep pineal gland of the rat, demonstrated with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA–L). *Brain Res* 1990; **520**:342–347.
- MILLER GSJr. The telescoping of the cetacean skull. *Smithson Misc Coll* 1923; **76**:1–55.
- MILLER PJO, JOHNSON MP, TYACK PL, TERRAY EA. Swimming gaits, passive drag and buoyancy of diving sperm whales *Physeter macrocephalus*. *J Exp Biol* 2004; **207**:1953–1967.
- McINTYRE IM, NORMAN TR, BURROWS GD, ARMSTRONG SM. Human melatonin suppression by light is intensity dependent. *J Pineal Res* 1989; **6**:149–156.
- MITCHELL CK, REDBURN DA. Melatonin inhibits ACh release from rabbit retina. *Vis Neurosci* 1991; **7**:479–486.
- MØLLER M. Peptidergic cells in the mammalian pineal gland. Morphological indications for a paracrine regulation of the pinealocyte. *Biol Cell* 1997; **89**:561–567.
- MØLLER M. Introduction to mammalian pineal innervation. *Microsc Res Tech* 1999; **46**:235–238.
- MØLLER M, BAERES FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 2002; **309**:139–150.
- MØLLER M, HAY–SCHMIDT A. Direct neuronal projection from the dorsal raphe nucleus to the pineal complex of the rat: a *Phaseolus vulgaris*–leucoagglutinin in vivo neuronal tracing study. *J Pineal Res* 1998; **25**:19–23.
- MØLLER M, INGILD A, BOCK E. Immunohistochemical demonstration of S–100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res* 1978; **140**:1–13.
- MØLLER M, MIKKELSEN JD. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide histidine isoleucine (PHI) in the mammalian pineal gland. *Adv Pineal Res* 1989; **3**:1–10.
- MONTIE EW, PUSSINI N, SCHNEIDER GE, BATTEY TW, DENNISON S, BARAKOS J, GULLAND F. Neuroanatomy and volumes of brain structures of a live California sea lion (*Zalophus californianus*) from magnetic resonance images. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; **292**:1523–1547.
- MONTIE EW, SCHNEIDER G, KETTEN DR, MARINO L, TOUHEY KE, HAHN ME.. Volumetric neuroimaging of the Atlantic white–sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) brain from in situ magnetic resonance images. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; **291**:263–282.
- MOORE RY, LENN NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 1972; **146**:1–14.

MORGANE PJ, JACOBS MS. Comparative anatomy of the cetacean nervous system. In: Harrison RJ (Ed.), *Functional anatomy of marine mammals*, Vol. 1, Academic Press, London, New York, 1972, pp. 117–244.

MOWAT FM, PETERSEN–JONES SM, WILLIAMSON H, WILLIAMS DL, LUTHERT PJ, ALI RR, BAINBRIDGE JW. Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. *Mol Vis* 2008; **14**:2518–2527.

MUNCH IC, MØLLER M, LARSEN PJ, VRANG N. Light induced c–Fos expression in SCN neurons targeting the paraventricular nucleus of the hamster hypothalamus: phase dependency and immunochemical identification. *J Comp Neurol* 2002; **442**:48–62.

NORMAN JR, FRASER FC. *Giant fishes, whales and dolphins*. Putnam, Londra, 1948.

NAGLE CA, CARDINALI DP, ROSNER JM. Retinal and pineal hydroxyindole–O–methyltransferases in the rat: changes following cervical sympathectomy, pinealectomy or blinding. *Endocrinology* 1973; **92**:1560–1564.

NAKAMURA Y, TAMURA H, KASHIDA S, TAKAYAMA H, YAMAGATA Y, KARUBE A, SUGINO N, KATO H.. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto–placental unit during pregnancy. *J Pineal Res* 2001; **30**:29–33.

NAKANE M, YOKOYAMA E, DEGUCHI T. Species heterogeneity of pineal hydroxyindole–O–methyltransferase. *J Neurochem* 1983; **40**:790–796.

NELSON RJ, DRAZEN DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann NY Acad Sci* 2000; **917**:404–415.

NIKI T, HAMADA T, OHTOMI M, SAKAMOTO K, SUZUKI S, KAKO K, HOSOYA Y, HORIKAWA K, ISHIDA N. The localization of the site of arylalkylamine N–acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**:115–120.

NIR I, HIRSCHMANN N, SULMAN FG. The effect of heat on rat pineal hydroxyindole–O–methyltransferase activity. *Experientia* 1975; **31**:867–868.

NOBRE A, KALVE I, CESNULEVICIUS K, RAGANCOKOVA D, RATZKA A, HALFER N, WESEMANN M, KRAMPFL K, CLAUS P, GROTHE C. Characterization and differentiation potential of rat ventral mesencephalic neuronal progenitor cells immortalized with SV40 large T antigen. *Cell Tissue Res* 2010; **340**:29–43.

NOSJEAN O, FERRO M, COGE F, BEAUVERGER P, HENLIN JM, LEFOULON F, FAUCHERE JL, DELAGRANGE P, CANET E, BOUTIN JA. Identification of the melatonin–binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*. 2000; **275**:31311–31317.

NOZAKI M, TSUSHIMA M, MORI Y. Diurnal changes in serum melatonin concentrations under indoor and outdoor environments and light suppression of nighttime melatonin secretion in the female Japanese monkey. *J Pineal Res* 1990; **9**:221–230.

- NUMMELA S, THEWISSEN JG, BAJPAI S, HUSSAIN ST, KUMAR K. Eocene evolution of whale hearing. *Nature* 2004; **430**:776–778.
- OELSCHLÄGER HA, BUHL EH. Development and rudimentation of the peripheral olfactory system in the harbor porpoise *Phocoena phocoena* (Mammalia: Cetacea) *J Morphol* 1985; **184**: 351–360.
- OELSCHLÄGER HHA, HAAS-RIOTH M, FUNG C, RIDGWAY SH, KNAUTH M. Morphology and evolutionary biology of the dolphin (*Delphinus* sp.) brain – MR imaging and conventional histology. *Brain Behav Evol* 2008; **71**:68–86.
- OELSCHLÄGER HHA, KEMP B. Ontogenesis of the sperm whale brain. *J Comp Neurol* 1998; **399**:210–228.
- OELSCHLÄGER HHA, RIDGWAY SH, KNAUTH M. Cetacean brain evolution: dwarf sperm whale (*Kogia sima*) and common dolphin (*Delphinus delphis*) – an investigation with high-resolution 3D MRI. *Brain Behav Evol* 2010; **75**:33–62.
- OKSCHE A, VAUPEL-VON HARNACK M. Electron microscopic studies on the nerve tracts of the pineal complex of *Rana esculenta* L. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1965; **68**:389–426.
- O’LEARY MA. The phylogenetic position of cetaceans: further combined data analyses, comparisons with the stratigraphic record and a discussion of character optimization. *Amer Zool* 2001; **41**:487–506.
- ORTIZ GG, FALCÓN-FRANCO MA, BITZER-QUINTERO OK, FERIA-VELASCO A. Sexual differences and circadian rhythm of Harderoporphylin concentrations in Mongolian gerbil. *Proc Congr Nac Cien Fisiol* 1994; **37**:128.
- ORTIZ GG, FERIA-VELASCO A, PACHECO-MOISÉS FP, RODRÍGUEZ-REINOSO S, CRUZ-RAMOS JA, ROSALES-CORRAL SA, REITER RJ. Scanning electron microscopy of the orbital Harderian gland in the male Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Anat Histol Embryol* 2009; **38**:279–281.
- ORTIZ GG, FERIA-VELASCO A, TARPLEY RL, BITZER-QUINTERO OK, ROSALES-CORRAL SA, VELÁZQUEZ-BRIZUELA IE, LÓPEZ-NAVARRO OG, REITER RJ. The orbital Harderian gland of the male Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): a morphological study. *Anat Histol Embryol* 2007; **36**:209–214.
- OSOL G, SCHWARTZ B, FOSS DC. Effects of time, photoperiod, and pinealectomy on ocular and plasma melatonin concentrations in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 1985; **58**:415–420.
- PABST DA. Intramuscular morphology and tendon geometry of the epaxial swimming muscles of dolphins. *J Zool Lond* 1993; **230**:159–176.
- PALCZEWSKI K, MCDOWELL JH, JAKES S, INGEBRITSEN TS, HARGRAVE PA. Regulation of Rhodopsin dephosphorylation by arrestin. *J Biol Chem* 1989; **264**:1577–15773.
- PANG SF, YEW DT. Pigment aggregation by melatonin in the retinal pigment epithelium and choroid of guinea pigs, *Cavia porcellus*. *Experientia* 1979; **35**:231–233.

- PARSONS KM, DURBAN JW, CLARIDGE DE. Male–male aggression renders bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) unconscious. *Aq Mamm* 2003; **29**:360–362.
- PAYNE AP. The harderian gland: a tercentennial review. *J Anat* 1994; **185**:1–49.
- PEDERSEN EB, FOX LM, CASTRO AJ, MCNULTY JA. Immunocytochemical and electron–microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res* 1993; **272**:257–265.
- PEICHL L. Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005; **287**:1001–1012.
- PEICHL L, BEHRMANN G, KRÖGER RH. For whales and seals the ocean is not blue: a visual pigment loss in marine mammals. *Eur J Neurosci* 2001; **13**:1520–1528.
- PERENTES E, RUBINSTEIN LJ, HERMAN MM, DONOSO LA. S–antigen immunoreactivity in human pineal glands and pineal parenchymal tumors. A monoclonal antibody study. *Acta Neuropathol* 1986; **71**:224–227.
- PERRIN WF, REILLY SB. Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae. *Rep Int Whal Commn Spec Issue* 1984 **6**:97–133.
- PÉVET P, BALEMANS MG, LEGERSTEE WC, VIVIEN–ROELS B. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole–O–methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5–methoxytryptophol in the pineal, retina, and harderian gland of the golden hamster. *J Neural Transm* 1980; **49**:229–245.
- PEVET P, HETH G, HIAM A, NEVO E. Photoperiod perception in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*, Nehring): involvement of the Harderian gland, atrophied eyes, and melatonin. *J Exp Zool* 1984; **232**:41–50.
- PÉVET P, VIVIEN–ROELS B, MASSON–PÉVET M. Effect of temperature on the gonadal atrophy induced by short photoperiod in the golden hamster. In: Assenmacher I, Boissin J (Eds.), *Endocrine regulations as adaptative mechanism to the environment*, Editions du CNRS, Paris, 1986, pp 201–206.
- PHILLIPS JA, HARLOW HJ, MCARTHUR NH, RALPH CL. Epithalamus of the nine–banded armadillo, *Dasybus novemcinctus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1986; **85**:477–481.
- PICCIONE G, CAOLA G, REFINETTI R. The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biol Rhythm Res* 2002; **33**:113–119.
- PILLERI G. Morphologie des Gehirnes des Blauwals *Balaenoptera musculus* Linnaeus (Cetacea, Mysticeti, Balaenopteridae). *Jahrb Naturhist Mus Bern* 1965;187–203.
- PILLERI G. Morphologie des Gehirnes des Seiwals *Balaenoptera borealis* Lesson (Cetacea, Mysticeti, Balaenopteridae). *J Hirnforsch* 1966a; **8**:221–267.
- PILLERI G. Morphologie des Gehirnes des Seiwals *Megaptera novaeangliae* Borowski (Cetacea, Mysticeti, Balaenopteridae). *J Hirnforsch* 1966b; **8**:447–491.

- PINTOR J, MARTIN L, PELAEZ T, HOYLE CH, PERAL A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol* 2001; **416**:251–254.
- PITROSKY B, KIRSCH R, VIVIEN–ROELS B, GEORG–BENTZ I, CANGUILHEM B, PEVET P. The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* 1995; **7**:889–895.
- POPOVA JS, DUBOCOVICH ML. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J Neurochem* 1995; **64**:130–138.
- POZO D, GARCÍA–MAURIÑO S, GUERRERO JM, CALVO JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxyindole–O–methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res* 2004; **37**:48–54.
- PROTHERO DR. The late Eocene–Oligocene extinctions. *Annu Rev Earth Pl Sc* 1994; **22**:145–165.
- QUAY WB, MA YH. Demonstration of gastrointestinal hydroxyindole–O–methyltransferase. *Med Sci* 1976; **4**:563.
- RAIKHLIN NT, KVETNOY IM, TOLKACHEV VN. Melatonin may be synthesised in enterochromaffin cells. *Nature* 1975; **255**:344–345.
- RALPH CL, YOUNG S, GETTINGER R, O'SHEA TJ. Does the manatee have a pineal body? *Acta Zool* 1985; **66**:55–60.
- RAPAPORT DH, STONE J. The area centralis of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. *Neuroscience* 1984; **11**:289–301.
- RAUSCHMANN MA, HUGGENBERGER S, KOSSATZ LS, OELSCHLÄGER HH. Head morphology in perinatal dolphins: a window into phylogeny and ontogeny. *J Morphol* 2006; **267**:1295–1315.
- READ AJ, WELLS RS, HOHN AH, SCOTT MD. Patterns of growth in wild bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *J Zool (Lond)* 1993; **231**:107–123.
- REITER RJ. Intrinsic rhythms of the pineal gland and associated hormone cycles in body fluids. *Annu Rev Chronopharmacol* 1988; **4**:77–105.
- REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151–80.
- REITER RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med* 1998; **30**:103–108.
- REITER RJ, MELCHIORRI D, SEWERYNEK E, POEGGELER B, BARLOW–WALDEN L, CHUANG J, ORTIZ GG, ACUÑA–CASTROVIEJO D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; **18**:1–11.
- REITER RJ, RICHARDSON BA. The pineal and the harderian glands: evidence for mutual interaction. In: Webb SM, Hoffman RA, Puig–Domingo ML, Reiter RJ (Eds.), *Harderian glands. Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects*, Springer, Berlin, pp. 279–295.

- REITER R J, TAN D X, POEGGELER B, MENENDEZ–PELAEZ A, CHEN LD, SAARELA S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age–related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **719**:1–12.
- REPPERT SM, GODSON C, MAHLE CD, WEAVER DR, SLAUGENHAUPT SA, GUSELLA JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:8734–8738.
- REPPERT SM, WEAVER DR, EBISAWA T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; **13**:1177–1185.
- RIBELAYGA C, GAUER F, PÈVET P, SIMONNEAUX V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole–O–methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 1999; **140**:1375–1384.
- RIBELAYGA C, PÈVET P, SIMONNEAUX V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole–O–methyltransferase in rat pineal gland. *Brain Res* 1997; **777**:247–250.
- RIBELAYGA C, PÈVET P, SIMONNEAUX V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; **278**:R1339–R1345.
- RIBELAYGA C, WANG Y, MANGEL SC. A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. *J Physiol* 2004; **554**:467–482.
- RIDGWAY SH. The central nervous system of the bottlenose dolphin. In: Leatherwood S, Reeves R (Eds.), *The bottlenose dolphin*, Academic Press, New York, 1990; pp. 69–97.
- RIES FA, LANGWORTHY OR. A study of the surface structure of the brain of the whale (*Balaenoptera physalus* and *Physeter catodon*). *J Comp Neurol* 1937; **68**:1–47.
- RINGVALL M, RÖNNBERG E, WERNERSSON S, DUELLI A, HENNINGSSON F, ABRINK M, GARCÍA–FAROLDI G, FAJARDO I, PEJLER G. Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**:1020–1026.
- ROBECK TR, STEINMAN KJ, YOSHIOKA M, JENSEN E, O'BRIEN JK, KATSUMATA E, GILI C, MCBAIN JF, SWEENEY J, MONFORT SL. Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen–thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction* 2005; **129**:659–674.
- RODRIGUES MM, HACKETT J, GASKINS R, WIGGERT B, LEE L, REDMOND M, CHADERF GJ. Interphotoreceptor Retinoid–Binding Protein in Retinol Rod Cells and Pineal Gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; **27**:844–850.
- RODRIGUEZ IR, MAZURUK K, SCHOEN TJ, CHADER GJ. Structural analysis of the human hydroxyindole–O–methyltransferase gene. Presence of two distinct promoters. *J Biol Chem* 1994; **269**:31969–31977.

RODRIGUEZ M, PETITCLERC D, BURCHARD JF, NGUYEN DH, BLOCK E. Blood melatonin and prolactin concentrations in dairy cows exposed to 60 Hz electric and magnetic fields during 8 h photoperiods. *Bioelectromagnetics* 2004; **25**:508–515.

ROLLAG MD, NISWENDER GD. Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. *Endocrinology* 1976, **98**:482–489.

ROMMEL SA, COSTIDIS AM, FERNANDEZ A, JEPSON PD, PABST DA, MCLELLAN WA, HOUSER DS, CRANFORD TW, vanHELDEN AL, ALLEN DM, BARROS NB. Elements of beaked whale anatomy and diving physiology, and some hypothetical causes of sonar-related stranding. *J Cetacean Res Manage* 2006; **7**:189–209.

ROSEBOOM PH, COON SL, BALER R, MCCUNE SK, WELLER JL, KLEIN DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996; **137**:3033–3045.

ROTH JJ, GERN WA, ROTH EC, RALPH CL, JACOBSON E. Nonpineal melatonin in the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Science* 1980; **210**:548–550.

ROZEN S, SKALETSKY HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds.), *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology* 2000. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386. Source code available at <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>.

SÁENZ DA, GOLDIN AP, MINCES L, CHIANELLI M, SARMIENTO MI, ROSENSTEIN RE. Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina. *FASEB J* 2004; **18**:1912–1913.

SAKAI T. The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Arch Histol Jpn* 1981; **44**:299–333.

SAKAI Y, HIRA Y, MATSUSHIMA S. Central GABAergic innervation of the mammalian pineal gland: a light and electron microscopic immunocytochemical investigation in rodent and nonrodent species. *J Comp Neurol* 2001; **430**:72–84.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ FJ, IIGO M, MADRID JA, ZAMORA S, TABATA M. Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J Comp Physiol B* 1997; **6**:409–415.

SATO T, DEGUCHI T, ICHIKAWA T, FUJIEDA H, WAKE K. Localization of hydroxyindole O-methyltransferase-synthesizing cells in bovine epithalamus: immunocytochemistry and *in-situ* hybridization. *Cell Tissue Res* 1991; **263**:413–418.

SATO T, KANEKO M, FUJIEDA H, DEGUCHI T, WAKE K. Analysis of the heterogeneity within bovine pineal gland by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Cell Tissue Res* 1994; **277**:201–209.

SAWYER-STEFFAN JE, KIRBY VL, GILMARTIN WG. Progesterone and estrogens in the pregnant and nonpregnant dolphin, *Tursiops truncatus*, and the effects of induced ovulation. *Biol Reprod* 1983; **28**:897–901.

SCHER J, WANKIEWICZ E, BROWN GM, FUJIEDA H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**:889–897.

SCHER J, WANKIEWICZ E, BROWN GM, FUJIEDA H.. All amacrine cells express the MT1 melatonin receptor in human and macaque retina. *Exp Eye Res* 2003; **77**:375–382.

SCHMITZ F, KÖNIGSTORFER A, SÜDHOF TC. RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 2000; **28**:857–872.

SCHOLANDER PF, SCHEVILL WE. Counter–current vascular heat exchange in the fins of whales. *J Appl Physiol* 1955; **8**:279–282.

SCHOMERUS C, MARONDE E, LAEDTKE E, KORF HW. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide (PACAP) induce phosphorylation of the transcription factor CREB in subpopulations of rat pinealocytes: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Cell Tissue Res* 1996, **286**:305–313.

SCHOMERUS C, RUTH P, KORF HW. Photoreceptor–specific proteins in the mammalian pineal organ: immunocytochemical data and functional considerations. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 1994; **54(Suppl)**: 9–17.

SCOTT M, CHIVERS S. Distribution and herd structure of bottlenose dolphins in the eastern tropical Pacific Ocean. In: Leatherwood S, Reeves RR (Eds.), *The bottlenose dolphin*, Academic Press, San Diego, 1990, pp. 387–402.

SEKIGUCHI Y, KOHSHIMA S. Resting behaviors of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Physiol Behav* 2003; **79**:643–653.

SHIBATA S, CASSONE VM, MOORE RY. Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 1989; **97**:140–144.

SHIMAMURA M, YASUE H, OHSHIMA K, ABE H, KATO H, KISHIRO T, GOTO M, MUNECHEKA I, OKADA N. Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even–toed ungulates. *Nature* 1997, **38**:666–670.

SHINOZAKI A, HOSAKA Y, IMAGAWA T, UEHARA M. Topography of ganglion cells and photoreceptors in the sheep retina. *J Comp Neurol* 2010; **518**:2305–2315.

SHIOTANI Y, YAMANO M, SHIOSAKA S, EMSON PC, HILLYARD CJ, GIRGIS S, MACINTYRE I. Distribution and origins of substance P (SP)–, calcitonin gene–related peptide (CGRP)–, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)– and neuropeptide Y (NPY)–containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* 1986; **70**:187–192.

SHOSHANI J, KUPSKY WJ, MARCHANT GH. Elephant brain. Part I: gross morphology, functions, comparative anatomy, and evolution. *Brain Res Bull* 2006; **70**:124–57.

SIMONNEAUX V, RIBELAYGA C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; **55**:325–395.

SINCLAIR JG. The olfactory complex of dolphin embryos. *Texas Rep Biol Med* 1966; **24**:426–431.

SITARAM BR, LEES GJ. Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat. *J Neurochem* 1978; **31**:1021–1026.

SJÖBLOM M, FLEMSTRÖM G. Central nervous alpha1-adrenoceptor stimulation induces duodenal luminal release of melatonin. *J Pineal Res* 2004; **36**:103–108.

SKENE DJ, PAPAGIANNIDOU E, HASHEMI E, SNELLING J, LEWIS DF, FERNANDEZ M, IOANNIDES C. Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *J Pineal Res* 2001; **31**:333–342.

SLOMINSKI A, BAKER J, ROSANO TG, GUISTI LW, ERMAK G, GRANDE M, GAUDET SJ. Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem* 1996; **271**:12281–12286.

SLOMINSKI A, PISARCHIK A, SEMAK I, SWEATMAN T, WORTSMAN J. Characterization of the serotonergic system in the C57BL/6 mouse skin. *Eur J Biochem* 2003; **270**:3335–3344.

SLOMINSKI A, PISARCHIK A, SEMAK I, SWEATMAN T, WORTSMAN J, SZCZESNIEWSKI A, SLUGOCKI G, MCNULTY J, KAUSER S, TOBIN DJ, JING C, JOHANSSON O. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 2002; **16**:896–898.

SNYDER SH, AXELROD J, ZWEIG M. Circadian rhythm in the serotonin content of the rat pineal gland: regulating factors. *J Pharmacol Exp Ther* 1967; **158**:206–213.

SOLDEVILLA MS, MCKENNA MF, WIGGINS SM, SHADWICK RE, CRANFORD TW, HILDEBRAND JA. Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) head tissues: physical properties and CT imaging. *J Exp Biol* 2005; **208**:2319–2332.

SPIKE R, PAYNE AP, MOORE M. Porphyrins and their possible significance in Harderian glands. In: Webb S, Hoffman RA, Puig-Domingo M, Reiter R (Eds.), *Harderian glands*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992, pp. 165–193.

STEFULJ J, HÖRTNER M, GHOSH M, SCHAUENSTEIN K, RINNER I, WÖLFLE A, SEMMLER J, LIEBMANN PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; **30**:243–247.

STETSON MH, RAY SL, CREYAUFMILLER N, HORTON TH. Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters. II. The nature of the maternal signal, time of signal transfer, and the effect of the maternal signal on peripubertal reproductive development in the absence of photoperiodic input. *Biol Reprod* 1989; **40**:458–465.

STEVENS CF, TSUJIMOTO T. Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:846–849.

STIEGLITZ A, STEINLECHNER S, RUF T, HELDMAIER G. Cold prevents the light induced inactivation of pineal N-acetyltransferase in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. J Comp Physiol A 1991, **168**:599–603.

STUDNICKA FK. Die Parietalorgane. In: Fischer (Ed.), Opperl, Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie, Jena, 1905.

SUN X, DENG J, LIU T, BORJIGIN J. Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2002; **99**:4686–4691.

SUNAYASHIKI-KUSUZAKI K, KIKUCHI T, WAWROUSEK EF, SHINOHARA T. Arrestin and phosducin are expressed in a small number of brain cells. Brain Res Mol Brain Res 1997; **52**:112–120.

SUPIN AY, POPOV VV, MASS AM. The sensory physiology of aquatic mammals. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2001.

SUZUKI M, UCHIDA S, UEDA K, TOBAYAMA T, KATSUMATA E, YOSHIOKA M, AIDA K. Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *Orcinus orca*. Gen Comp Endocrinol 2003; **132**:427–433.

TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, PLUMMER BF, HARDIES LJ, WEINTRAUB ST, VIJAYALAXMI, SHEPHERD AM. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. Biochem Biophys Res Commun 1998; **253**:614–620.

TAN D, MANCHESTER LC, REITER RJ, QI W, HANES MA, FARLEY NJ.. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. Life Sci 1999; **65**:2523–2529.

TAN DX, MANCHESTER LC, SAINZ RM, MAYO JC, LEÓN J, REITER RJ. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production: a hypothesis. Endocrine 2005; **27**:149–158.

TAN DX, REITER RJ, MANCHESTER LC, YAN MT, EL-SAWI M, SAINZ RM, MAYO JC, KOHEN R, ALLEGRA M, HARDELAND R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr Top Med Chem 2002; **2**:181–197.

TANAKA S. Satellite radio tracking of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. Nippon Suisan Gakkaishi 1987; **53**:1327–1338.

TANIGUCHI M, MURAKAMI N, NAKAMURA H, NASU T, SHINOHARA S, ETOH T. Melatonin release from pineal cells of diurnal and nocturnal birds. Brain Res 1993; **620**:297–300.

TASTE A, AHLSTROM S, ANDERSSON H, LOVE RJ, PELTONIEMI OAT. Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the european wild boar and domestic gilt. J Pineal Res 2001; **30**:43–49.

THAYER VG, READ AJ, FRIEDLAENDER AS, COLBY DR, HOHN AA, MCLELLAN WA, PABST DA, DEAROLF JL, BOWLES NI, RUSSELL JR, RITTMASER KA. Reproductive

seasonality of western atlantic bottlenose dolphins off North Carolina, USA. *Mar Mamm Sci* 2003; **19**:617–629.

THEODOR JM. Molecular clock divergence estimates and the fossil record of Cetartiodactyla. *J Paleontol* 2004; **78**:39–44.

TOSINI G, DIRDEN JC. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci Lett* 2000; **286**:119–122.

TOSINI G, MENAKER M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996; **272**:419–421.

TURNER W. The Pineal Body (*Epiphysis Cerebri*) in the Brains of the Walrus and Seals. *J Anat Physiol* 1888; **22**:300–303.

UHEN MD. Middle to late Eocene Basilosaurines and Dorudontines. In: Thewissen JGM (Ed.), *The emergence of whales*, Plenum Press, New York, 1998, pp. 29–61.

UHEN MD. Basilosaurids. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2008, pp. 91–94.

UTRECHT WL. On the growth of the baleen plate of the fin whale and the blue whale. *Bijdr Dierk* 1965; **35**:3–38.

UZ T, MANEV H. Chronic fluoxetine administration increases the serotonin N-acetyltransferase messenger RNA content in rat hippocampus. *Biol Psychiatry* 1999; **45**:175–179.

VANECEK J, PAVLIK A, ILLNEROVA H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 1987; **435**:359–362.

VELÁZQUEZ E, ESQUIFINO AI, ZUECO JA, RUIZ ALBUSAC JM, BLÁZQUEZ E.. Evidence that circadian variations of circulating melatonin levels in fetal and suckling rats are dependent on maternal melatonin transfer. *Neuroendocrinology* 1992; **55**:321–326.

VENNEMANN M, KOPPELKAMM A. mRNA profiling in forensic genetics I: possibilities and limitations. *Forensic Sci Int* 2010; **203**:71–75.

VIVIEN–ROELS B. Seasonal variations in the amplitude of the daily pattern of melatonin secretion in mammalian and non–mammalian vertebrates: possible physiological consequences. In: Joy KP, Krishna A, Haldar C (Eds.), *Comparative endocrinology and mammalian reproduction physiology*, Narosa Publishing House, New Delhi, 1999, pp 529–542.

VIVIEN–ROELS B, PÉVET P, DUBOIS MP, ARENDT J, BROWN GM.. Immunohistochemical evidence for the presence of melatonin in the pineal gland, the retina and the Harderian gland. *Cell Tissue Res* 1981; **217**:105–115.

VIVIEN–ROELS B, PÉVET P, MASSON–PÉVET M, CANGUILHEM B. Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5–methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 1992; **86**:239–247.

- VIVIEN-ROELS B, PITROSKY B, ZITOUNI M, MALAN A, CANGUILHEM B, BONN D, PÉVET P. Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 1997; **106**:85–94.
- VLAHAKES GJ, WURTMAN RJ. A Mg⁺⁺-dependent hydroxy-O-methyltransferase in the rat Harderian gland. *Biochem Biophys Acta* 1972; **261**:194–197.
- VOLLRATH L. The pineal organ. In: Oksche A, Vollrath L (Eds.), *Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen*, Vol. 6, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, pp. 1–665.
- WAGNER GC, JOHNSTON JD, TOURNIER BB, EBLING FJP, HAZLERIGG DG. Melatonin induces gene-specific effects on rhythmic mRNA expression in the pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* 2007; **25**:485–490.
- WAKAMURA T, TOKURA H. Circadian rhythm of rectal temperature in humans under different ambient temperature cycles. *J Therm Biol* 2002; **27**:439–447.
- WALDHAUSER F, EHRHART B, FORSTER E. Clinical aspects of melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 1993; **49**:671–681.
- WALLER GH, HARRISON RJ. The significance of the eyelid glands in delphinids. *Aquat. Mamm* 1978; **6**:1–9.
- WALSH MT, BEUSSE D, BOSSART GD, YOUNG WG, ODELL DK, PATTON GW. Ray encounters as a mortality factor in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mar Mamm Sci* 1988; **4**:154–162.
- WANG JY, CHOU LS, WHITE BN. Differences in the external morphology of two sympatric species of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in the waters of China. *J Mammal* 2000; **81**:1157–1165.
- WATANABE M. An autoradiographic, biochemical, and morphological study of the harderian gland of the mouse. *J Morphol* 1980; **163**:349–365.
- WEINRICH MT. Callosities. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (Eds.), *Encyclopedia of marine mammals*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2008, pp. 176–178.
- WEISSBACH H, REDFIELD BG, AXELROD J. Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetyl-serotonin. *Biochem Biophys Acta* 1960; **43**:352–353.
- WELLS RS, BONESS DJ, RATHBUN GB, BEHAVIOR. In: Reynolds JE, Rommel SA (Eds.), *Biology of marine mammals*, Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 1999b, pp. 324 – 422.
- WELLS RS, RHINEHART HL, CUNNINGHAM P, WHALEY J, BARAN M, KOBERNA C, COSTA DP. Long-distance offshore movements of bottlenose dolphins. *Mar Mamm Sci* 1999; **15**:1098–1114.

- WELLS RS, SCOTT MD. Bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). In: Ridgway SH, Harrison R (Eds.), Handbook of marine mammals, Vol.6, The second book of dolphins and porpoises, Academic Press, San Diego, CA, 1999, pp. 137–182.
- WELLS RS, SCOTT MD. Common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. In: Perrin WF, Wursig B, Thewissen JGM (Eds.), Encyclopedia of marine mammals, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2008, pp. 249–255.
- WELSH MG, BEITZ AJ. Modes of protein and peptide uptake in the pineal gland of the Mongolian gerbil: an ultrastructural study. *Am J Anat* 1981; **162**:343–355.
- WETTERBERG L, MARVER HS, SWANSON AL. Delta-aminolaevulinic acid synthetase in the Harderian gland. *S Afr Med J* 1971; **25**:189–194.
- WHITE BH, SEKURA RD, ROLLAG MD. Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J Comp Physiol B* 1987; **157**:153–159.
- WIECHMANN AF. Localization of hydroxyindole-O-methyltransferase in the retina: a re-evaluation. *Exp Eye Res* 1993; **57**:379–380.
- WIECHMANN AF, BOK D, HORWITZ J. Localization of hydroxyindole-O-methyltransferase in the mammalian pineal gland and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; **26**:253–265.
- WIECHMANN AF, HAMMARBACK JA. Expression of recoverin mRNA in the human retina: localization by in situ hybridization. *Exp Eye Res* 1993; **57**:763–769.
- WIECHMANN AF, HOLLYFIELD JG. Localization of hydroxyindole-O-methyltransferase-like immunoreactivity in photoreceptors and cone bipolar cells in the human retina: a light and electron microscope study. *J Comp Neurol* 1987; **258**:253–266.
- WIECHMANN AF, HOLLYFIELD JG. HIOMT-like immunoreactivity in the vertebrate retina: A species comparison. *Exp Eye Res* 1989; **49**:1079–1095.
- WIECHMANN AF, O'STEEN WK. Hydroxyindole-O-methyltransferase in rat retinal bipolar cells: persistence following photoreceptor destruction. *Brain Res* 1990; **506**:14–18.
- WIKELSKI M, TARLOW EM, EISING CM, GROOTHUIS TGG, GWINNER E. Do night-active birds lack daily melatonin rhythms? A case study comparing a diurnal and a nocturnal-foraging gull species. *J Ornithol* 2006; **147**:107–111.
- WILLIAMS EM. Synopsis of the earliest cetaceans: Pakicetidae, Ambulocetidae, Remingtonocetidae, and Protocetidae. In: Thewissen JGM (Ed.), The emergence of whales, evolutionary patterns in the origin of Cetacea, Plenum Press, New York, 1998, pp. 1–28.
- WOOD FG, CALDWELL DK, CALDWELL MC. Behavioral interactions between porpoises and sharks. *Invest Cetacea* 1970; **2**:264–277.
- WU Z, MITTAL S, KISH K, YU Y, HU J, HAACKE EM.. Identification of calcification with MRI using susceptibility-weighted imaging: a case study. *J Magn Reson Imaging* 2009; **29**:177–182.

- YAGA K, REITER RJ, RICHARDSON BA. Tryptophan loading increases daytime serum melatonin levels in intact and pinealectomized rats. *Life Sci* 1993; **52**:1231–1238.
- YANG T, WANG J, QU L, ZHONG P, YUAN Y. Preparation and identification of anti-melatonin monoclonal antibodies. *J Pineal Res* 2006; **40**:350–354.
- YOKOYAMA Y, KANO K, KAJI K, SEYAMA Y. Purification and characterization of a growth factor from guinea pig harderian gland. *J Biol Chem* 1989; **264**:17058–17063.
- YOUNG RW, BOK D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 1969; **42**:392–403.
- YU HS, PANG SF, TANG PL. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *J Endocrinol* 1981; **91**:477–481.
- YUEN. An assessment of reproductive development of the male Indo-Pacific bottlenose dolphin, *Tursiops aduncus*, in captivity, Ph.D. Thesis. Hong Kong Polytechnic University, 2007.
- ZACHMANN A, KNIJFF SCM, ALI MA, ANCTIL M. Effects of photoperiod and different intensities of light exposure on melatonin levels in the blood, pineal organ, and retina of the brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Can J Zool* 1992; **70**: 25–29.
- ZEITZER JM, DANIELS JE, DUFFY JF, KLERMAN EB, SHANAHAN TL, DIJK DJ, CZEISLER CA.. Do plasma melatonin concentrations decline with age? *Am J Med* 1999; **107**:432–436.
- ZHANG E, MIKKELSEN JD, MØLLER M. Tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res* 1991; **265**:63–71.
- ZITOUNI M, MASSON-PÉVET M, GAUER F, PÉVET P. Influence of maternal melatonin on melatonin receptors in rat offspring. *J Neural Transm* 1995; **100**:111–122.
- ZMIJEWSKI MA, SWEATMAN TW, SLOMINSKI AT. The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol* 2009; **307**:211–216