

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata

XXVII CICLO

**Il sistema nervoso di *Octopus vulgaris* come
modello di studio della neurogenesi adulta**

TUTOR

Ch.ma Prof.ssa Anna Di Cosmo

DOTTORANDA

Carla Bertapelle

INDICE

1. Introduzione	
1.1 I cefalopodi.....	4-9
1.2 Il sistema nervoso di <i>Octopus vulgaris</i>	1-15
1.2.1 Le capacità cognitive di <i>Octopus vulgaris</i>	15-18
1.3 “Animal care”	19-20
1.4 La neurogenesi adulta.....	21-24
1.5 La neurogenesi adulta nei vertebrati.....	25
1.5.1 Pesci.....	25-26
1.5.2 Anfibi.....	26
1.5.3 Rettili.....	27
1.5.4 Uccelli.....	27-28
1.5.5 Mammiferi.....	28-31
1.6 La neurogenesi adulta negli invertebrati.....	31
1.6.1 Insetti, ecdisozi.....	31-32
1.6.2 Crostacei, ecdisozi.....	32-35
2. Scopo del lavoro.....	36
2.1 Razionale del progetto.....	37-38
3. Materiali e metodi.....	39
3.1 Animali.....	40-42
3.2 Saggi di proliferazione.....	43
3.2.1 Bromodeossiridina (BrdU).....	43
3.2.2 Antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA).....	43-44
3.3 Clonaggio Oct-elav1.....	45
3.3.1 Estrazione RNA totale.....	45
3.3.2 Sintesi del cDNA e amplificazione per PCR.....	45-46
3.3.3 Isolamento prodotto di PCR.....	46
3.3.4 Ligasi.....	47
3.3.5 Estrazione DNA plasmidico.....	47
3.3.6 Sequenziamento.....	47
3.3.7 Allineamenti.....	47
3.4 Esperimenti comportamentali.....	48
3.4.1 Acclimatazione.....	48
3.4.2 Esperimenti di comportamento.....	48-49
3.5 Analisi molecolari.....	50
3.5.1 Western blotting.....	50
3.5.2 Estrazione RNA totale.....	51
3.5.3 Sintesi del cDNA e amplificazione per PCR.....	51
3.5.4 Real time PCR.....	51

4. Risultati.....	52
4.1 Saggi di proliferazione.....	53-56
4.2 Oct-elav1.....	57
4.2.1 Isolamento di Oct-elav1.....	57
4.2.2 Allineamenti.....	57-58
4.3 Esperimenti comportamentali.....	59-60
4.3.1 Analisi dei comportamenti.....	60-62
4.3.2 “Problem solving”	63
4.4 Analisi molecolari.....	64
4.4.1 PCR semiquantitativa.....	64-65
4.4.2 Real time PCR.....	65-66
4.4.3 Western blotting.....	66-68
5. Discussione.....	69-75
6. Bibliografia.....	76-86

INTRODUZIONE

1. Introduzione

1.1 I cefalopodi

I cefalopodi (seppie, calamari, polpi e nautili) costituiscono la classe più piccola e più complessa del *phylum* dei molluschi (Hanlon e Messenger, 1996).

Essi includono animali esclusivamente marini che popolano tutti i mari del mondo (ad eccezione del Mar Nero) dalla superficie fino alle profondità, occupando un'ampia varietà di nicchie ecologiche e di habitat, dai substrati rocciosi ai fondali sabbiosi, fino ai reef corallini.

I cefalopodi si sono evoluti a partire dal Cambriano, diventando predatori dominanti e assumendo un importante ruolo nella catena trofica dell'ecosistema marino (Jereb e Roper, 2010, Pierce et al., 2008).

I coleoidi, seppie, calamari e polpi, hanno internalizzato o perso la conchiglia esterna tipica di altre classi di molluschi, hanno trasformato il mantello in un potente organo per la locomozione, il piede si è evoluto in strutture prensili quali braccia e tentacoli, il sistema circolatorio da aperto è diventato chiuso per sostenere il fabbisogno energetico di una vita da predatore (Wells, 1978). Un'importante divergenza rispetto al *phylum* di appartenenza è la perdita della fase larvale: tipicamente, i molluschi, presentano una larva, detta trofocora, già evidenziabile nelle uova, che attraverserà diversi stadi fino alla metamorfosi, mentre i coleoidi hanno uno sviluppo diretto, in cui, dopo la schiusa, la forma giovanile, detta paralarva, senza attraversare metamorfosi ha già tutte le caratteristiche dell'adulto (Buresi et al., 2013).

La paralarva ha uno stile di vita nectonico: vive nelle colonne d'acqua dove vi è un'alta concentrazione di placton, del quale si nutre fino alla transizione verso lo stadio adulto, che, in *Octopus vulgaris*, ad esempio, coincide con lo spostamento verso un habitat bentonico (Villanueva e Norman, 2008). In seguito alla transizione da paralarva ad adulto, l'animale diventa un eccezionale predatore territoriale e solitario che predilige granchi, bivalvi e gasteropodi (Fiorito e Gherardi, 1999), dei quali riesce a penetrare l'esoscheletro o la conchiglia esterna tramite un becco corneo di cui è provvisto. In seguito, le prede vengono immobilizzate iniettando una cefalotossina prodotta dalle ghiandole salivari e poi digerite.

I cefalopodi sono animali dioici e si riproducono sessualmente. Essi presentano una gonade impari, localizzata nella parte posteriore del mantello, e un organo copulatorio. In *Octopus vulgaris* esso è identificabile in un braccio modificato, detto ectocotile, con il quale l'animale inserisce le spermatofore nella cavità palleale della femmina, adottando un tipo di fecondazione interna. Quando la femmina è matura sessualmente, gli ovociti secernono un peptide, detto Octo-SAP (De Lisa et al., 2013), che attira gli spermatozoi per chemiotassi.

In seguito alla deposizione delle uova, che avviene in anfratti rocciosi riparati, la femmina esibisce una serie di cure parentali che consistono nella continua ventilazione delle uova, allo scopo di garantire una corretta ossigenazione. Essa non lascia mai il sito di deposizione, rinunciando a nutrirsi, fino a morire di consunzione (Robison et al., 2014).

La novità più straordinaria che presentano i cefalopodi è l'elevato grado di centralizzazione del cervello, la quale si ripresenta, in seguito ad

un'evoluzione indipendente nel regno animale, in altri quattro *taxa*, quali cordati, artropodi, nematodi ed anellidi (Moroz, 2009). Nell'ambito dei molluschi vi è una spiccata eterogeneità nell'organizzazione del sistema nervoso. In gruppi quali aplacofori, monoplacofori e poliplacofori, è evidenziabile la conservazione dell'organizzazione più ancestrale, la tetraneuria, in cui non sono presenti gangli ben definiti, né tanto meno una massa cerebrale compatta: il sistema nervoso consta di due strutture principali: un "loop" viscerale ed uno cerebro-buccale. Nell'ambito dei gasteropodi osserviamo un primo grado di centralizzazione, in cui vi è la presenza di quattro gangli più o meno fusi tra loro a formare una massa cerebrale. Infine, nei cefalopodi, l'organizzazione mostra un sistema nervoso periesofageo complesso e altamente centralizzato (Moroz, 2009) alla base delle straordinarie capacità di apprendimento, memoria, e attuazione di sofisticate strategie di predazione, difesa e riproduzione (De Lisa et al., 2012, 2013, Hanlon e Messenger, 1996), oltre che supporto dell'abilità ad utilizzare strumenti presenti in natura (Frank et al., 2012) ed adattare il comportamento in base alle differenti circostanze (Norman et al., 2003).

Una delle più affascinanti capacità dei cefalopodi è l'abilità nel "camouflage", attuata cambiando rapidamente il colore e il pattern della pelle, grazie alla presenza di organi di cellule quali cromatofori, iridofori e leucofiori organizzati in vari strati (Buresch et al., 2011, Grasso e Basil, 2009, Messenger, 2001).

Il cromatoforo, localizzato immediatamente al di sotto della pelle, è una struttura a sacco contenente pigmenti neri, marroni, rossi, arancioni e gialli, circondata da fibre muscolari, che, contraendosi, espandono o

restringono la porzione di pigmento visibile. Ogni cromatoforo è controllato direttamente dal sistema nervoso, in quanto localizzato in prossimità di una terminazione nervosa, in questo modo, l'animale può variare la quantità di pigmento visibile in ogni singola struttura, al fine di produrre pattern corporei. Gli iridofori sono collocati nello strato immediatamente al di sotto dei cromatofori. Essi sono responsabili dei colori metallici e sono sotto controllo ormonale. I leuofori sono responsabili degli spots bianchi, dati dalla capacità di diffondere e riflettere la lunghezza d'onda predominante della luce che li colpisce (Hanlon e Messenger, 1996).

Le strutture sensoriali rappresentano un'ulteriore novità evolutiva. L'occhio di *Octopus vulgaris* presenta gli stessi componenti dell'occhio dei vertebrati, quali cornea, iride, lenti e retina emisferica. L'accomodamento visivo è attuato allontanando o avvicinando il cristallino dalla retina e permette una notevole raffinatezza visiva (Wells, 1978), il polpo è infatti in grado di vedere a diverse intensità di luce e di mettere a fuoco a lunghe e brevi distanze, ma non è in grado di riconoscere i colori (Messenger, 1973, 2001).

I cefalopodi presentano un sistema di rilevamento delle vibrazioni e della loro posizione nello spazio, localizzati nella statocisti (Wells, 1978), e un sofisticato sistema di ricezione degli stimoli sensoriali: i recettori chemio-tattili, collocati sulla pelle, sulle ventose e nei muscoli (Wells, 1978), permettono il cosiddetto "taste by touch" (Hanlon e Messenger, 1996) messo in atto dalle braccia, usate come "biosensori naturali" (Di Cosmo e Polese, 2014).

L'organo olfattorio, un organo pari identificabile in una fossetta collocata sul lato ventrale del mantello, al limite della plica (Piper e Lucero, 1999,

Villanueva e Norman, 2008, Polese et al., 2014), presenta un epitelio olfattorio è organizzato in una struttura globulare la cui superficie consta di neuroni olfattori e cellule di sostegno, mentre in profondità si evidenziano cellule ad anello che conferiscono turgore all'intera struttura (Di Cosmo e Polese, 2014, Polese et al., 2014). L'organo olfattorio gioca un ruolo fondamentale nel controllo tra riproduzione e "food-intake": con il controllo peptidergico del lobo olfattorio, infatti, esso è reso più o meno sensibile agli odori (intesi come molecole disciolte nell'acqua) legati al cibo e alla riproduzione (Polese et al., 2014).

1.2 Il sistema nervoso di *Octopus vulgaris*

Octopus presenta il sistema nervoso più voluminoso tra gli invertebrati, la cui complessità, frutto della spinta evolutiva data dalla competizione con i vertebrati, con cui ha condiviso l'habitat a partire dal Mesozoico, è comparabile a quella di rettili e pesci (Packard, 1972, Wells, 1978, Di Cosmo e Polese, 2014).

Il sistema nervoso di *Octopus vulgaris*, collocato tra gli occhi dell'animale, protetto da una capsula cartilaginea, ricalca la più ancestrale organizzazione del sistema nervoso dei molluschi, la tetranuria (Moroz, 2009, Shigeno e Ragsdale, 2015). Si osservano infatti due paia di cordoni nervosi longitudinali, i pedali e i pallioviscerali, compattati a formare due terzi della massa sottoesofagea posteriore, e una commessura cerebrale, che consiste nella massa sopraesofagea e in un paio di lobi ottici (Young, 1971). La parte anteriore della massa sottoesofagea è formata da otto cordoni nervosi (lobi brachiali) che si estendono direttamente nelle braccia, infine, ai lati dell'esofago, sono localizzati i lobi periesofagei, che connettono la massa sopraesofagea e la massa sottoesofagea.

Il sistema nervoso, con cellule disposte corticalmente e neuropili collocati internamente (Young, 1971, Hochner et al., 2006), come è tipico degli invertebrati, consta di lobi e sistemi di lobi caratterizzati da un'organizzazione funzionale di tipo gerarchico.

La massa sottoesofagea è costituita dai lobi pallioviscerali, pedali e brachiali, mentre la massa sopraesofagea dai lobi buccali, frontali, verticali e basali.

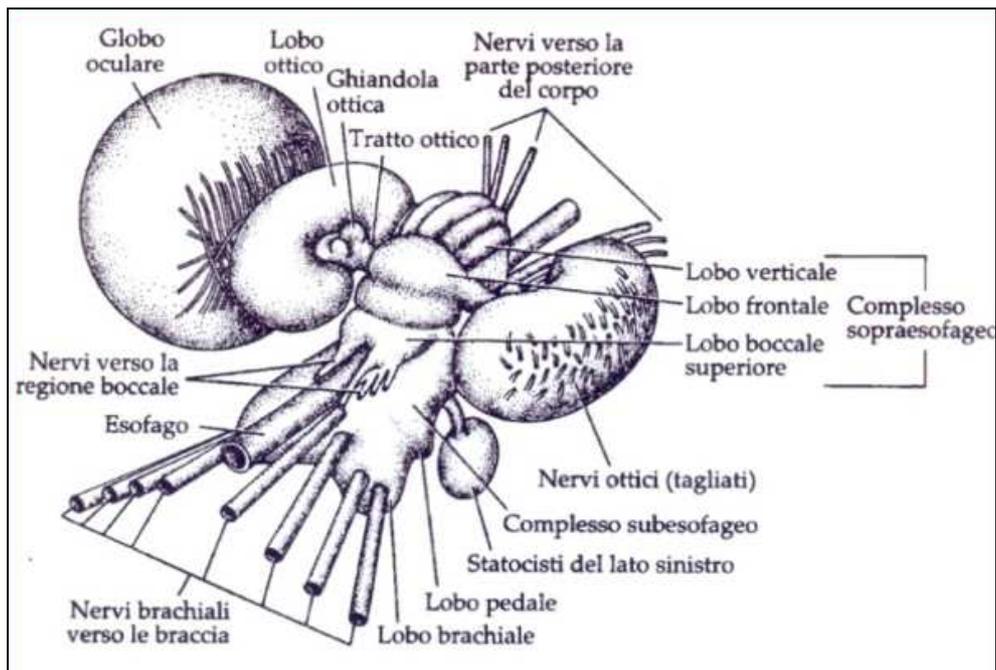


Figura 1. Il sistema nervoso di *Octopus vulgaris*.

Esperimenti di stimolazione elettrica condotti sul sistema nervoso del polpo (Wells, 1978, Zullo et al., 2009) hanno permesso di distinguere tre categorie di centri motori: inferiori, in cui le stimolazioni elettriche suscitano risposte quali contrazione di isolati gruppi di muscoli o espansione di un gruppo limitato di cromatofori, intermedi, in cui la stimolazione produce contrazioni estese delle braccia o del mantello, e superiori, le cui stimolazioni elettriche inducono movimenti coordinati della respirazione o del nuoto (Shigeno e Ragsdale, 2015).

I centri motori inferiori, che presentano neuroni motori di grandi dimensioni, i cui prolungamenti innervano direttamente gli effettori e i visceri, e i centri motori intermedi sono localizzati nella massa sottoesofagea, quelli superiori nella massa sopraesofagea, in particolare nei lobi basali. Essi ricevono informazioni dalle aree di integrazione degli stimoli e controllano direttamente i centri motori inferiori, che tradurranno in movimenti le risposte elaborate (Young, 1971, Hochner et al., 2006).

Della massa sopraesofagea fanno parte i centri coinvolti nella memoria, nell'apprendimento e in tutte le funzioni cognitive (Young, 1963; Wells, 1978; Hochner e Shomrat, 2013), identificabili nel sistema frontale inferiore e nel sistema frontale-verticale, caratterizzati da un'elevata plasticità sinaptica alla base dei processi cognitivi.

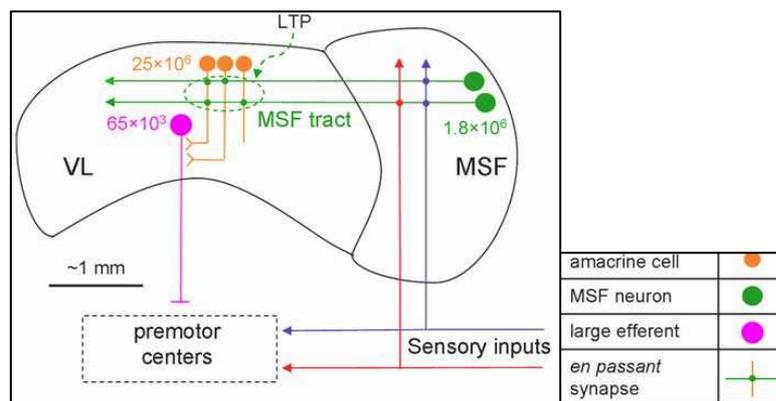


Figura 2. Il sistema frontale verticale di *Octopus vulgaris*. VL. – lobo verticale; MSF.-frontale mediano superiore. Rielaborazione da Hochner, 2010.

Essi presentano una peculiare organizzazione strutturale. Il lobo verticale è composto da due tipi cellulari: gli interneuroni amacrine (i neuroni più piccoli del sistema nervoso del polpo) e i neuroni efferenti. I processi cellulari delle amacrine prendono contatto unicamente con i neuroni efferenti, mentre gli assoni di questi ultimi si estendono fino ai lobi basali. Il lobo verticale è strettamente connesso con il lobo frontale superiore mediante sinapsi en-passant, ossia connessioni perpendicolari che hanno luogo lungo l'assone invece che sulla parte terminale, tra gli assoni delle amacrine e quelli dei neuroni del lobo frontale. Anche il sistema frontale inferiore presenta questo tipo di organizzazione, in cui il lobo frontale inferiore e il lobo subfrontale stabiliscono interconnessioni ortogonali (Gray, 1970, Young, 1971, 1991, 1995).

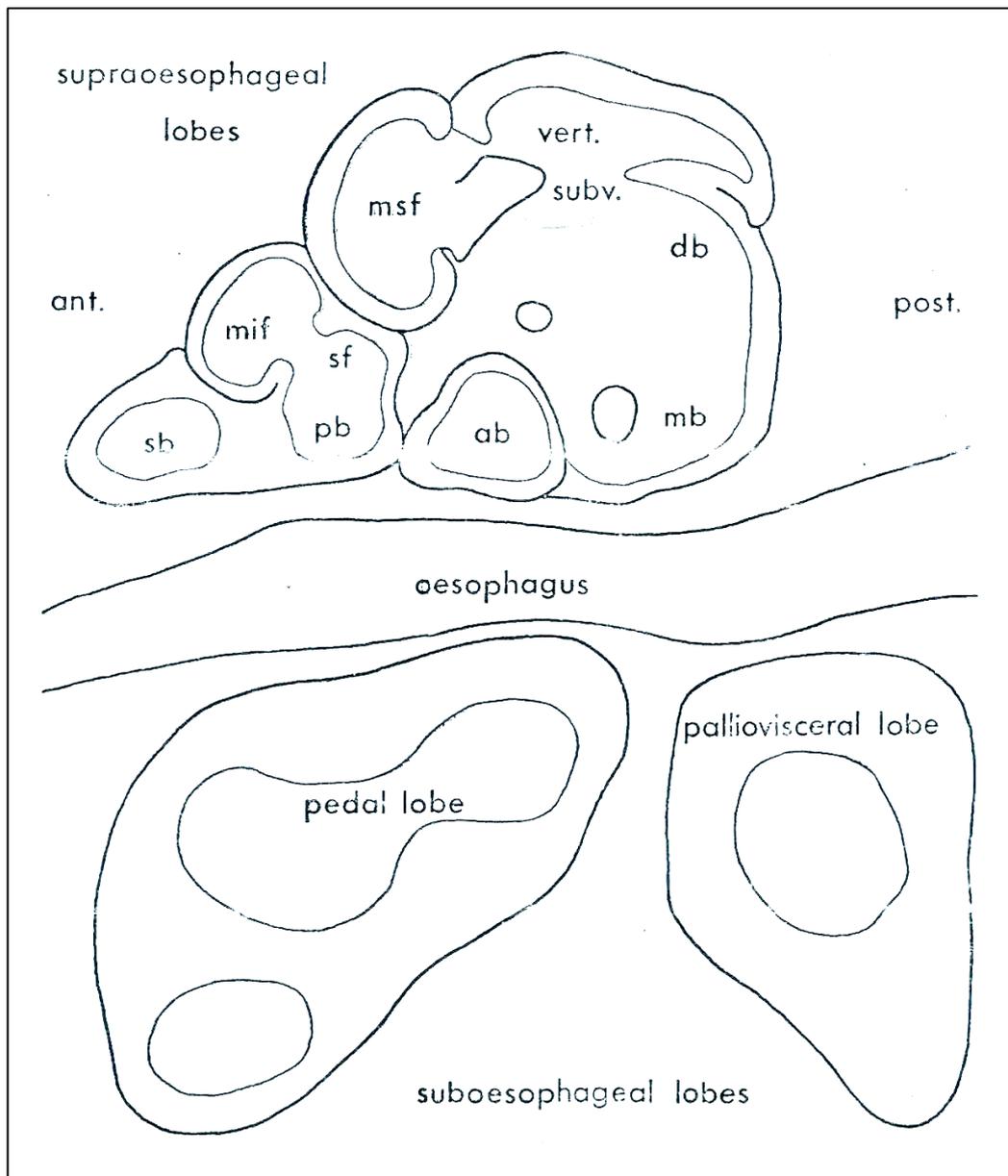


Figura 3. Schema di una sezione sagittale del sistema nervoso di *Octopus vulgaris*. ab. – basali anteriori; db. – basali dorsali; mb. – basali mediani; mif. – frontale inferiore mediano; msf. – frontale superiore mediano; pb. – boccale posteriore; sb. – boccale superiore; sf. – sub frontale, subv. – sub verticale; vert. – vertical. Ant. – anteriore, post. – posteriore.

I lobi ottici, strutture reniformi, collocate tra la parte centrale del cervello, a cui sono collegati tramite i tratti ottici, e gli occhi, presentano uno strato interno detto medulla, e uno strato esterno detto corteccia o retina profonda, che riceve informazioni visive provenienti dal bulbo oculare tramite i nervi ottici (Young, 1971, Wells, 1978).

I lobi ottici rappresentano dei centri complessi di integrazione ed elaborazione di stimoli sensoriali. Essi ricevono le informazioni direttamente dagli organi di senso, che vengono selezionate in modo da elaborare una risposta che sia appropriata all'ambiente, che verrà poi codificata dal sistema nervoso centrale (Young, 1971). Nell'ilo dei lobi ottici sono collocati i lobi olfattori, il lobo peduncolato e la ghiandola ottica. I lobi olfattori, costituiti da tre lobuli ricevono le informazioni olfattive dai nervi che si dipartono dall'organo olfattorio (Di Cosmo e Polese, 2014, Polese et al. 2014). Essi sono coinvolti nel controllo della riproduzione, tramite una complessa attività peptidergica preposta al controllo tra food-intake e riproduzione (Di Cosmo e Polese, 2014, Polese et al., 2014).

Il lobo peduncolato è caratterizzato da una zona basale e una struttura detta spina, un processo di piccole cellule che attraversa longitudinalmente l'intero lobo. Esso invia connessioni ai centri motori, tramite cui controlla la coordinazione dei fini movimenti, ed è per questo considerato comparabile al cervelletto dei vertebrati (Messenger, 1971).

La ghiandola ottica è una struttura endocrina di forma sferica coinvolta nel controllo della riproduzione (Di Cosmo, 1998, De Lisa et al., 2012, Di Cosmo e Polese, 2014, Polese et al., 2014) e della maturazione delle gonadi. L'attività secretoria della ghiandola ottica è finemente controllata da segnali diretti e indiretti provenienti dai centri di integrazione degli stimoli sensoriali (De Lisa et al., 2012, Di Cosmo e Polese, 2013).

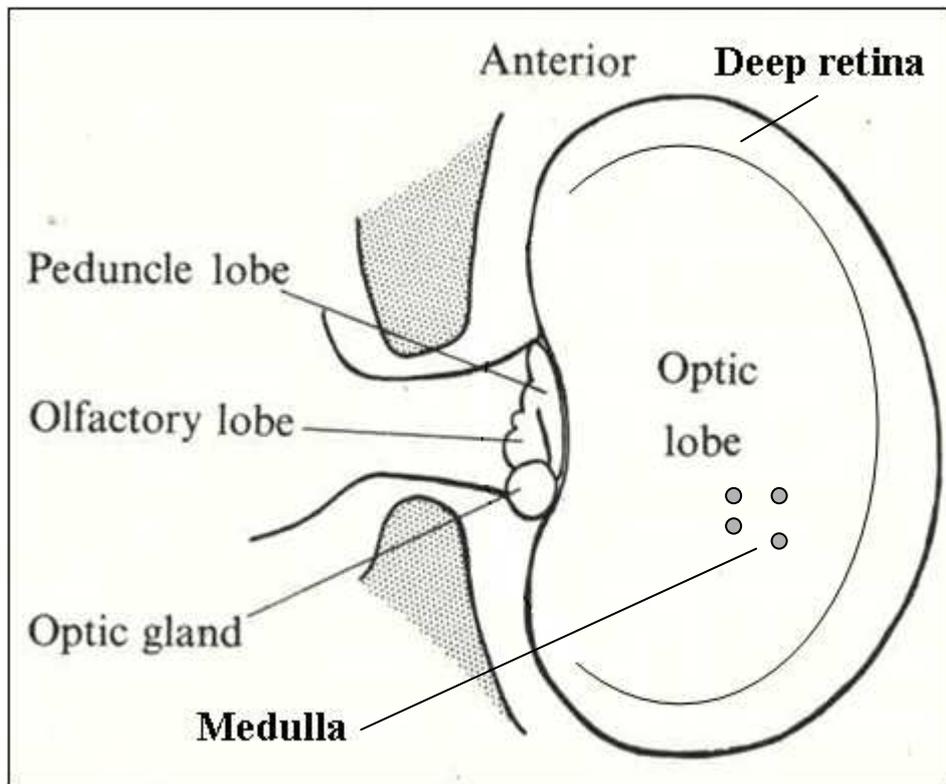


Figura 4. Schema di una sezione orizzontale del lobo ottico destro del sistema nervoso di *Octopus vulgaris*. Rielaborazione da Young, 1971.

Il sistema nervoso di *Octopus* è riccamente vascolarizzato. Il sistema circolatorio che irrorava il sistema nervoso costituisce un'unità isolata dal resto del sistema sanguigno tramite una barriera emato-encefalica (Young, 1971). L'emolinfa arriva al sistema nervoso mediante l'aorta encefalica, la quale si dipana in un complesso sistema di arteriole e capillari che si addentrano nella profondità del neuropilo di ogni lobo, entrando così in intimo contatto con i neuroni e le cellule gliali.

1.2.1 Le capacità cognitive di *Octopus vulgaris*

La complessità strutturale e funzionale del sistema nervoso del polpo, a supporto delle più elevate capacità cognitive riscontrabili tra gli

invertebrati, permette all'animale di attuare comportamenti complessi, quali manifestazione di personalità individuali (Mather, 2008), "problem solving" (Fiorito et al., 1998), capacità di giocare (Kuba et al., 2003, 2006).

Se molte di queste abilità sono note fin da primi anni settanta (Wells, 1978), solo di recente è stata accertata la capacità dell'animale di mostrare un comportamento che riconduca al gioco (Kuba et al., 2003, 2006).

Il gioco, riscontrato in tutti gli animali con sistema nervoso complesso e centralizzato, sia vertebrati che invertebrati (Oliveira et al., 2010), è definito come un comportamento spontaneo, volontario e piacevole, che si discosta da altri comportamenti etotipici, che gli animali mettono in atto quando sono in uno stato di benessere, ben alimentati e in salute (Burghardt, 2005). Esso ha una funzione adattativa negli organismi giovani, i quali sfruttano quest'opportunità per prepararsi e allenarsi ad affrontare le diverse situazioni che affronteranno nel corso della vita (Kuba et al., 2006, Oliveira et al., 2010). Alla presentazione di un oggetto, l'animale reagisce in primo luogo manifestando curiosità: "Cos'è quest'oggetto?", esplorandolo con la bocca e le appendici, dopodiché passa alla fase "Cosa posso fare con quest'oggetto?", che prelude al gioco vero e proprio, definito come un comportamento consapevole.

Nel caso di *O. vulgaris*, sono stati definiti diversi livelli con cui identificare comportamenti tipici del gioco. Alla presentazione di un oggetto che l'animale non ritiene essere cibo o preda, esso reagisce mettendo in atto un'interazione detta di tipo predatorio. Il livello zero descrive infatti un comportamento tipico di quando il polpo è in presenza di cibo: circonda l'oggetto con le braccia e con la membrana interbrachiale, e lo porta in prossimità della zona buccale. Il livello successivo prevede un'interazione esploratoria attuata però solo con la parte distale di una o più braccia. Il

primo tipo di comportamento riconducibile al gioco, che ha ancora caratteristiche esploratorie, si manifesta quando il polpo attua un'azione non ripetuta in cui spinge o tira l'oggetto verso di sé. Il comportamento considerato "play-like" prevede che l'animale ripeta le azioni nel tempo, anche se brevemente, oppure manipoli l'oggetto spostandolo da un braccio all'altro. Si delinea così un passaggio dal comportamento predatorio/esploratorio al gioco vero e proprio (Kuba et al., 2006). La propensione al gioco sembra essere, anche nei polpi, una caratteristica di un animale non stressato, in buone condizioni di salute. Il comportamento, inoltre, non pare essere influenzato dallo stato di fame dell'animale, né dall'età. Il gioco si conferma un "allenamento ad eventi inaspettati" come nei vertebrati.

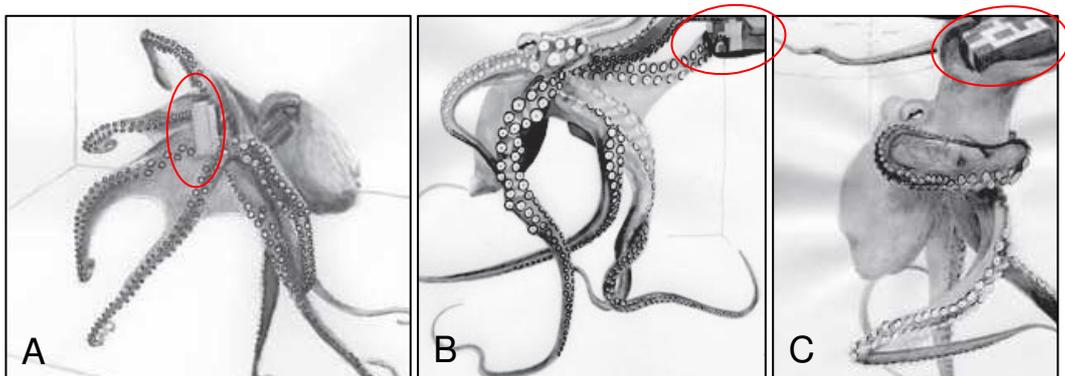


Figura 5. A. comportamento predatorio; B. comportamento esploratorio; C. "play-like". In rosso è evidenziato l'oggetto presentato all'animale. Rielaborazione da Kuba et al., 2006.

Maggiormente conosciute sono le straordinarie abilità del polpo nel "problem solving", evidenziabili in esperimenti in cui all'animale viene presentata una preda per accedere alla quale deve aggirare un ostacolo, come aprire il barattolo o la scatola in cui essa, ben visibile, è contenuta.

Il contenitore viene analizzato dall'animale mediante esplorazione tattile condotta con le braccia e poi aperto e il tempo impiegato per aprire il contenitore diminuisce con l'esperienza: tale parametro è utilizzato per definire l'avvenuto apprendimento (Fiorito et al., 1998).

1.3 “Animal care”

Dal 1° gennaio del 2013, la sperimentazione sui cefalopodi rientra nella Direttiva dell’Unione Europea 2010/63/UE. Considerate le elevate capacità cognitive di questi organismi, infatti, la normativa stabilisce che debbano essere applicati gli stessi criteri utilizzati per la sperimentazione sui vertebrati.

Le linee guida per il “welfare” dei cefalopodi riguardano tutti gli step della sperimentazione (Di Cosmo, EuroCeph 2012):

- trasporto: deve avvenire in condizioni meno stressanti possibile, minimizzando le vibrazioni, alloggiando gli animali in doppi contenitori opachi contenenti acqua di mare a sufficienza per permettere l’ossigenazione;
- stabulazione:
 - a) gli animali devono alloggiare in vasche costituite da materiali inerti quali PVC, con coperchi in plexiglass adeguatamente assicurati per evitare la fuga. Le vasche devono essere adeguate alle dimensioni degli animali, affinché possano nuotare e muoversi secondo le loro posture naturali,
 - b) le vasche devono essere arricchite con sabbia, rocce e strutture che gli animali possano adottare come tana, in modo da simulare l’ambiente naturale,
 - c) gli animali devono essere sottoposti a fotoperiodo naturale, sia con lucernari che con sistemi di illuminazione artificiale,

- d) l'acqua deve essere correttamente ossigenata e deve presentare parametri fisico-chimici uguali a quelli naturali, attrezzando il sistema con filtri regolarmente puliti,
- e) gli animali devono essere adeguatamente alimentati con prede naturali, e la somministrazione del cibo deve avvenire in modo da arrecare meno disturbo possibile,
- f) le aree in cui sono alloggiate le vasche devono essere mantenute ad una temperatura costante di 16°C, e devono essere prive di rumori e vibrazioni che disturbino gli animali;
- esperimenti: devono essere condotti in modo da arrecare meno stress possibile, evitando il più possibile la manipolazione dell'animale. Inoltre è necessario un punto di osservazione che permetta all'operatore di avere un'adeguata visuale dell'esperimento, ma che eviti il contatto visivo con l'animale, utilizzando pannelli che nascondano l'operatore e l'attrezzatura video;
 - anestesia: gli animali devono essere anestetizzati con un anestetico riconosciuto secondo le norme della medicina veterinaria, come l'isoflourano (Polese et al., 2014), evitando miorilassanti come il cloruro di magnesio, che immobilizzano l'animale lasciandolo cosciente;
 - eutanasia: il sacrificio degli animali deve avvenire previa anestesia.

1.4 La neurogenesi adulta

La neurogenesi adulta è il processo di formazione di nuovi neuroni nel cervello di un organismo adulto. E' solo negli ultimi vent'anni che gli studi condotti sul sistema nervoso hanno evidenziato le capacità proliferative di un tessuto considerato tradizionalmente "fisso" ed immutabile. Tale processo è supportato dalla presenza di cellule pluripotenti che permangono in determinate aree del sistema nervoso dopo la fine della neurogenesi embrionale (Cayre et al., 2002). Tali cellule, con caratteristiche staminali, sono localizzate in nicchie di neurogenesi, dei microambienti favorevoli alla proliferazione, strettamente collegate con capillari sanguigni e linfatici. In seguito ad impulsi sia intrinseci che estrinseci, le cellule vanno incontro a numerose divisioni mitotiche e migrano verso le aree del cervello che riforniscono di nuovi neuroni (Lindsey e Tropepe, 2006) .

Il primo studio che evidenziò la presenza di neuroblasti in proliferazione in un cervello adulto, condotto su un roditore (Kaplan e Hinds, 1977), valutò erroneamente il processo neurogenico come un residuo dello sviluppo embrionale privo di importanza, irrilevante dal punto di vista funzionale. Nel corso degli anni, la neurogenesi adulta è stata poi osservata in numerose specie, sia di vertebrati che di invertebrati, che presentano un sistema nervoso complesso e centralizzato. La conservazione di tale processo nel corso dell'evoluzione ha suggerito che fosse molto più che un residuo vestigiale, inoltre, la localizzazione delle aree in proliferazione in zone del sistema nervoso coinvolte in elevate capacità cognitive e integrazione degli stimoli sensoriali, ha supportato l'idea che la neurogenesi adulta fosse indispensabile per garantire e supportare la plasticità cerebrale necessaria

all'organismo per adattarsi all'ambiente dinamico in cui vive (Braun e Jessberger, 2014).

La proliferazione cellulare e il differenziamento delle cellule immature sono finemente regolate da stimoli interni, quali ormoni, neurotrasmettitori, fattori di crescita, e da stimoli esterni, come l'arricchimento dell'ambiente, la stagionalità, il ciclo circadiano, gli stimoli sensoriali (Alvarez-Buylla et al., 2001) .

Gli organismi in cui è stata riscontrata la neurogenesi adulta appartengono a diversi *taxa* di invertebrati, insetti e crostacei, e vertebrati, pesci teleostei, anfibi, rettili, uccelli, mammiferi, compreso l'uomo. Sebbene il processo sia comune in una così vasta scala di metazoi, mostra importanti differenze *inter-taxa* riguardanti in primo luogo il numero di aree neurogeniche, la loro localizzazione, il tasso di proliferazione e il flusso migratorio delle cellule (Grandel e Brand, 2013).

Tra gli invertebrati, il fenomeno mostra molte caratteristiche comuni, quali le aree di proliferazione, che sono generalmente relegate in zone del sistema nervoso che rappresentano importanti step delle vie olfattive e sono coinvolte nell'integrazione degli stimoli sensoriali (Cayre et al., 2002, Schmidt, 2007).

Nei vertebrati, invece, la neurogenesi adulta presenta caratteristiche eterogenee tra le diverse classi, in particolare per quanto riguarda il numero delle aree neurogeniche (Kaslin et al., 2008), che sembra essere il parametro che subisce le più ampie variazioni. Dai pesci teleostei (nei cartilaginei non vi sono ad oggi evidenze di neurogenesi adulta) ai mammiferi, infatti, vi è una rilevante differenza: nei primi, le aree di proliferazione sono molto numerose, e sono distribuite uniformemente lungo l'asse rostro-caudale del cervello, diminuiscono negli anfibi e nei

rettili, si riducono alle aree coinvolte nel canto e nelle migrazioni negli uccelli, e sono infine limitate all'area subgranulare del giro dentato dell'ippocampo e alla zona subventricolare del bulbo olfattivo nei mammiferi e nell'uomo (Vellema et al., 2010).

Il parametro che sembra essere invece più conservato è il lineage cellulare (Alvarez-Buylla et al., 2001, Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009). E' ormai accertato che le cellule nervose staminali nell'adulto presentano caratteristiche morfologiche e funzionali delle cellule gliali, le quali vanno incontro a numerose divisioni che danno origine a nuove staminali e a neuroblasti.

I motivi per i quali si assiste alla riduzione delle aree proliferative e conseguentemente della capacità rigenerativa del tessuto nervoso nella scala evolutiva non sono ancora ben chiariti. Si ipotizza che gli organismi con minori capacità proliferative conservino un ambiente sfavorevole alla proliferazione cellulare allo scopo di mantenere quiescenti alcune regioni del cervello. Tale ipotesi è supportata da esperimenti in cui cellule staminali di aree proliferative trapiantate in zone quiescenti danno origine a nuove generazioni di neuroni. Questo suggerisce che un meccanismo intrinseco sia inattivato in determinate circostanze dipendenti da fattori esterni ed interni alle cellule (Kizil, 2012).

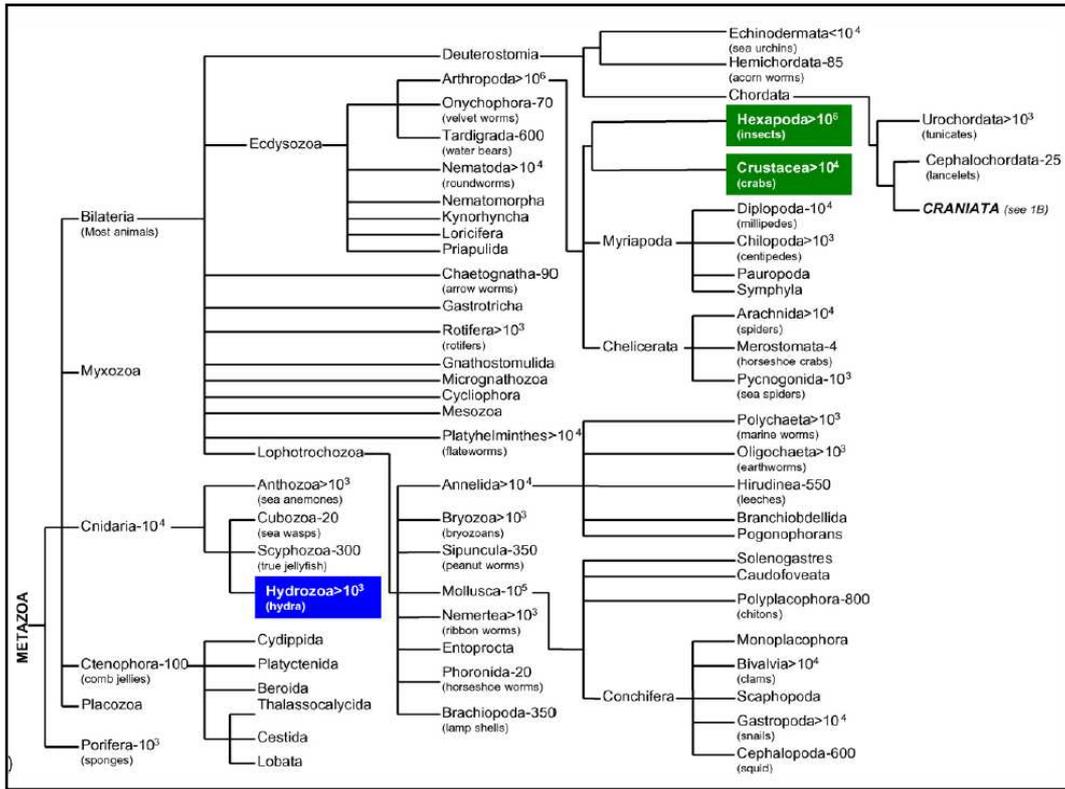


Figura 6. Cladogramma dei metazoi. In blu e in verde i *taxa* in cui è stata riscontrata la neurogenesi adulta. Da Lindsey e Tropepe, 2006.

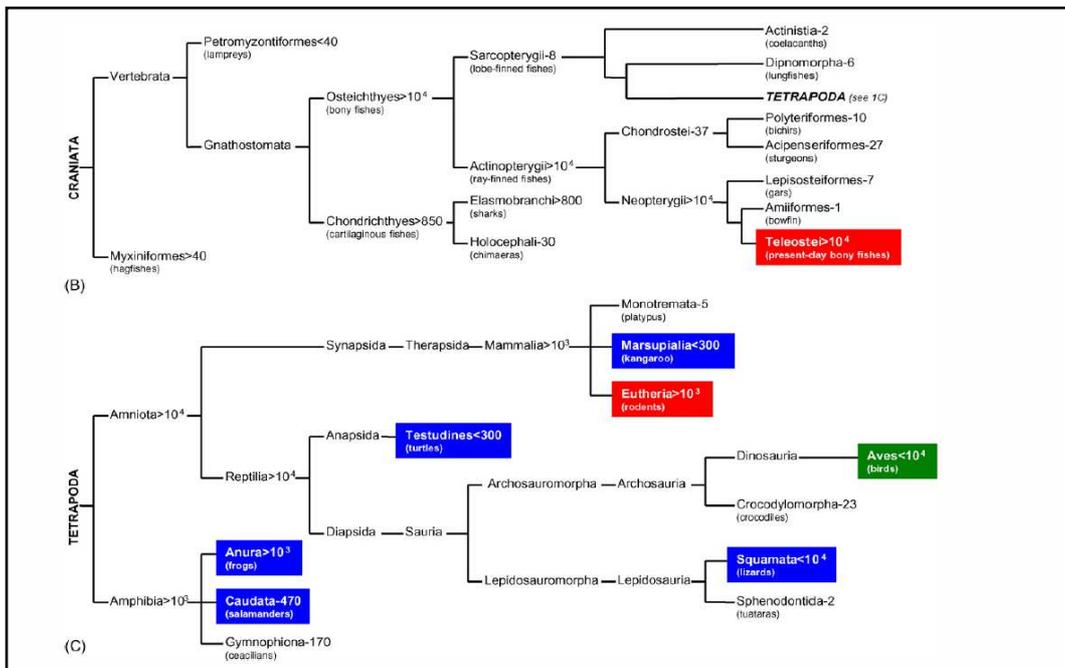


Figura 7. Cladogramma dei vertebrati. In blu, verde e rosso i *taxa* in cui è stata evidenziata la neurogenesi adulta. Da Lindsey e Tropepe, 2006.

1.5 La neurogenesi adulta nei vertebrati

1.5.1 Pesci

Il fenomeno della neurogenesi adulta è stato ampiamente indagato nel sistema nervoso dei pesci teleostei, mentre, ad oggi, non vi sono evidenze del processo nei condroitti .

Nell'ambito dei teleostei, grazie alla disponibilità dell'elevato numero di informazioni date dal genoma del cipriniforme *Danio rerio*, comunemente conosciuto come pesce zebra, è stato possibile caratterizzare la neurogenesi adulta anche dal punto di vista molecolare.

Il cervello dei teleostei presenta il più elevato numero di aree proliferative tra i vertebrati e ha straordinarie capacità rigenerative. Le nicchie di neurogenesi sono diffuse lungo l'intero asse rostro-caudale, e le cellule che si generano migrano in tutti i distretti del sistema nervoso (Grandel et al., 2006).

In particolare, numerose aree proliferative sono localizzate nel bulbo olfattivo, nel telencefalo, nel tetto ottico e nel cervelletto (Grandel et al. 2013). Queste zone mostrano caratteristiche estremamente eterogenee dal punto di vista cellulare e molecolare. Le cellule progenitrici, infatti, si distinguono in base alla presenza o meno di makers tipici della glia radiale (Ganz et al., 2010).

Nel telencefalo, ad esempio, le cellule progenitrici presenti nella zona ventrale hanno caratteristiche di glia radiale (García-Verdugo et al., 2002): esse si distinguono in cellule di tipo I, quiescenti, e cellule di tipo II, con un ciclo cellulare molto lento, che, in seguito a divisioni asimmetriche, possono rigenerarsi e dare origine ai neuroblasti, cellule di tipo III, che continuano a proliferare e differenziarsi (Rothenaigner et al., 2011). Il tasso

di proliferazione e la relativa proporzione tra rigenerazione e produzione di neuroblasti differiscono enormemente nell'ambito delle diverse aree del sistema nervoso, in quanto finemente controllati da segnali *inter* ed *intra* cellulari presenti nel microambiente delle nicchie.

Il sistema nervoso dei teleostei presenta una elevata capacità rigenerativa, ampiamente indagata tramite esperimenti di lesioni inflitte in diverse regioni del cervello. E' stato dimostrato che, in seguito al danno, il tessuto va incontro ad una massiccia proliferazione e le cellule originatesi sono in grado di riparare la lesione, tanto che dopo alcuni mesi non è più riscontrabile (Kizil et al., 2011).

1.5.2 Anfibi

Come nei pesci, anche negli anfibi la neurogenesi adulta è stata riscontrata in numerose aree del sistema nervoso. L'attività proliferativa risulta particolarmente evidente nel bulbo olfattorio, nei ventricoli laterali degli emisferi cerebrali e nell'ipotalamo ventrale, mentre in altre zone, quali il cervelletto, vi sono piccoli gruppi di cellule in mitosi. La diffusione del fenomeno neurogenico a livello di numerosi distretti del sistema nervoso degli anfibi è probabilmente dovuto al continuo accrescimento del cervello, che necessita di un costante incremento del numero di cellule (Font et al., 2001).

Anche nel sistema nervoso dell'anuro *Xenopus laevis*, così come in altri vertebrati (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009), le cellule gliali giocano un ruolo chiave nella neurogenesi adulta: si comportano da progenitrici con funzione di staminali neuronali adulte e guidano le cellule in migrazione grazie ai prolungamenti che si estendono verso i distretti da colonizzare (D'Amico et al., 2011).

1.5.3 Rettili

Nell'ambito della classe dei rettili, la neurogenesi adulta è stata riscontrata nei cheloni e negli squamati. Le prime evidenze della presenza del fenomeno neurogenico negli organismi adulti derivano dall'incremento, correlato all'età, del volume e del numero di neuroni nel sistema nervoso di lucertole quali *Podarcis muralis* e *Podarcis hispanica* (Grandel e Brand, 2013). L'attività proliferativa risulta molto intensa nella zona periventricolare del telencefalo (Lindsey e Tropepe, 2006), in cui è riscontrata la presenza di cellule gliali con caratteristiche di progenitrici, organizzate a formare un epitelio monostratificato, e i cui prolungamenti formano un'impalcatura all'interno del parenchima nervoso che guida la migrazione delle cellule.

1.5.4 Uccelli

La neurogenesi adulta negli uccelli è stata evidenziata per la prima volta nell'ambito di studi relativi al canto (Goldman e Nottebohm, 1983) sul passeriforme *Serinus canaria*, il canarino domestico.

L'area del sistema nervoso in cui si osserva la proliferazione cellulare è la zona ventricolare, dove le cellule progenitrici danno origine a cellule figlie che migrano verso i centri vocali superiori e nell'ippocampo, in cui vengono incorporate in circuiti nervosi già esistenti (Lindsey e Tropepe, 2006).

Il processo di neurogenesi è stato in seguito evidenziato anche in uccelli che non cantano, ad esempio nei colombiformi (*Streptopelia risoria*), in cui la proliferazione avviene nella zona ventricolare ma i neuroni migrano nel telencefalo, senza preferire alcun'area in particolare (Ling et al., 1997).

L'architettura delle nicchie di neurogenesi mostra tre tipi cellulari: cellule di tipo B, con caratteristiche di glia radiale, che vanno incontro a

proliferazione, in seguito a cui danno origine a cellule di tipo A, neuroblasti. Sono state poi identificate cellule ependimali, che non subiscono divisioni cellulari. La glia radiale presenta caratteristiche staminali (Alvarez-Buylla e Kirn, 1997): in seguito a divisione asimmetrica, una delle cellule figlie da origine ad un neurone immaturo che migra nel telencefalo.

Il significato funzionale della neurogenesi adulta negli uccelli è legato alla capacità di vocalizzazione negli uccelli che cantano (Alvarez-Buylla et al., 1992), e alla risposta alla vocalizzazione negli uccelli che non cantano, oltre che all'apprendimento e alla memoria, alla base dei fenomeni migratori e delle interazioni sociali (Adar et al., 2008).

1.5.5 Mammiferi

La neurogenesi adulta nei mammiferi, in condizioni fisiologiche, ha luogo in due aree del sistema nervoso: la zona subventricolare del ventricolo laterale e la zona subgranulare del giro dentato dell'ippocampo (Jessberger e Gage, 2014). Le cellule generate dalla zona subventricolare si muovono attraverso la via migratoria rostrale per arrivare al bulbo olfattorio, dove si differenziano in neuroni. Le cellule che nascono nella zona subventricolare migrano invece nello strato granulare del giro dentato. Una volta a destinazione, i neuroni si integrano nei circuiti preesistenti.

Le cellule progenitrici sono staminali adulte che, in seguito a divisione mitotica, possono dare origine ad una cellula uguale alla cellula madre e una cellula che potrà differenziarsi in tutti i tipi di cellule nervose (Aimone et al., 2014).

In base ad analisi morfologiche e di pattern di espressione, sono stati identificati due tipi di progenitori nella zona subgranulare. Le cellule di tipo I presentano processi cellulari radiali che si estendono nell'intero strato di

cellule granulari ed esprimono tipici markers astrocitari (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP), anche se la loro morfologia e la loro funzione differisce drasticamente dagli astrociti maturi, e proteine tipiche degli stadi precoci di sviluppo (Nestina). Le cellule di tipo II hanno brevi prolungamenti e non esprimono GFAP, esse possono dare origine ad altre staminali di tipo II, a neuroni o astrociti.

Le progenitrici della zona subventricolare possono essere di tre tipi: A, B e C. Le cellule di tipo B esprimono GFAP, le cellule di tipo C sono cellule ad amplificazione transitoria e quelle di tipo A sono i neuroblasti che migrano (Yao et al., 2012).

Nonostante sia possibile riscontrare la presenza di staminali nervose adulte in diversi distretti del sistema nervoso, la neurogenesi adulta è presente solo nella zona subgranulare e sub ventricolare . Si ipotizza che in queste aree vi sia l'influenza di un microambiente caratterizzato da specifici fattori permissivi per il differenziamento e l'integrazione di nuovi neuroni (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009).

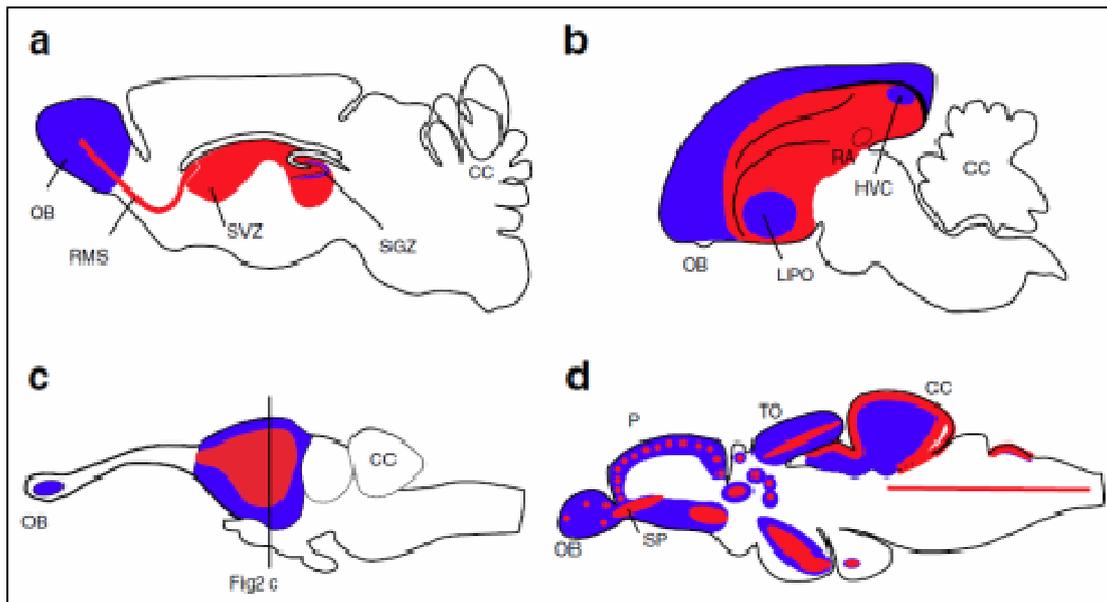


Figura 8. Schema di sezioni sagittali dei sistemi nervosi di: a. topo, B. uccello, c. rettile, d. pesce. In rosso le aree di proliferazione cellulare e in blu le vie di migrazione. CC. – *corpus cerebelli*; HVC. – centri vocali superiori; LPO. – lobo paraolfattorio; OB. – bulbo olfattorio; P. - *pallium*; RA. – nucleo robusto dell’archistriato; RMS. – via migratoria rostrale, SGZ. – zona sub granulare; SVZ. – zona subvetricolare; TO. – tetto ottico. Da Grandel e Brand, 2013.

1.6 La neurogenesi adulta negli invertebrati

1.6.1 Insetti, ecdisozi

I primi ecdisozi in cui è stata accertata la presenza del fenomeno della neurogenesi adulta sono gli insetti. Sebbene vi siano considerevoli differenze specie-specifiche, sono presi qui in considerazione gli studi sul sistema nervoso del grillide *Acheta domesticus*, in cui sono state indagate approfonditamente la proliferazione e la migrazione delle cellule, oltre che i meccanismi che regolano il fenomeno (Cayre et al., 2007). La neurogenesi adulta ha luogo nei mushroom bodies, strutture pari situate nel protocerebro olfattivo, considerati i principali centri di integrazione sensoriale nel cervello degli insetti, in quanto ricevono informazioni olfattive dai lobi antennali, inputs visivi dai lobi ottici e inputs tattili dai palpi, e il secondo stadio del pathway olfattorio. I mushroom bodies sono costituiti da una parte più esterna detta *cortex* e da un neuropilo interno che consta a sua volta di una zona detta calice e di un peduncolo, diviso nei lobi verticale e mediale. Si evidenzia nei mushroom bodies una popolazione di interneuroni detti Kenyon cells; la proliferazione cellulare coinvolge i neuroblasti situati nel *cortex*, i quali migrano verso la zona interna, dove spingono le Kenyon cells a formare strati esterni di cellule più vecchie, mentre i nuovi neuroni, differenziatisi anch'essi in Kenyon cells, costituiscono gli strati più interni (Cayre et al., 2000).

A differenza di quanto avviene nei crostacei, negli uccelli e nei mammiferi, i nuovi neuroni originatisi in seguito alla proliferazione non sostituiscono i neuroni più vecchi ma contribuiscono ad arricchire la popolazione cellulare esistente, aumentando la plasticità di quest'area del sistema nervoso (Cayre et al., 1996a).

La neurogenesi adulta negli insetti è sotto il controllo di ormoni, neurotrasmettitori e fattori di crescita. In particolare, in *A. domesticus* è stata accertata l'azione dell'ormone giovanile che ha un ruolo mitogeno, reclutando neuroblasti quiescenti affinché questi entrino in divisione (Cayre et al., 1997a). Studi approfonditi sono stati condotti anche sull'effetto degli stimoli sensoriali sul fenomeno neurogenico. È stato evidenziato che grilli allevati in ambienti ricchi di stimoli sensoriali presentano un incremento del numero delle cellule in proliferazione dato da un'accelerazione del ciclo cellulare, rispetto ai grilli allevati in scatole buie. Inoltre, animali irradiati con raggi gamma allo scopo di uccidere i neuroblasti in proliferazione, presentano maggiori difficoltà rispetto ai non trattati in situazioni di apprendimento associativo (Malaterre et al., 2002). La capacità proliferativa nei neuroni, infine, decresce con la senescenza. Oltre che negli ortopteri, la neurogenesi è stata riscontrata anche in altri organismi appartenenti al *phylum* degli insetti, quali alcune specie di coleotteri, di emitteri, di mantidei e di lepidotteri (Dufour e Gadenne 2006). Con grande sorpresa, non vi sono evidenze di cellule in proliferazione nel sistema nervoso dell'ape (*Apis mellifera*), sebbene siano riscontrabili fenomeni di sinaptogenesi e rimodellamento a supporto dei complessi comportamenti sociali caratteristici di questi imenotteri (Fahrbach et al., 1995).

1.6.2. Crostacei, ecdisozi

Un altro *taxon* di ecdisozi in cui è stato a fondo indagato il fenomeno della neurogenesi adulta è quello dei crostacei (Sullivan e Beltz, 2005b). La neurogenesi ha luogo nel deutocerebro olfattivo, primo stadio del pathway olfattivo centrale. Esso consta di un paio di lobi olfattori bilaterali, che

ricevono le informazioni olfattive dai recettori neuro-olfattori, e di due paia di gruppi di cellule, anch'essi bilaterali, che si distinguono in cluster mediali (cluster 9), in cui sono localizzati i soma degli interneuroni, e cluster laterali (cluster 10), di cui fanno parte i neuroni di proiezione. Entrambi i tipi cellulari vanno incontro a proliferazione.

Anche nell'ambito dei crostacei, così come negli insetti, vi sono differenze specie-specifiche che riguardano il meccanismo della neurogenesi. Nel decapode *Panulirus argus* è stata evidenziata la presenza di strutture dette nicchie di proliferazione nei cluster laterali. Sono costituite da gruppi di cellule di sostegno raggruppate intorno ad un'unica cellula in divisione, detta neuroblasto, con caratteristiche di staminale neuronale. Il neuroblasto subisce una divisione cellulare asimmetrica: una cellula rimane, indifferenziata, nella nicchia e l'altra migra attraverso un dotto fino ad arrivare nelle zone proliferative, dove, in seguito ad una serie di rapide divisioni mitotiche, cellule progenitrici dei neuroni danno origine a neuroni immaturi (Schmidt et al., 2001).

La nicchia di proliferazione è una struttura ben distinguibile all'interno del neuropilo. Essa è circondata da cellule gliali e da vasi sanguigni, entrambi necessari per ricreare un microambiente costante e favorevole alla proliferazione cellulare, che è sotto l'influenza di fattori di crescita ed ormoni.

Anche nel gambero *Procambarus clarkii* è stata evidenziata la presenza di nicchie di neurogenesi localizzate nei cluster 9 e 10 del deutocerebro olfattivo, da cui si originano nuove cellule (Sandeman et al., 2011). La differenza rispetto a quanto descritto per *P. argus* è da ricercarsi nella fonte di precursori neuronali. Infatti, in *P. clarkii*, i neuroblasti presenti nella nicchia vanno incontro ad una divisione mitotica simmetrica, ed entrambe

le cellule figlie migrano attraverso il dotto per andare poi a colonizzare le zone di proliferazione, dove si divideranno ulteriormente per dare infine origine ai neuroni immaturi (Sullivan, 2007b). La nicchia è continuamente rifornita di neuroblasti, che sono reclutati tra le cellule della nicchia stessa, o, secondo i più recenti studi (Beltz et al., 2011) tra le cellule del sangue, le quali perdono il commitment ematopoietico a favore di quello di staminale neuronale, sotto l'influenza di stimoli interni ed esterni. Situazione ben diversa è stata descritta in *P. argus*, in cui una divisione asimmetrica del neuroblasto, porta una cellula figlia a migrare e l'altra a rimanere in sede conservando le caratteristiche staminali (Schmidt e Derby, 2011).

Nonostante siano state evidenziate queste ed altre differenze, ad esempio, nei paguroidi è stata descritto il cluster 9 come unica area di proliferazione, esse sono riconducibili unicamente alle diversità strutturali e morfologiche del sistema nervoso di organismi appartenenti a *taxa* diversi. Dal punto di vista cellulare e funzionale, infatti, le nicchie di proliferazione non presentano importanti differenze (Sandeman et al., 2011).

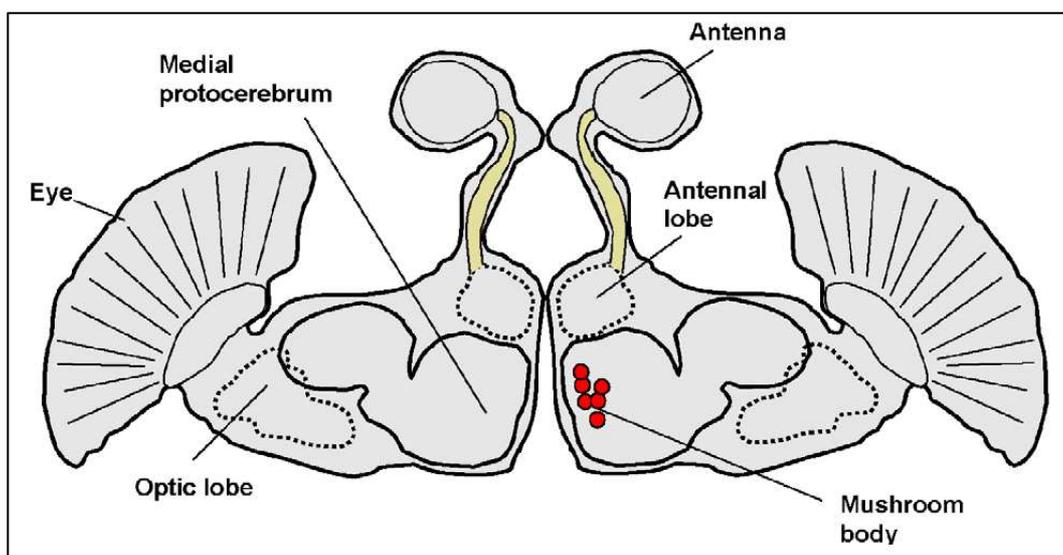


Figura 9. Schema di una sezione orizzontale del sistema nervoso degli insetti. In rosso le aree in cui è stata riscontrata la neurogenesi adulta. Da Lindsey e Tropepe, 2006.

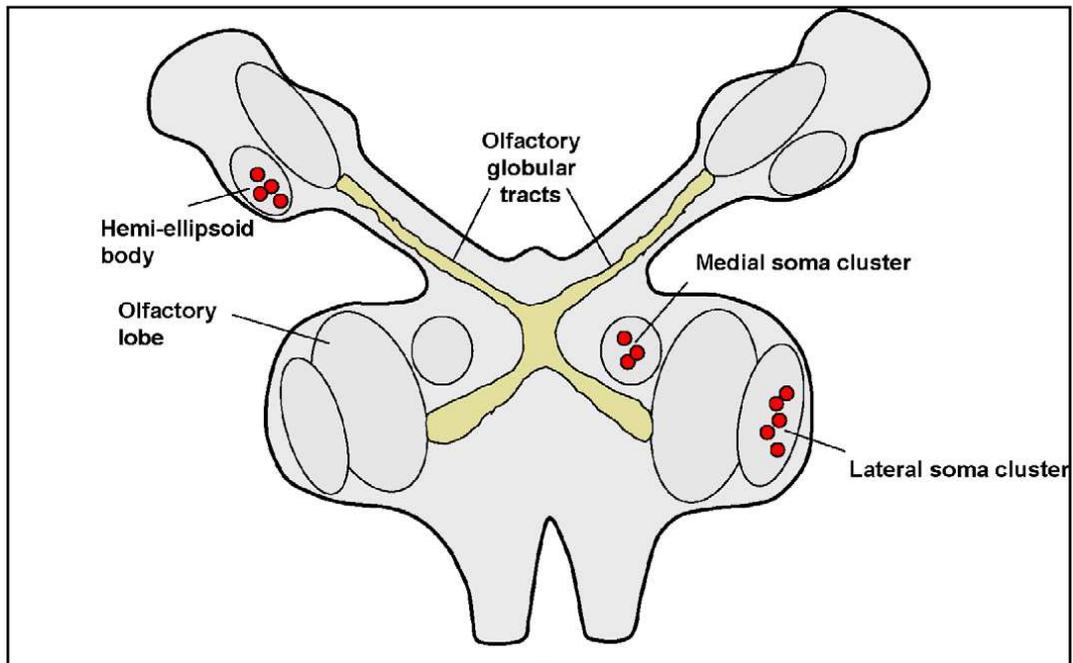


Figura 10. Schema di una sezione orizzontale del sistema nervoso di un decapode. In rosso le aree del sistema nervoso in cui è stata evidenziata la neurogenesi adulta. Da Lindsey e Tropepe, 2006.

SCOPO DEL LAVORO

2. Scopo del lavoro

Lo scopo del lavoro è colmare il vuoto di conoscenze relative ai meccanismi morfologici e funzionali alla base della neurogenesi adulta nei Lofotrocozoi, in particolare nel cefalopode *Octopus vulgaris*.

2.1 Razionale del progetto

1. Evidenziare la presenza di aree in proliferazione nel sistema nervoso di esemplari adulti di *O. vulgaris*, mediante saggi funzionali di proliferazione volti a rivelare cellule in attività mitotica.

Allo scopo sono stati utilizzati due markers di divisione cellulare: la bromodeossiuridina (BrdU), un nucleoside sintetico analogo della timina che si incorpora nel DNA in sintesi durante la fase S del ciclo cellulare, e l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA), una proteina che agisce da cofattore della DNA polimerasi δ .

Entrambi i marcatori sono largamente utilizzati negli studi riguardanti tessuti in proliferazione e rigenerazione (Janigro, 2008): i primi esperimenti, il cui fine è stato quello di localizzare le cellule in proliferazione, sono stati condotti su cervelli di *O. vulgaris* incubati con BrdU, mentre la PCNA è stata utilizzata in seguito per rilevare variazioni quantitative dell'attività proliferativa, essendo questa proteina costitutivamente presente nelle cellule in attività.

2. Isolare il gene ELAV nel sistema nervoso di *O. vulgaris* (Oct-elav1), allo scopo di proporlo come possibile marcatore della neurogenesi adulta nei cefalopodi, in quanto marcatore di neuroni post-mitotici all'inizio del differenziamento nell'ambito dei metazoi (Pascale et al., 2008).

3. Esperimenti comportamentali che consistono in training condotti su esemplari che hanno trascorso un idoneo periodo di stabulazione, come da direttiva EU2012/0124283-08/11/2012, durante il quale sono stati prodotti filmati poi analizzati, al fine di redigere un' etogramma descrittivo del comportamento di *Octopus vulgaris* in condizioni di stabulazione.

Gli esperimenti comportamentali sono stati condotti per un periodo di tre giorni consecutivi, durante i quali i polpi sono stati mantenuti in ambiente arricchito e in ambiente standard. Gli esperimenti sono stati videoregistrati con telecamere al fine di redigere gli etogrammi.

4. Verifica dell'avvenuta neurogenesi adulta negli esemplari sottoposti agli esperimenti di comportamento:

- Comparando i livelli di PCNA e i livelli di poli (ADP-ribose) polimerasi (PARP1), marker di attività sinaptogenica (De Lisa et al., 2012), nel sistema nervoso centrale.
- confrontando, mediante retrotrascrizione, amplificazione per PCR e Real Time PCR, i livelli di espressione del gene marker Oct-elav1.

*MATERIALI
E METODI*

3. Materiali e metodi

3.1 Animali

Esemplari (n=30) di *Octopus vulgaris* del peso di circa 500g sono stati pescati nel golfo di Napoli nell'arco di tre anni.

Per i saggi di proliferazione sono stati utilizzati animali di entrambi i sessi.

Per gli esperimenti comportamentali sono stati utilizzati esemplari di sesso femminile.

I polpi sono stati stabulati presso il Dipartimento di Biologia di Monte S. Angelo, in vasche in PVC con pareti grigie e coperchi trasparenti, attrezzate con tane di plastica e sabbia naturale analizzata secondo criteri chimici e microbiologici, alimentate con acqua di mare a circuito chiuso, e collocate in stanze a temperatura costante (16°C) esposte alla luce naturale per ricreare il fotoperiodo naturale.

All'arrivo sono state verificate le condizioni fisiche degli animali, i quali, per essere stabulati, non devono presentare danni visibili all'epidermide né mutilazioni alle braccia. I polpi sono stati poi velocemente pesati ed è stato effettuato il riconoscimento del sesso, infine ognuno è stato alloggiato in una vasca.

Ogni giorno sono state verificate le condizioni di benessere dell'animale secondo parametri fisiologici e comportamentali, quali:

- colore
- postura
- rigidità/flaccidità muscolare

- ventilazione (frequenza, intensità)
- reazione di fronte all'operatore
- anomalie nell'assunzione di cibo
- anomalie nell'escrezione
- anomalie nella coordinazione motoria
- anomalie nell'emissioni di inchiostro
- perdita della curiosità
- autofagia e/o mutilazione

Durante i giorni di acclimatazione, allo scopo di redigere etogrammi che descrivano i comportamenti di Octopus in condizioni di stabulazione, sono stati osservati e videoregistrati i comportamenti degli animali dei gruppi TRAINED e CONTROL, in particolare sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- Colorazione/pattern corporeo
- Attività
- Locomozione
- Reazioni di difesa

Gli animali sono stati alimentati giornalmente con mitili (*Mytilus galloprovincialis*) o granchi (*Carcinus mediterraneus*) appositamente stabulati.

La dissezione del cervello è stata condotta in condizioni di sterilità, previa anestesia dell'animale, mediante esposizione ad isofluorano (Polese et al, 2014). Dal 1° gennaio 2013 i cefalopodi sono sotto tutela della comunità europea (2010/63/UE): la sperimentazione condotta su *Octopus vulgaris* è stata approvata dal Comitato etico scientifico di Ateneo (PROT.N. 2012/0124283-08112012).

Gli esperimenti sono stati condotti in conformità con i principi etici di Riduzione, Perfezionamento e Sostituzione, che consistono nell'utilizzare qualsiasi approccio che eviti, allevi o riduca al minimo il dolore, reale o potenziale

3.2 Saggi di proliferazione

3.2.1 Bromodeossiuridina (BrdU)

I cervelli prelevati sono stati incubati con Bromodeossiuridina (BrdU) (Sigma Aldrich) 10uM in acqua di mare artificiale (ASW) per 30 minuti, come da protocollo (Di Cristo et al., 2008). Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in ASW, i tessuti sono stati fissati in paraformaldeide (PFA, Sigma Aldrich) al 4% per 24 ore, poi disidratati in scala ascendente di etanoli, infine chiarificati in xilene e inclusi in paraffina (Bio-Optica). Mediante microtomo rotativo (Leica) sono state ottenute sezioni trasversali del sistema nervoso e sezioni orizzontali di lobi ottici, dello spessore di 7um, le quali sono state reidratate, dopo di che si è proceduto all'incubazione dell'anticorpo anti-BrdU (Sigma Aldrich) in tampone fosfato (PBS) a 4°C per tutta la notte, previo blocco dei siti aspecifici con siero di capra. Il giorno seguente, dopo abbondanti lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (Sigma Aldrich) per un'ora a temperatura ambiente. Infine è stata condotta una reazione enzimatica di tipo colorimetrico con utilizzo di diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich) allo 0,3%. Le sezioni sono state poi disidratate in scala ascendente di etanoli, chiarificate in xilene, infine montate in resina Eukitt e lasciate asciugare per tutta la notte.

Le diluizioni d'uso degli anticorpi sono riportate nella tabella 1.

3.2.2 Antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA)

I cervelli sono stati processati come riportato nel paragrafo 3.1.2.1, incubati con anticorpo anti-PCNA (PC10, Sigma Aldrich) per tutta la notte a 4°C, infine si è proceduto alla rivelazione come riportato nel paragrafo 3.2.1.

Le diluizioni d'uso degli anticorpi sono riportate nella tabella 1.

Anticorpo	Diluizione d'uso	Casa produttrice
Anti-BrdU (mouse)	1:1000 immunoistochimica	SIGMA ALDRICH
Anti-PCNA (PC-10, mouse)	1:50000 Immunoistochimica 1:500 western blotting	SIGMA ALDRICH
Anti-PARP1 (rabbit)	1:1000 western blotting	SANTA CRUZ
Anti- α -tubulina (mouse)	1:1000 western blotting	SIGMA ALDRICH
Goat anti-mouse coniugato con perossidasi di rafano	1:2000 Immunoistochimica 1:5000 western blotting	PIERCE
Goat anti-rabbit coniugato con perossidasi di rafano	1:2000 Immunoistochimica 1:5000 Western blotting	SIGMA ALDRICH

Tabella 1. Diluizioni d'uso degli anticorpi utilizzati per i saggi di proliferazione e i western blotting.

3.3 Clonaggio di Oct-elav1

3.3.1 Estrazione dell'RNA totale

I cervelli sono stati conservati a -80°C in TRIzol (Sigma Aldrich) e, dopo essere stati omogenati con il Polytron (Kinematica), l'RNA totale è stato estratto come da indicazioni della casa produttrice, poi quantificato al Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e conservato a -80°C.

3.3.2 Sintesi del cDNA e amplificazione per PCR

1 ug di RNA estratto è stato retrotrascritto mediante trascrittasi inversa Im-PROM (Promega) come da indicazione della casa produttrice, utilizzando esameri random (tabella 2). I cDNA sono stati amplificati mediante Taq polimerasi (Sigma Aldrich), come da indicazione della casa produttrice. Vista l'assenza di sequenze specifiche per i geni della famiglia ELAV degli ottopodi, per isolare il gene d'interesse sono stati utilizzati i primers (tabella 3) e il programma di amplificazione (tabella 4) utilizzati per clonare il gene Sof-elav1 in *S. officinalis* (Buresi et al., 2013).

	Temperatura	Tempo
Appaiamento	25°C	5'
Estensione	42°C	60'
Inattivazione retrotrascrittasi	70°C	15'

Tabella 2. Programma di retrotrascrizione (kit Im-Prom Promega)

Sequenza primers	Esperimento
FW Sof-elav1 GCGGCCGCAACTATCTTCCACAAACAAT	PCR semiquantitativa
RV Sof-elav1 CTGCAGGCCCT TTAATGCTT TCACT	PCR semiquantitativa/Real Time PCR
FW ELAV GCACGAAATGCATCAACCGATGCGG	Real Time PCR
FW βtubulina <i>O.vulgaris</i> GCGGCCGCCGACTGGTCGATTGG	PCR semiquantitativa/Real Time PCR
RV βtubulina <i>O.vulgaris</i> CTGCAGCGCAACTTTCGGCTTCCT TA	PCR semiquantitativa/Real Time PCR

Tabella 3. Sequenze dei primers utilizzati.

	Temperatura	Tempo
Denaturazione	94°C	1'
Appaiamento primers	58°C	2'
Estensione	72°C	3'

Tabella 4. Programma di amplificazione del cDNA, la reazione è stata ripetuta per 24 cicli.

3.3.3 Isolamento del prodotto di PCR

Il prodotto di PCR è stato analizzato per elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% e purificato mediante il kit Genelute Extration Gel (Sigma Aldrich), come da indicazione della casa produttrice.

3.3.4 Ligasi

Il prodotto di PCR estratto dal gel è stato inserito nel vettore di clonaggio PGEM T-easy (Promega) con l'utilizzo del kit Ligasi T4 (Promega), come da indicazione della casa produttrice. Il rapporto tra quantità di vettore e quantità di inserto utilizzato è di 3:1. La reazione di ligasi è stata piastrata su terreno LB agar con ampicillina (10mg/ml) e incubata a 37°C per tutta la notte. Le colonie state poi trasferite in terreno LB fresco e incubate a 37°C per tutta la notte.

3.3.5 Isolamento del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato isolato da singole colonie cresciute in terreno LB fresco come descritto nel paragrafo 3.3.4, mediante kit MiniPrep (Sigma Aldrich), come da indicazione della casa produttrice, quantificato al Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e conservato a -20°C.

3.3.6 Sequenziamento

Un'aliquota di DNA plasmidico purificato è stata utilizzata per sequenziare il gene clonato. L'esperimento è stato condotto nel laboratorio della dott.ssa Donata Cafasso, Dipartimento di Biologia di Monte S. Angelo.

3.3.7 Allineamenti

Gli allineamenti sono stati condotti mediante il programma on-line Blast (Basic Local Alignment Search Tool).

3.4 Esperimenti comportamentali

3.4.1 Acclimatazione

Gli esemplari di polpi sono stati stabulati come descritto nel paragrafo 3.1. Prima di essere sottoposti agli esperimenti comportamentali, essi sono stati fatti acclimatare nelle vasche per un tempo di 5 giorni, durante i quali sono stati filmati, al fine di analizzare i comportamenti in condizioni di stabulazione. Quotidianamente sono stati monitorati i parametri elencati nel paragrafo 3.1, per verificare le buone condizioni degli animali, i quali sono stati nutriti ogni giorno alla stessa ora con mitile o granchio.

3.4.2 Esperimenti di comportamento

Gli animali (n=9, sesso femminile) sono stati divisi in tre gruppi sperimentali (WILD, TRAINED, CONTROL).

Gli animali (n=3) appartenenti al gruppo WILD sono stati sacrificati, previa anestesia mediante esposizione ad isofluorano (Polese et al., 2014), appena arrivati in laboratorio, subito dopo le operazioni di peso e riconoscimento del sesso.

Gli animali (n=3) appartenenti al gruppo TRAINED, dopo l'acclimatazione, sono stati sottoposti ad esperimenti di training. Ai polpi sono stati presentati, per tre giorni di seguito, tre barattoli di plastica trasparente, muniti di cannicchi necessari ad appesantire i barattoli e contenenti mitili vivi. I barattoli sono stati avvitati con tappi di plastica, riempiti d'acqua e immersi in contemporanea nella vasca.

Gli animali (n=3) appartenenti al gruppo CONTROL sono stati alloggiati in vasche standard, descritte nel paragrafo 3.1, e, dopo l'acclimatazione, non

sono stati sottoposti al training sopra descritto e sono stati nutriti quotidianamente, come da protocollo.

Tutti gli esperimenti comportamentali sono stati filmati per un'ora con videocamere (HMX F90 Samsung) collocate perpendicolarmente alle vasche.

Dai nove esemplari sono stati prelevati i sistemi nervosi per eseguire gli esperimenti di Western Blotting, PCR semiquantitativa, Real Time PCR.

I dati comportamentali sono stati analizzati mediante il software GraphPad 6 XML e la significatività è stata valutata applicando il T-test.

3.5 Analisi molecolari

3.5.1 Western blotting

Lobi ottici, massa sopraesofagea e sottoesofagea, una volta dissezionati, sono stati omogenati separatamente in RIPA buffer (Sigma Aldrich) con Polytron (Kinematica), dopo di che le proteine sono state estratte dai tessuti come da indicazione della casa produttrice. L'estratto proteico totale è stato quantificato con reagente Bradford (Biorad), come da indicazione della casa produttrice. Gli estratti proteici (30 ug) sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide-SDS al 10% (ricetta come da Maniatis et al.) per 2 ore e 30 minuti. Le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Whatman) per 2 ore a 4°C, a voltaggio costante (100V). Le membrane sono state colorate con Rosso Ponceau per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine, dopo di che è stato effettuato il blocco dei siti aspecifici con non fat milk 5% (Biorad) in PBS tween 0,1% (PBS-T). Infine, le membrane sono state incubate con anticorpo anti-PCNA e anticorpo anti-PARP1 (Santa Cruz), utilizzando anti- α -tubulina (Sigma Aldrich) come normalizzatore, per tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi da 10 minuti in PBS-T, le membrane sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano per 2 ore a temperatura ambiente, infine rivelate con ECL (Thermo Scientific) al Chemidoc (Biorad, tempo di esposizione 60 secondi).

Tutte le diluizioni d'uso degli anticorpi sono riportate nella tabella 1.

3.5.2 Estrazione dell'RNA totale

Le masse sopraesofagea e sottoesofagea e i lobi ottici, una volta dissezionati, sono state conservati a -80°C in TRIzol (Sigma Aldrich) e, dopo essere state omogenate con il Polytron (Kinematica), l'RNA totale è stato estratto come da indicazioni della casa produttrice, poi quantificato al Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), quindi conservato a -80°C fino all'uso.

3.5.3 Sintesi del cDNA e amplificazione per PCR

1µg di RNA totale estratto dai campioni è stato retrotrascritto e poi amplificato per PCR come descritto nel paragrafo 3.3.2.

3.5.4 Real Time PCR

Le Real Time PCR sono state condotte amplificando 100 ng di cDNA per ogni reazione, con l'utilizzo del Kit Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen). In accordo con le indicazioni della casa produttrice, sono stati usati 400 nM di primers (tabella 3) per reazione. Tutte le reazioni sono state condotte in duplicato, con l'utilizzo del termociclatore Rotor Gene Q (Qiagen).

Le quantificazioni dei livelli di mRNA sono state condotte in rapporto all'espressione del gene housekeeping β tubulina di *Octopus vulgaris* presente in banca dati (accession number AB099884.1) e i dati sono stati analizzati con il metodo del $2e^{-\Delta\Delta Ct}$.

La significatività è stata valutata mediante l'utilizzo del software Rest 2009. L'esperimento è stato condotto nel laboratorio del dott. Domenico Fulgione, Dipartimento di Biologia di Monte S. Angelo.

RISULTATI

4. Risultati

4.1 Saggi di proliferazione

Tali saggi hanno consentito di individuare le aree del sistema nervoso di Octopus in attiva proliferazione cellulare. La rivelazione dell'attività proliferativa effettuata con anti-BrdU e anti-PCNA, ha mostrato che le cellule in divisione sono localizzate nella massa sopraesofagea, in cui si evidenzia un'intensa positività: nel sistema frontale-verticale, sede di apprendimento e memoria, nei lobi olfattori e nelle isole della medulla del lobo ottico, sedi di integrazione degli stimoli sensoriali. Nella massa sottoesofagea, una lieve positività è evidenziabile nel lobo pallioviscerale, centro motorio inferiore.

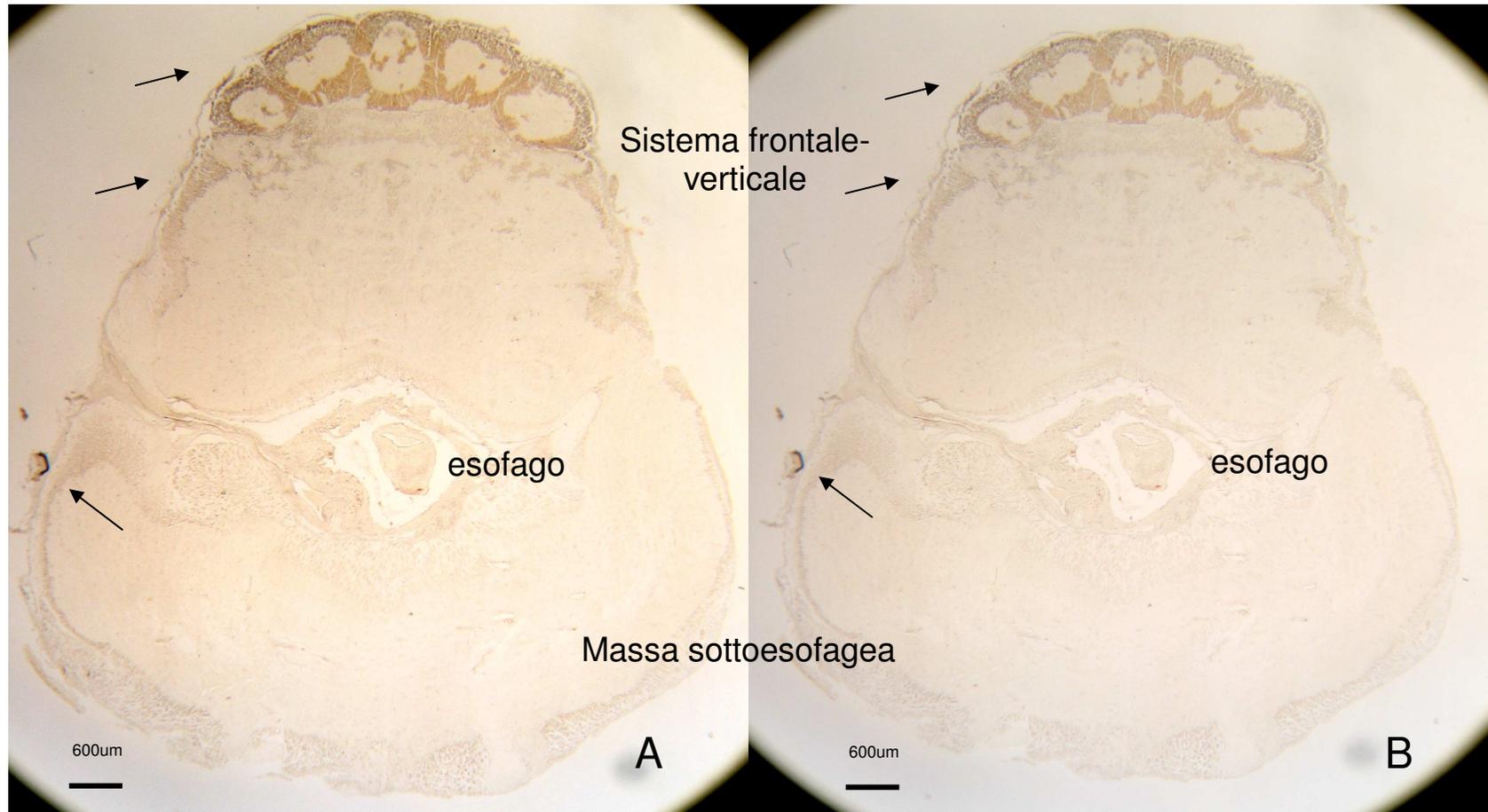


Figura 11. Sezioni trasversali del sistema nervoso di *Octopus vulgaris*. A. saggio di proliferazione condotto mediante incorporazione con BrdU e rivelazione con anti-BrdU. B. saggio di proliferazione rivelato con anti-PCNA. Le cellule in proliferazione, in entrambi i casi, appaiono localizzate nel sistema frontale-verticale, una lieve positività è evidenziabile nella massa sottoesofagea, in prossimità del lobo pallioviscerale.

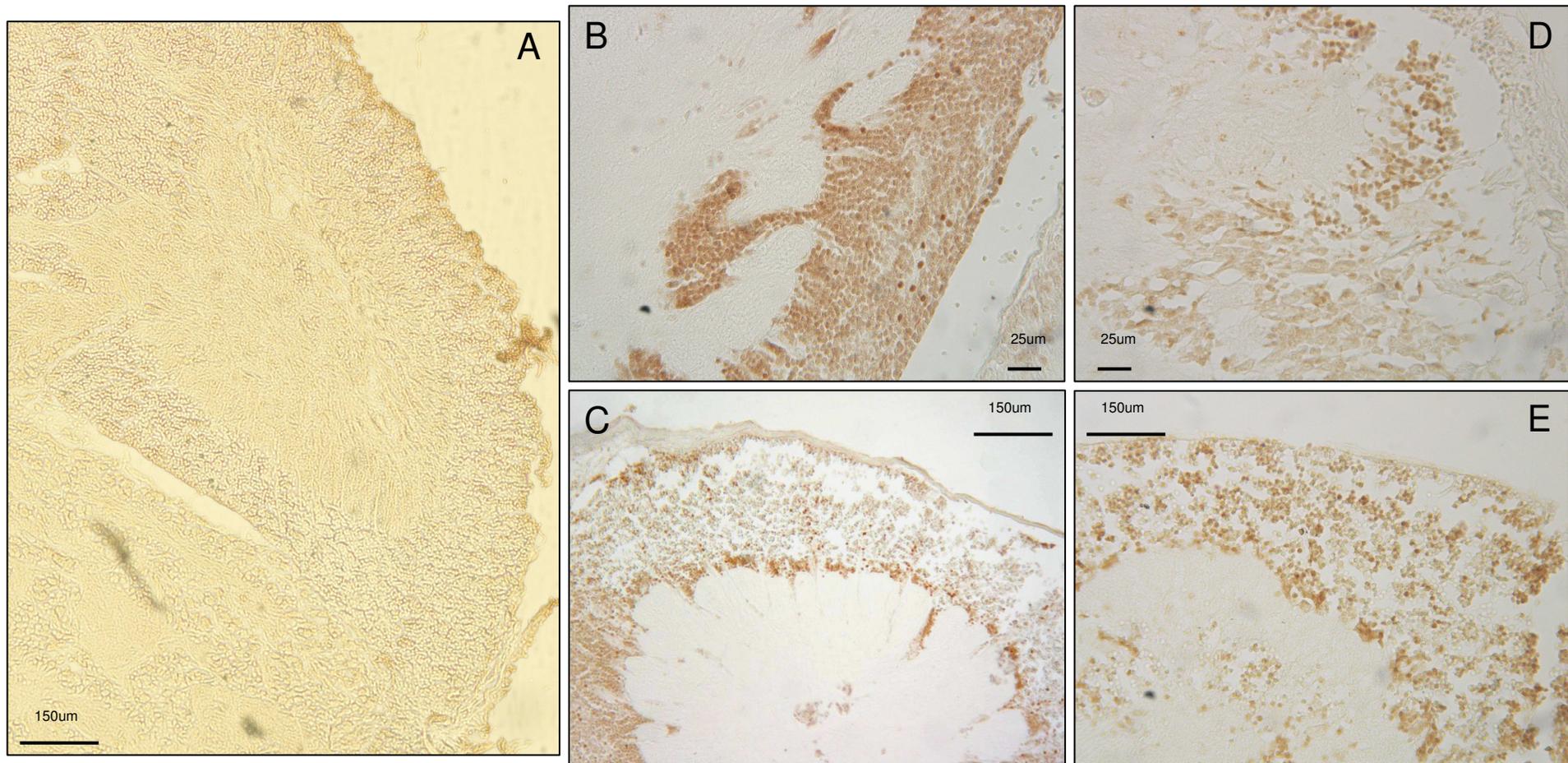


Figura 12. A. controllo. B e D. cellule in proliferazione nel lobo frontale laterale destro. C ed E. Cellule in proliferazione in un lobulo del lobo verticale. Nelle figure B e C è stata condotta un'immunoistochimica con anti-BrdU, nelle figure D ed E con anti-PCNA.

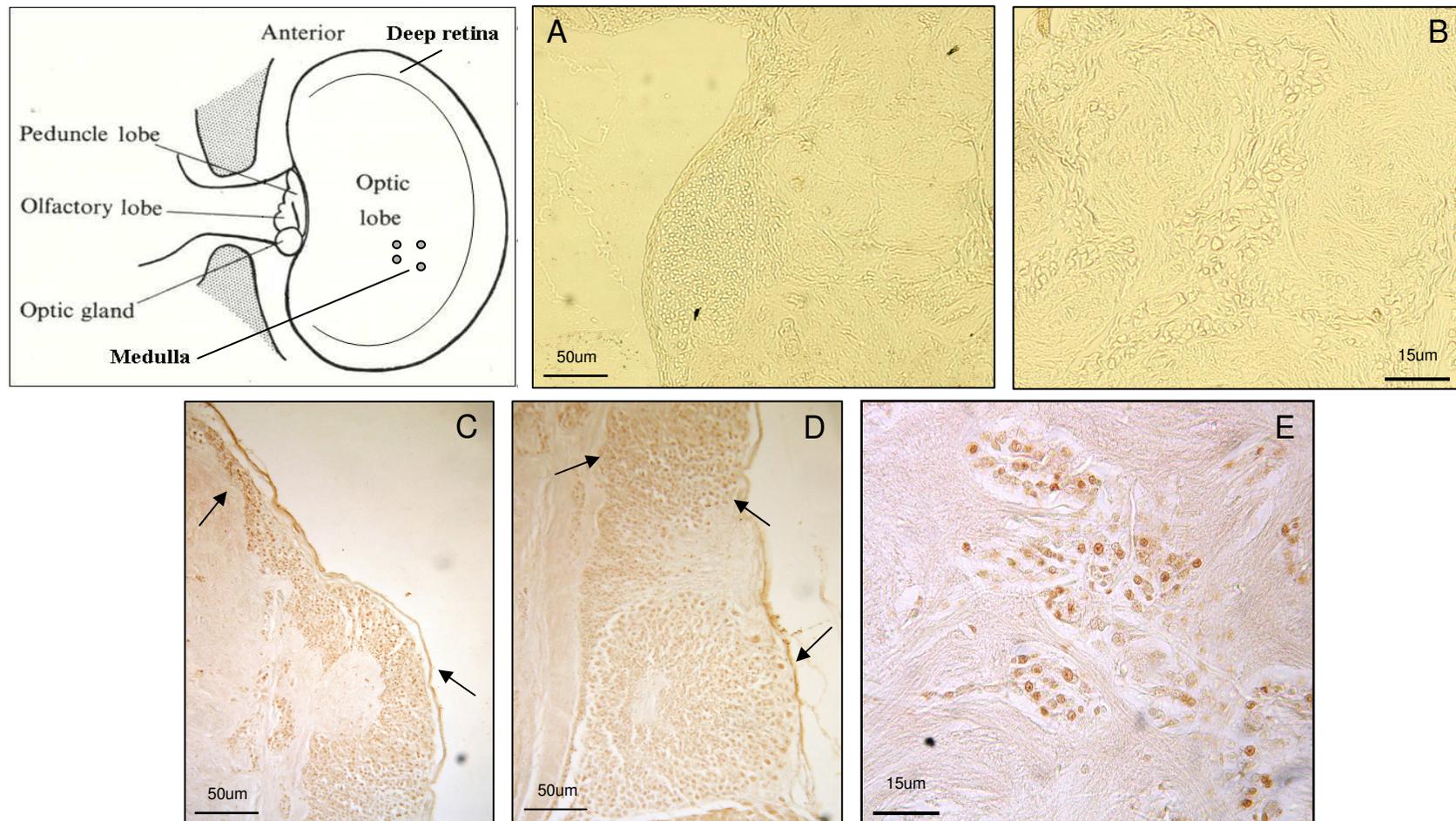


Figura 13. A, C e D. Sezioni orizzontali del lobo olfattorio. A. controllo, C. saggio di proliferazione condotto mediante incorporazione di BrdU e rivelazione con anti-BrdU, D. saggio di proliferazione rivelato con anti-PCNA. C ed E. Isole della medulla del lobo ottico. B. controllo, E. saggio di proliferazione condotto mediante incorporazione di BrdU e rivelazione con anti-BrdU.

4.2 Oct-elav1

4.2.1 Isolamento di Oct-elav1

La reazione di amplificazione per PCR condotta su cDNA totale derivante dal sistema nervoso di *Octopus vulgaris* ha originato due prodotti di PCR, uno di circa 400 paia di basi e l'altro di circa 350 paia di basi, così come riportato in *Sepia officinalis*, dove il prodotto di circa 400 paia di basi viene identificato come Sof-elav2, e quello di circa 350 paia di basi viene identificato come Sof-elav1 (Buresi et al., 2013).

Poiché Sof-elav1 viene utilizzato come marker del differenziamento neuronale nell'embriogenesi, abbiamo ritenuto opportuno clonare il prodotto di PCR di 350 paia di basi.

4.2.2 Allineamento

Con l'utilizzo di una coppia di primers che ha permesso l'identificazione di geni Sof-elav1 in *S. officinalis* (Buresi et al., 2013), è stato isolato, per la prima volta in Octopus, un gene appartenente alla famiglia ELAV, denominato Oct-elav1. Il gene in questione ha un'identità di omologia dell'88% con il gene ELAV isolato in *Octopus bimaculoides* (n. FJ861207). Inoltre il gene mostra un'identità di omologia del 71% con il gene elav1 isolato in *Sepia officinalis* (n. HE956712.1) e un'identità di omologia del 73% con il gene ELAV-like RNA binding protein 1 isolato in *Danio rerio* (NM_131452.1) (tabella 5).

	Accession number	Identità con Oct-elav1
<i>Octopus bimaculoides</i> Elav mRNA, partial cds	FJ861207.1	88%
<i>Sepia officinalis</i> partial mRNA for elav protein (elav1 gene)	HE956712.1	71%
<i>Danio rerio</i> ELAV like RNA binding protein 1 (elav1), mRNA	NM_131452.1	73%

Tabella 5. Tabella d'identità relativa ad Oct-elav1 isolato dal sistema nervoso di *Octopus vulgaris*.

4.3 Esperimenti comportamentali

Durante il periodo di acclimatazione, i polpi sono stati videoregistrati e i comportamenti osservati descritti nel seguente etogramma, redatto secondo i parametri elencati paragrafo 3.1.

<p>Colorazione/pattern corporeo</p>	<p>Colorazione grigio-ocra con screziature più chiare volte a simulare il fondale e le pareti della vasca, o la tana.</p> <p>Alla vista dell'operatore, gli animali tendono a diventare più scuri, spesso mostrano cerchi intorno agli occhi.</p> <p>Alla vista della preda, assumono un pattern grigio con spot bianchi sulle braccia.</p> <p>Occasionalmente è stato osservato un pattern in cui una metà del corpo appare chiara e l'altra scura con macchie disomogenee.</p>
<p>Attività</p>	<p>Gli animali trascorrono molto tempo in prossimità della tana.</p> <p>Alla presentazione della preda, collocata nella posizione opposta a quella dell'animale, esso si muove prontamente verso di essa, e poi si dirige nuovamente verso la tana.</p> <p>Gli animali sono più attivi nelle ore di luce, durante le quali esplorano la vasca, in particolare i componenti quali filtri e tubi di ingresso dell'acqua.</p>

Locomozione	<p>Gli animali si muovono nella vasca strisciando, nuotando o con propulsione a getto.</p> <p>In particolare quest'ultima modalità di movimento è stata osservata quando l'animale si muove rapidamente verso la preda o verso il retino utilizzato per pulire la vasca.</p> <p>Lo strisciamento e il nuoto vengono messi in atto durante l'esplorazione della vasca.</p>
Difesa	<p>Durante il primo giorno di acclimatazione, gli animali, alla vista dell'operatore, si rifugiano in tana con le braccia sollevate a difesa del corpo.</p> <p>Non sono stati osservati episodi di emissione di inchiostro.</p>

4.3.1 Analisi dei comportamenti

I polpi stabulati nelle vasche del Dipartimento di Biologia di Monte S. Angelo non hanno mostrato comportamenti aberranti durante la fase di stabulazione ottemperata secondo la Direttiva 2010/63/UE.

Gli animali sottoposti agli esperimenti comportamentali (gruppo TRAINED) in ambiente arricchito, hanno mostrato un notevole incremento nell'attività di esplorazione della vasca, una maggiore confidenza con l'operatore e un miglioramento generale della qualità della vita, rispetto agli animali del gruppo CONTROL, in ambiente standard, che si mostrano poco curiosi e schivi nei confronti dell'operatore.

L'analisi del comportamento dei polpi appartenenti al gruppo TRAINED è stata eseguita scegliendo tre tipi di comportamenti messi in atto nei confronti dei barattoli presentati:

- 1) predatorio, in cui l'animale avvolge l'oggetto (i barattoli presentati) con le braccia e lo porta nei pressi della zona boccale,
- 2) esploratorio, in cui tocca l'oggetto (i barattoli presentati) con la parte distale delle braccia,
- 3) "play-like", in cui tocca più volte l'oggetto (i barattoli presentati) oppure lo passa da un braccio all'altro, in un'azione coerente

Si è quindi valutato il numero di volte in cui l'animale assume i suddetti comportamenti nel tempo, durante i tre giorni di training.

Gli animali del gruppo TRAINED hanno mostrato una diminuzione del comportamento predatorio in favore di quello esploratorio durante i tre giorni di esperimenti. Il play-like mostra un aumento tra il primo ed il secondo giorno e diminuisce nel terzo.

Gli animali del gruppo CONTROL, in ambiente standard, mostrano un timido comportamento predatorio verso il cibo fornito durante tutti e tre i giorni dell'esperimento.

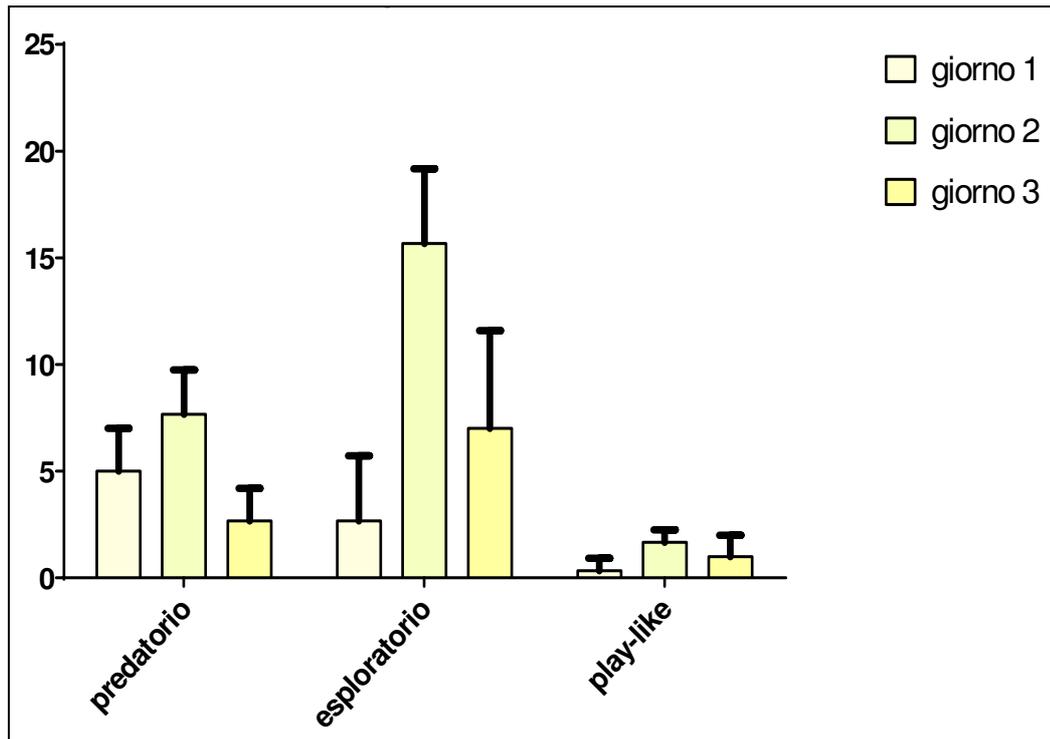


Grafico 1. Il grafico mostra l'andamento dei tre comportamenti analizzati nei diversi giorni di training.

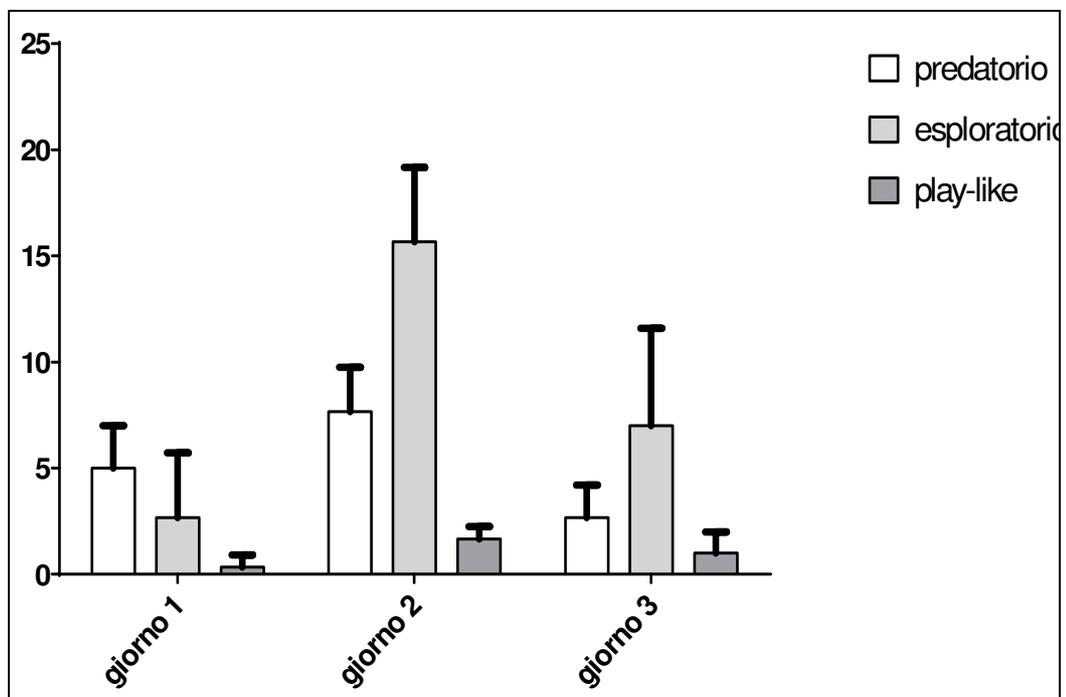


Grafico 2. Il grafico mostra una diminuzione del comportamento predatorio in favore di quello esploratorio dopo il primo giorno di esperimento. Il play-like mostra un aumento tra il primo ed il secondo giorno e diminuisce nel terzo.

4.3.2 “Problem solving”

O. vulgaris è in grado di attuare un particolare tipo di comportamento complesso conosciuto come “problem solving”. Il tempo impiegato per portare a termine un compito diminuisce con l’esperienza, per cui, più breve è il tempo impiegato nel “problem solving” più elevata è la capacità cognitiva (Fiorito et al., 1998).

Gli animali del gruppo TRAINED, sottoposti al problem solving, che consiste nell’apertura dei barattoli, hanno mostrato, nel corso dei tre giorni di training, una progressiva diminuzione del tempo impiegato per svitare i coperchi.

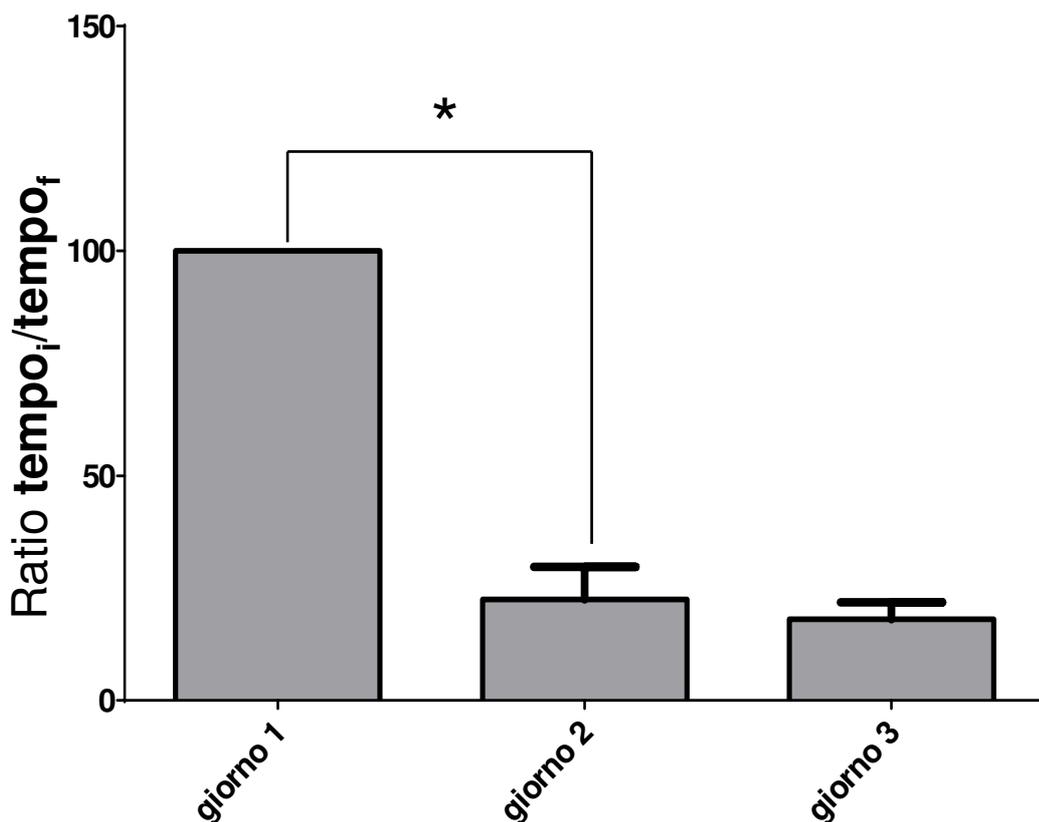


Grafico 3. Il grafico mostra una progressiva diminuzione del tempo impiegato dagli animali per svitare i coperchi. (Pvalue<0,05).

4.4 Analisi molecolari

4.4.1 PCR semiquantitativa

La PCR semiquantitativa riguardante Oct-elav1 nei cervelli dei polpi dei tre diversi gruppi ha mostrato una ridotta espressione del gene nella massa sopraesofagea degli animali del gruppo TRAINED rispetto agli animali dei gruppi CONTROL e WILD.

La stessa analisi condotta sulla massa sottoesofagea degli stessi animali ha mostrato un'aumentata espressione del gene negli animali del gruppo TRAINED rispetto agli animali dei gruppi CONTROL e WILD.

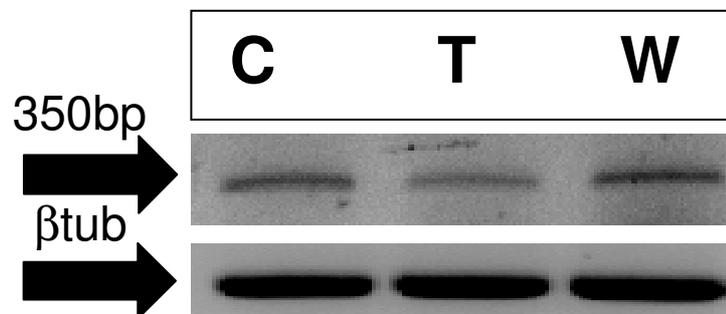


Figura 14. PCR semiquantitativa del gene Oct-elav1 sulle masse sopraesofagee degli animali CONTROL, TRAINED e WILD. Nella prima lane è stato caricato il prodotto di PCR derivato dalla reazione condotta su cDNA dell'animale appartenente al gruppo CONTROL (C). Nella seconda lane il prodotto di PCR derivato dalla reazione condotta su cDNA dell'animale appartenente al gruppo TRAINED (T). Nella terza lane il prodotto di PCR derivato dalla reazione condotta su cDNA dell'animale appartenente al gruppo WILD.

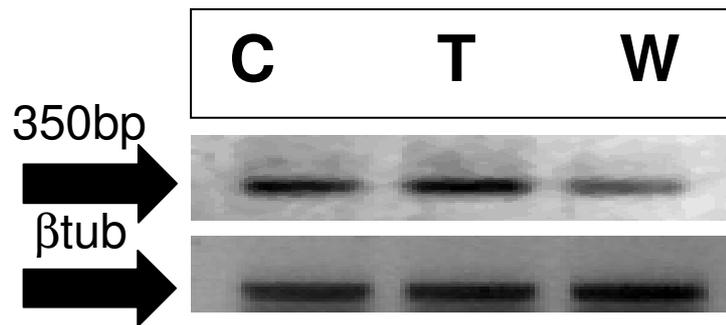


Figura 15. PCR semiquantitativa del Oct-elav1 sulle masse sottoesofagee degli animali CONTROL, TRAINED e WILD. Nella prima lane è stato caricato il prodotto di PCR derivato dalla reazione condotta su cDNA dell'animale appartenente al gruppo CONTROL (C). Nella seconda lane il prodotto di PCR derivato dalla reazione condotta su cDNA dell'animale appartenente al gruppo TRAINED (T). Nella terza lane il prodotto di PCR derivato dalla reazione condotta su cDNA dell'animale appartenente al gruppo WILD.

4.4.2. Real Time PCR

La Real Time PCR condotta sugli mRNA di Oct-elav1 estratti dal sistema nervoso degli animali appartenenti ai tre gruppi sperimentali ha mostrato che l'espressione di Oct-elav1 nella massa sopraesofagea degli animali appartenenti al gruppo TRAINED è minore rispetto all'espressione dello stesso gene nella massa sopraesofagea degli animali di gruppi CONTROL e WILD.

L'espressione di Oct-elav1 nella massa sottoesofagea degli animali appartenenti al gruppo TRAINED è maggiore rispetto all'espressione dello stesso gene nella massa sottoesofagea degli animali di gruppi CONTROL e WILD.

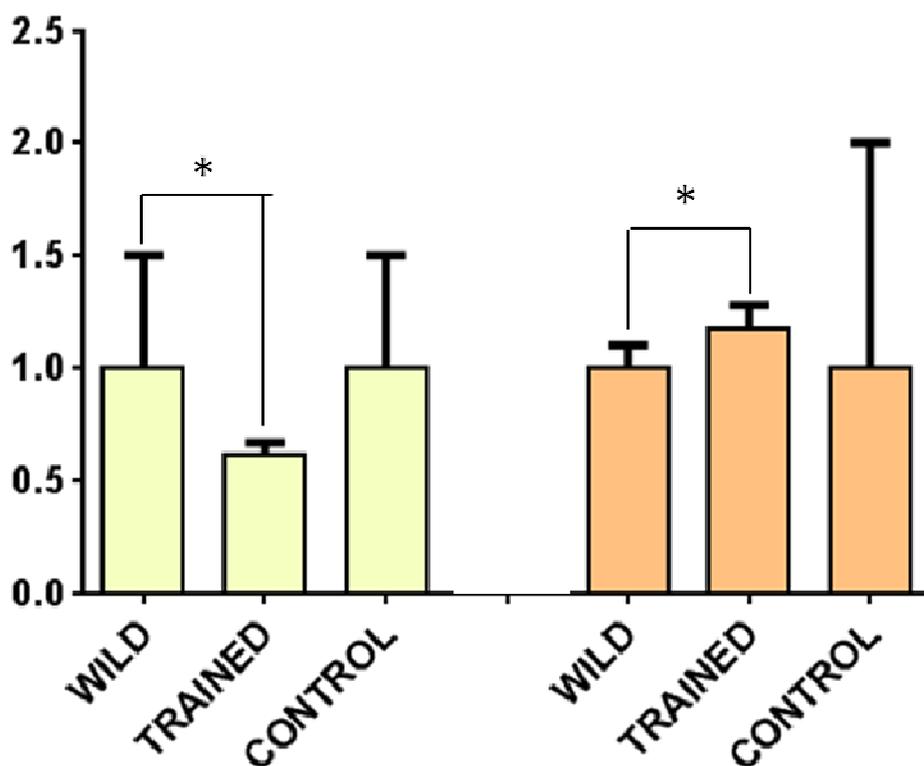


Grafico 4. Il grafico mostra una ridotta espressione del gene nella massa sopraesofagea (in giallo) degli animali del gruppo TRAINED rispetto agli animali dei gruppi CONTROL e WILD e un aumento dell' espressione nella massa sottoesofagea (in arancio) negli animali del gruppo TRAINED. (Pvalue<0,05).

4.4.3 Western blotting

Il western blotting condotto sugli estratti proteici totali sulle masse sopraesofagee dei polpi dei tre gruppi sperimentali ha mostrato un aumento dei livelli sia di PCNA che di PARP1 nella massa sopraesofagea degli animali del gruppo TRAINED rispetto agli animali dei due restanti gruppi, che mostrano dei livelli di proteina paragonabili tra loro.

La stessa analisi, condotta sugli estratti proteici totali dei lobi ottici dei tre gruppi sperimentali ha mostrato un aumento dei livelli sia di

PCNA che di PARP1 degli animali del gruppo TRAINED rispetto agli animali dei due restanti gruppi.

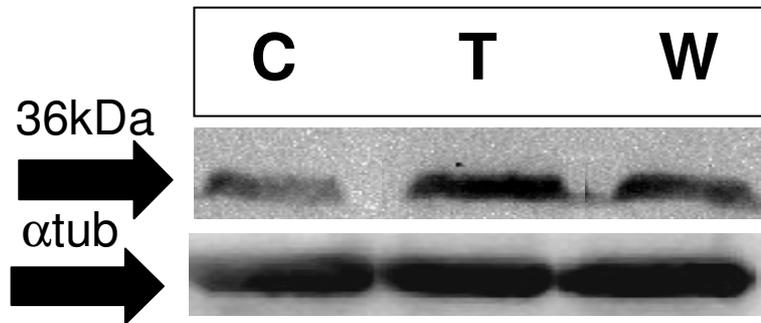


Figura 3. Western Blotting con anticorpo antiPCNA sugli estratti proteici totali derivati dalle masse sopraesofagee.

Nella prima lane è stato caricato l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo CONTROL, nella seconda lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo TRAINED, nella terza lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo WILD.



Figura 17. Western Blotting con anticorpo antiPCNA sugli estratti proteici totali derivati dai lobi ottici.

Nella prima lane è stato caricato l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo CONTROL, nella seconda lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo TRAINED, nella terza lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo WILD.



Figura 18. Western Blotting con anticorpo antiPARP1 sugli estratti proteici totali derivati dalle masse sopraesofagee.

Nella prima lane è stato caricato l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo CONTROL, nella seconda lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo TRAINED, nella terza lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo WILD.

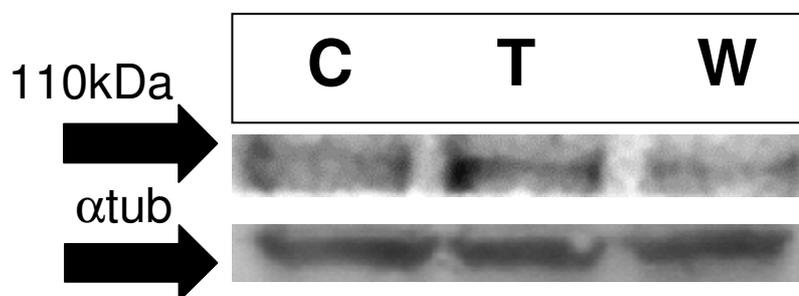


Figura 19. Western Blotting con anticorpo antiPARP1 sugli estratti proteici totali derivati dai lobi ottici.

Nella prima lane è stato caricato l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo CONTROL, nella seconda lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo TRAINED, nella terza lane l'estratto proteico totale dell'animale appartenente al gruppo WILD.

DISCUSSIONE

5. Discussione

Nel presente lavoro di tesi è stata mostrata, per la prima volta, la presenza della neurogenesi adulta nei Lofotrocozoi. Il sistema nervoso di *Octopus vulgaris* rappresenta un ottimo modello di studio del processo, in quanto mostra caratteristiche morfologiche e funzionali comparabili a quelle di insetti e mammiferi.

Infatti, il sistema frontale-verticale del polpo ha un'organizzazione simile a quella dei mushroom bodies degli insetti e dell'ippocampo dei mammiferi: tutti e tre i distretti nervosi presentano un arrangiamento strutturale caratterizzato da neuroni interconnessi da sinapsi ortogonali, detto matrix-like, ed organizzato in modo da contenere il maggior numero di cellule possibile (Hochner, 2009).

Le aree che mostrano proliferazione cellulare, positive all'anti-BrdU e all'anti-PCNA, sono localizzate:

- nella massa nervosa sopraesofagea, in particolare, nel sistema frontale-verticale, sede dell'elaborazione delle informazioni provenienti dall'ambiente e delle sofisticate capacità di apprendimento e memoria a breve e a lungo termine;
- nei lobi olfattori centri di integrazione degli stimoli olfattivi;
- nei lobi ottici, centri superiori di integrazione sensoriale (Young, 1978).

In *Octopus*, quindi, così come negli insetti e nei crostacei (Cayre et al., 2002), la neurogenesi sembra essere collegata alla stimolazione sensoriale e all'integrazione degli inputs provenienti dagli organi di

senso, come dimostra l'intensa attività mitotica dei neuroni nei lobi ottici e olfattori.

La presenza di proliferazione cellulare nelle aree del sistema frontale-verticale sembra invece supportare l'ipotesi che nel polpo, come negli uccelli e nei mammiferi (Grandel e Brand, 2012), esista un complesso meccanismo di riorganizzazione dei circuiti nervosi (plasticità) a sostegno dei sofisticati comportamenti esibiti da questo animale.

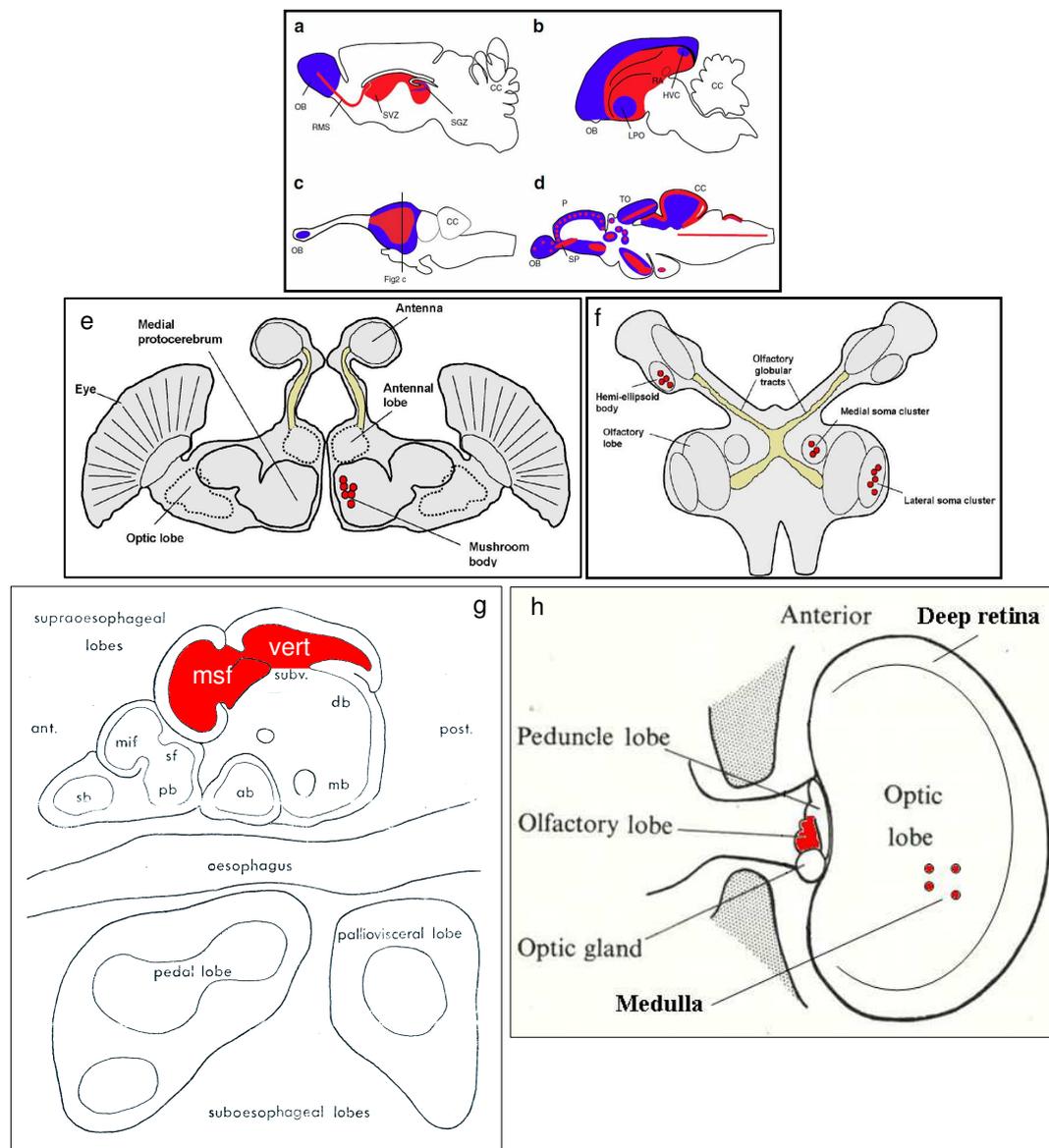


Figura 20. Comparazione tra le aree di neurogenesi dei sistemi nervosi di vertebrati (a. – d.), invertebrati (e. – f.) e *Octopus vulgaris* (g. – h.).

Schema di sezioni sagittali dei sistemi nervosi di: a. topo, B. uccello, c. rettile, d. pesce. In rosso le aree di proliferazione cellulare e in blu le vie di migrazione. CC. – corpus cerebelli; HVC. – centri vocali superiori; LPO. – lobo paraolfattorio; OB. – bulbo olfattorio; P. - pallium; RA. – nucleo robusto dell’archistriato; RMS. – via migratoria rostrale, SGZ. – zona sub granulare; SVZ. – zona subvetricolare; TO. – tetto ottico. Da Grandel e Brand, 2013.

e. Schema di sezione orizzontale del sistema nervoso degli insetti, f. schema di sezione orizzontale del sistema nervoso dei crostacei. In rosso le aree di neurogenesi adulta. Da Lindsey e Tropepe, 2006.

g. e h. Sistema nervoso di *Octopus vulgaris*. g. schema di sezione sagittale delle masse sopraesofagea e sottoesofagea, h. schema di sezione orizzontale del lobo ottico e dei lobi olfattori. In rosso sono evidenziate le aree in cui è stata riscontrata la neurogenesi adulta. ab. – basali anteriori; db. – basali dorsali; mb. – basali mediani; mif. – frontale inferiore mediano; msf. – frontale superiore mediano; pb. – boccale posteriore; sb. – boccale superiore; sf. – sub frontale, subv. – sub verticale; vert. – vertical. Ant. – anteriore, post. – posteriore.

Gli esperimenti comportamentali messi in atto nel corso dello studio ci hanno consentito, in primo luogo, di osservare che i polpi presentano “personalità” individuali (Mather, 1995), e che l’arricchimento dell’ambiente è un parametro che stimola la curiosità del polpo, che appare fortemente attratto dagli oggetti presentatigli e dai vari componenti della vasca (tubi di ingresso dell’acqua, sistemi di filtrazione, etc). L’animale non stimolato, inserito in un ambiente standard, di contro, mostra come unico comportamento la predazione, e trascorre la maggior parte del tempo in tana.

L’analisi dei comportamenti assunti dagli animali del gruppo TRAINED ci permette di evidenziare come, in seguito all’esperienza, l’animale, esaurisca l’istinto predatorio nei confronti dell’oggetto che gli viene sottoposto ed inizi ad esplorarlo incuriosito, fino ad giocarci per un breve tempo (Kuba et al., 2003, 2006).

Dall’osservazione dei comportamenti messi in atto dagli animali del gruppo TRAINED, inoltre, si evidenzia una spiccata individualità degli

esemplari: sebbene essi seguano lo stesso trend in cui, nei tre giorni di esperimento, il comportamento predatorio è sostituito da quello esploratorio e dal play-like, il numero di volte che vengono messi in atto i singoli comportamenti mostra un'elevata variabilità da un polpo all'altro.

La diminuzione del tempo impiegato per il "problem solving" indica come l'animale, in seguito all'esperienza, abbia imparato e ricordi come svitare i barattoli, all'interno dei quali sono visibili i mitili (Fiorito et al., 1998). Tutti gli esemplari del gruppo TRAINED hanno quindi mostrato una significativa diminuzione del tempo impiegato per aggirare l'ostacolo e quindi accedere alla preda.

Le analisi molecolari condotte sui cervelli degli esemplari appartenenti ai tre gruppi sperimentali ci permettono di mostrare come l'apprendimento e la memoria, meccanismi basati sulla plasticità, siano direttamente correlati con il fenomeno neurogenico. La presenza di PCNA, marker di proliferazione, e PARP1, marker di sinaptogenesi (De Lisa et al., 2012), negli animali dei gruppi CONTROL e WILD indica che la neurogenesi adulta è sempre presente a livello basale. L'aumento dei livelli di PCNA e di PARP1 nella massa sopraesofagea e nei lobi ottici ed olfattori dimostra come la stimolazione al "problem solving" e l'arricchimento dell'ambiente influenzino la neurogenesi adulta.

Questo consente di ipotizzare che il fenomeno neurogenico sia presente a livello basale nel sistema nervoso dell'organismo adulto, ma, in risposta ad un insieme di stimoli sensoriali ed "intellettivi", il

meccanismo si riattivi per incrementare la produzione di neuroni, la riorganizzazione dei circuiti nervosi e quindi la plasticità sinaptica.

Lo studio dell'espressione del gene Oct-elav1, inoltre, ci ha consentito di dimostrare che, in risposta agli stimoli, la neurogenesi adulta si riattiva ripercorrendo quanto avviene durante l'embriogenesi. In *S. officinalis*, infatti, è stata evidenziata una marcata espressione di Sof-elav1 nei lobi pallioviscerale e pedale, che rappresentano i centri motori inferiori, negli stadi iniziali di sviluppo embrionale, suggerendo che la maggioranza dei neuroni di queste aree escono dal ciclo cellulare e differenziano precocemente. Nei lobi cerebrali, coinvolti nelle facoltà cognitive più elevate, l'espressione del gene è evidenziata solo negli ultimi stadi dello sviluppo embrionale, permettendo così che le cellule mantengano le loro capacità proliferative più a lungo possibile e ritardino il differenziamento (Buresi et al., 2013).

La minore espressione di Oct-elav1 nella massa sopraesofagea rispetto alla massa sottoesofagea degli animali del gruppo TRAINED ci consente di ipotizzare che, nel momento in cui la neurogenesi adulta viene riattivata in seguito ad uno stimolo, nel sistema frontale-verticale si mantenga più a lungo uno stato indifferenziato, mentre nelle aree motorie si mantenga costante il differenziamento neuronale, così come avviene nella neurogenesi embrionale.

L'equilibrio tra proliferazione cellulare e differenziamento, nel sistema frontale-verticale, appare spostato verso la proliferazione allo scopo di mantenere una costante plasticità.

Concludendo, quindi, *Octopus vulgaris* presenta la neurogenesi adulta, così come tutti gli animali con sistema nervoso centralizzato che mostrano comportamenti complessi e sofisticati. Il fenomeno appare strettamente correlato a stimoli esterni, quali arricchimento dell'ambiente, stimolazione all'apprendimento e memoria. Infine, i geni della famiglia ELAV, oltre ad essere usati come markers negli studi di neurogenesi embrionale, sembrano essere degli ottimi candidati per seguire la proliferazione e il differenziamento cellulare, alla base del fenomeno della neurogenesi adulta.

BIBLIOGRAFIA

Roger T., Messenger J.B. Cephalopod behavior. 1996. Cambridge University Press

Jereb P., Roper C.F.E. Cephalopods of the world. 2010. FAO species catalogue for fisheries purposes. N.4, vol. 2. FAO, Rome, 348-369.

Pierce G. J., Allcock L., Bruno I., Bustamante P., González A., Guerra A., Jereb P., Lefkaditou E., Malham S., Moreno A., Pereira J., Piatkowski Uwe, Rasero M., Sánchez P., Santos B., Santurtún M., Seixas S. and Villanueva R. 2010. Cephalopod biology and fisheries in Europe ICES Cooperative Research Report.

Wells M. J. Octopus. 1978. Chapman and Hall, London.

Buresi A., Canali E., Bonnaud L., Baratte S. Delayed and asynchronous ganglionic maturation during cephalopod neurogenesis as evidenced by *Sof-elav1* expression in embryos of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). 2013. J Comp Neurol. 521(7):1482-96.

Villanueva R and Norman MD. 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 46:105-202.

Fiorito, G. and Gherardi, F. 1999. Prey-handling behaviour of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) on bivalve preys. Behavioural Processes. 46: 75-88.

De Lisa E, Salzano AM, Moccia F, Scaloni A, Di Cosmo A. Sperm-attractant peptide influences the spermatozoa swimming behavior in internal fertilization in *Octopus vulgaris*. 2013. *J Exp Biol.* 216(Pt 12):2229-37.

Robison B, Seibel B, Drazen J. Deep-sea octopus (*Graneledone boreopacifica*) conducts the longest-known egg-brooding period of any animal. 2014. *PLoS One.* 9(7):e103437.

Moroz LL. On the independent origins of complex brains and neurons. 2009. *Brain Behav Evol.* 74(3):177-90.

De Lisa E, Paolucci M, Di Cosmo A. Conservative nature of oestradiol signalling pathways in the brain lobes of *octopus vulgaris* involved in reproduction, learning and motor coordination. 2012. *J Neuroendocrinol.* 24(2):275-84.

Frank MG, Waldrop RH, Dumoulin M, Aton S, Boal JG. A preliminary analysis of sleep-like states in the cuttlefish *Sepia officinalis*. 2012. *PLoS One.* 7(6):e38125.

Norman, M. *Cephalopods A World Guide: Octopuses, Argonauts, Cuttlefish, Squid, and Nautilus.* Hackenheim, ConchBooks, 2003.

Buresch KC, Mäthger LM, Allen JJ, Bennice C, Smith N, Schram J, Chiao CC, Chubb C, Hanlon RT. The use of background matching vs. masquerade for camouflage in cuttlefish *Sepia officinalis*. 2011. *Vision Res.* 51(23-24):2362-8.

Grasso FW, Basil JA. The evolution of flexible behavioral repertoires in cephalopod molluscs. *Brain Behav Evol.* 2009;74(3):231-45.

Messenger JB. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. 2001. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 76(4):473-528.

Messenger JB. Learning performance and brain structure: a study in development. 1973. *Brain Research,* 58,519-523.

Di Cosmo A, Winlow W. *Neuroecology and Neuroethology in Molluscs: The Interface between Behaviour and Environment.* 2014. *Marine Biology.*

Piper D.R., Lucero M.T. Calcium signalling in squid olfactory receptor neurons. *Biol. Signals Recept.* 1999;8:329–337.

Polese G, Bertapelle C, Di Cosmo A. Role of olfaction in *Octopus vulgaris* reproduction. 2014. *Gen Comp Endocrinol.* 210:55-62.

Packard A. *Cephalopods and fish: the limits of convergence.* 1972. *Biol. Rev.*47:241–307.

Shigeno S, Ragsdale CW. The gyri of the octopus vertical lobe have distinct neurochemical identities. 2015. *J Comp Neurol.*

Young, J. Z. 1971. *The Anatomy of the Nervous System of Octopus vulgaris.* Clarendon Press, Oxford.

Hochner B, Shomrat T, Fiorito G. The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. 2006. *Biol Bull.* 210(3):308-17.

Zullo L, Sumbre G, Agnisola C, Flash T, Hochner B. Nonsomatotopic organization of the higher motor centers in octopus. 2009. *Curr Biol.* 19(19):1632-6.

Young, J. Z. 1963. The number and sizes of nerve cells in Octopus. *Proc. Zool. Soc. Lond.*140:229.

Mather, J. A. 1995. Cognition in cephalopods. *Adv. Study Behav.*24:317–353

Hochner B. Functional and comparative assessments of the octopus learning and memory system. 2010. *Front Biosci (Schol Ed).* 2:764-71.

Gray, E. G. 1970. The fine structure of the vertical lobe of octopus brain. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B258:379–394.

Young, J. Z. 1995. Multiple matrices in the memory system of octopus. Pp. 431–443 in *Cephalopod Neurobiology*, J.N. Abbott, R. Williamson, and L. Maddock, eds. Oxford University Press, Oxford.

Young, J. Z. 1991. Computation in the learning system of cephalopods. *Biol. Bull.*180:200–208.

Messenger JB. Two-stage recovery of a response in Sepia. 1971. Nature. 232(5307):202-3.

Di Cosmo A, Di Cristo C. Neuropeptidergic control of the optic gland of Octopus vulgaris: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. J Comp Neurol. 1998. 398(1):1-12.

A Di Cosmo, G Polese (2013). Molluscan Bioactive Peptides. In: Ron Nachaman. Handbook of Biologically Active Peptides. p. 276-286.

Mather JA. Cephalopod consciousness: behavioural evidence. 2008. Conscious Cogn. 17(1):37-48.

Kuba MJ, Byrne RA, Meisel DV, Mather JA. When do octopuses play? Effects of repeated testing, object type, age, and food deprivation on object play in Octopus vulgaris. 2006. J Comp Psychol. 120(3):184-90.

Kuba, M., Meisel, D. V., Byrne, R. A., Griebel, U., & Mather, J. A. (2003). Looking at play in Octopus vulgaris Berliner Palaontologische Abhandlungen, 3, 163–169.

Fiorito G, Biederman GB, Davey VA, Gherardi F. The role of stimulus preexposure in problem solving by Octopus vulgaris. 1998. Anim Cogn. 1(2):107-12.

Oliveira, A. F. S., Rossi, A. O., Silva, L. F. R., Lau, M. C., & Barreto, R. E. (2010). Play behaviour in nonhuman animals and the animal welfare issue. *Journal of ethology*, 28(1), 1-5.

Burghardt, G. M. (2005). *The genesis of animal play: Testing the limits*. MIT Press.

Di Cosmo A. *Developing Guidelines for cephalopods welfare: what we achieved until now?* Euroceph 2012.

Cayre M, Malaterre J, Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. 2002. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 132(1):1-15.

Lindsey BW, Tropepe V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. 2006. *Prog Neurobiol*. 80(6):281-307.

Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.

Braun SMG, Jessberger S (2014) Adult neurogenesis – mechanisms and functional significance. *Development* 141,1983-1986

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. 2001. *Nat Rev Neurosci.* 2(4):287-93.

Grandel, H., and Brand, M. (2013) Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates *Dev. Genes Evol.*223(1-2):131-147.

Schmidt M. Identification of putative neuroblasts at the base of adult neurogenesis in the olfactory midbrain of the spiny lobster, *Panulirus argus*. 2007. *J Comp Neurol.* 503(1):64-84.

Kaslin J, Ganz J, Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. 2008. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1489):101-22.

Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. 2012. *Dev Neurobiol.* 72(3):429-61.

Vellema M, van der Linden A, Gahr M. Area-specific migration and recruitment of new neurons in the adult songbird brain. 2010. *J Comp Neurol.* 518(9):1442-59.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. 2009. *Annu Rev Neurosci.* 32:149-84.

Grandel H, Brand M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev Genes Evol.* 2013 223(1-2):131-47.

Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. 2006. *Dev Biol.* 295(1):263-77.

Ganz J, Kaslin J, Hochmann S, Freudenreich D, Brand M. Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. *Glia.* 2010. 58(11):1345-63.

García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull.* 2002. 57(6):765-75.

Font E, Desfilis E, Pérez-Cañellas MM, García-Verdugo JM. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav Evol.* 2001;58(5):276-95.

Rothenaigner I, Krecsmarik M, Hayes JA, Bahn B, Lepier A, Fortin G, Götz M, Jagasia R, Bally-Cuif L. Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development.* 2011. 138(8):1459-69.

D'Amico LA, Boujard D, Coumailleau P. The neurogenic factor NeuroD1 is expressed in post-mitotic cells during juvenile and adult

Xenopus neurogenesis and not in progenitor or radial glial cells. PLoS One. 2013. 8(6):e66487.

Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. 1983. Proc Natl Acad Sci U S A. 80(8):2390-4.

Ling C, Zuo M, Alvarez-Buylla A, Cheng MF. Neurogenesis in juvenile and adult ring doves. 1997. J Comp Neurol. 379(2):300-12.

Alvarez-Buylla A, Ling CY, Nottebohm F. High vocal center growth and its relation to neurogenesis, neuronal replacement and song acquisition in juvenile canaries. 1992. J Neurobiol. 23(4):396-406.

Alvarez-Buylla A, Kirn JR. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. 1997. J Neurobiol. 33(5):585-601.

Adar, E., Nottebohm, F., Barnea, A. 2008. The relationship between nature of social change, age and position of new neurons and their survival in adult zebra finch brain. J. Neurosci. 28:5394–5400.

Jessberger S, Gage FH. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans. 2014. Trends Cell Biol. 24(10):558-63.

Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. 2014. Physiol Rev. 94(4):991-1026.

Yao J, Mu Y, Gage FH. Neural stem cells: mechanisms and modeling. 2012. *Protein Cell*. 3(7):559.

Cayre M, Scotto-Lomassese S, Malaterre J, Strambi C, Strambi A. Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: contribution from an insect model, the house cricket. 2007. *Chem Senses*. 32(4):385-95.

Cayre M, Malaterre J, Charpin P, Strambi C, Strambi A. Fate of neuroblast progeny during postembryonic development of mushroom bodies in the house cricket, *Acheta domesticus*. 2000. *J Insect Physiol*. 46(3):313-319.

Cayre M, Strambi C, Charpin P, Augier R, Meyer MR, Edwards JS, Strambi A. Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. 1996. *J Comp Neurol*. 371(2):300-10.