

Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE
SETTORE DISCIPLINARE BIO/09
CICLO XXIV

**Distribuzione e analisi funzionale
dei neuromodulatori in *Octopus vulgaris***

Dott.ssa Giovanna Ponte

Tutor

Dr. GRAZIANO FIORITO



Coordinatore del Dottorato

Ch.ma Prof.ssa MARIA CARMELA CERRA



ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Tabella dei contenuti

Introduzione	pag. 5
Materiali e Metodi	pag. 37
Risultati e Discussione	pag. 50
Bibliografia	pag. 67
Appendici	pag. 91

Abstract

In this thesis I analyze through immunohistochemistry and in situ hybridization experiments the pattern of distribution of biogenic amines in the brain of the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*.

The data show that dopamine, noradrenaline and octopamine are not ubiquitous in the brain, as considered before, and that a division of labour between visual and tactile processing system exists.

These data largely revise previous available knowledge and for the first time depict the distribution of octopamine in the brain of the octopus. This despite this molecule has been for the first time discovered in the salivary gland of this animal more than 100 years ago.

Introduzione

I cefalopodi sono esempio di “animali da laboratorio” un po’ speciali. Ciò grazie alla loro posizione filogenetica e alla estrema ricchezza del repertorio comportamentale. Costituiscono una ben differenziata classe del phylum Mollusca (clade Lophotrochozoa, Halanych et al 1995, Edgecombe et al 2001; si veda anche: Haase et al 2001; Ponte et al 2011), che comprende più di 700 species viventi (Sweeney and Roper, 1998). Esse sono distribuite nei mari di tutto il mondo e nella gran parte di habitat marini. I cefalopodi sono tutti predatori che si sono evoluti nel corso del Cambriano (~530 Ma) probabilmente a partire da monoplacophoro ancestrale. La conchiglia conica si è modificata a formare un apparato concamerato ‘disegnato’ a facilitare la galleggiabilità. Circa 100 Ma dopo (medio-Paleozoico) compaiono le forme attuali, i.e. nautiloidi and coleoidi. Il Nautilus (tutte specie pelagiche) possiede ancora una conchiglia esterna; nei coleoidi questa si è ‘internalizzata’ e ridotta a partire dall’ossio di seppia fino a una forma molto primitiva e ridotta: la conchiglia vestigiale di polpi. La riduzione della conchiglia riflette la tendenza verso uno stile di vita più attivo e l’acquisizione di comportamenti complessi (Denton, 1974; Denton and Gilpin-Brown, 1973; Clarke, 1988a,b; Kroger et al 2011).

Recenti ritrovamenti hanno reinterpretato la posizione ‘basale’ dei nautiloidi nella filogenesi dei cefalopodi moderni. Smith and Caron (2010) hanno infatti scoperto i Nectocarididae, forme primitive non-mineralizzate di cefalopodi caratterizzati da un paio di branchie, pinne laterali, un paio di lunghi tentacoli, occhi pedicellati, e un grande sifone anteriore che doveva consentire la propulsione a getto. Tali forme sono state datate a circa 520 Ma, quindi ben prima della datazione ritenuta l’emergenza nel corso dell’evoluzione dei nautiloidi.

I coleoidi moderni sono considerati per molte caratteristiche simili ai pesci e

quindi esempio di evoluzione convergente. La competizione per “spazi” e risorse tra cefalopodi e vertebrate è considerata la causa della pressione selettiva operata nel corso dell’evoluzione che ha prodotto la varietà di stili di vita e adattamenti del taxon (Packard, 1972). Essa rappresenta il fattore alla base delle modificazioni occorse nel Bauplan dei molluschi (e della classe) che hanno portato all’unicità di morfologia, fisiologia, sistema nervoso, comportamento ed ecologia dei cefalopodi coleoidi (Packard 1972; si veda anche per un’ipotesi alternativa Aronson, 1991).

Non è negli scopi di questa introduzione passare in rassegna la letteratura disponibile sull’evoluzione dei cefalopodi, i loro adattamenti e il ruolo avuto dai vertebrate nella loro filogenesi. Tuttavia vale la pena di ricordare il dibattito tra Cuvier e Geoffroy St-Hilaire (Packard, 1972). Geoffroy St-Hilaire incluse un’illustrazione raffigurante un cefalopode e un quadrupede in “Principle of Unity of Composition”. Ciò indusse Cuvier ad arguire che parti del corpo di animali diversi dovrebbero essere considerati per la funzione e il ruolo che la specie ha in natura. Successivamente un asse “coronario-hypophyseal” fu indicato come evidenza della convergenza tra cefalopodi e vertebrati. In anni più recenti, il grafico che illustra la relazione tra taglia relativa del cervello in relazione alla taglia corporea in cefalopodi e vertebrate (Packard, 1972) è certamente l’esempio più citato di tale convergenza e della straordinarietà dei cefalopodi.

Tuttavia, I cefalopodi non sono pesci, ma molluschi. Essi sono modelli emergenti per studi in biologia, genomica, neuroscienze, cognitivismo e robotica (Borrelli and Fiorito, 2008; Edelman and Seth, 2009; Albertin et al., 2012; Laschi et al., 2012; Margheri et al., 2012; Mazzolai et al., 2012). Molti esempi della complessità dei cefalopodi sono disponibili; tra essi vanno annoverati:

- I. Le capacità locomotorie che includono la propulsione a getto, il bipedalismo e il “tip-toeing” (Huffard et al., 2005; Finn et al., 2009);
- II. La capacità di cambiamenti attivi del “body patterning” coinvolti nel mimetismo, polifenismo, comunicazione anche basata su canali ‘nascosti’ (Mathger et al., 2009; Wardill et al., 2012; per una review vedi anche Borrelli et al., 2006);

- III. Capacità di apprendimento (review in Hanlon and Messenger, 1996; Borrelli and Fiorito, 2008);
- IV. Caratteristiche peculiari della fisiologia, del sistema nervosa e del comportamento con particolare riguardo al controllo motorio delle braccia (nel polpo), un esempio di “embodied intelligence” (Hochner, 2012).

E' tale complessità e la forte analogia con i vertebrati che ha probabilmente fornito la base per l'inclusione dell'intera classe nella lista di specie incluse nella Direttiva 2010/63/EU, soli tra gli invertebrati (Directive 2010/63/EU).

Il sistema nervoso del polpo e il suo ‘funzionamento’

Cambiamenti drammatici nel corso dell'evoluzione hanno caratterizzato il ‘body plan’ dei molluschi, inclusa la morfologia del sistema nervoso (Kandel, 1979; Lee et al., 2003). Molte variazioni sul tema sia in complessità che numero di cellule sono riconoscibili nel phylum (Bullock, 1965a,b,c,d). Tale complessità raggiunge il suo livello più elevato nei cefalopodi. I gangli si fondono a formare “cervelli” la cui grandezza (relative alla taglia corporea) è comparabile a quella del cervello dei vertebrati superiori (Packard, 1972). In questi ‘grossi cervelli’ trovano posto circa 200 milioni di cellule (per octopus: Young, 1963).

Nei cefalopodi i gangli che formano il sistema nervosa centrale sono considerati omologhi a quelli dei gastropodi (labiale, buccale, cerebrale, pedale, pleurale, viscerale). Nei cefalopodi essi si fondono e raccolgono attorno al margine anteriore dell'esofago (Fig. 1.1) per l'accorciamento dei tratti connettivi. Sono riconoscibili tre parti: le masse sopra- e sottoesofagee e i lobi ottici (ai lati degli occhi).

Ciò consente ai cefalopodi di raggiungere il più alto grado di centralizzazione tra i molluschi, comparabile solo a pochi altri invertebrati. Tale sistema nervoso continua a mantenere i principi di organizzazione tipici degli invertebrati: strati di cellule esterne disposte intorno al neuropilo.

La morfologia, neuroanatomia ed organizzazione del cervello dei cefalopodi è stata descritta con grande accuratezza (Young, 1971; review in Nixon and Young,

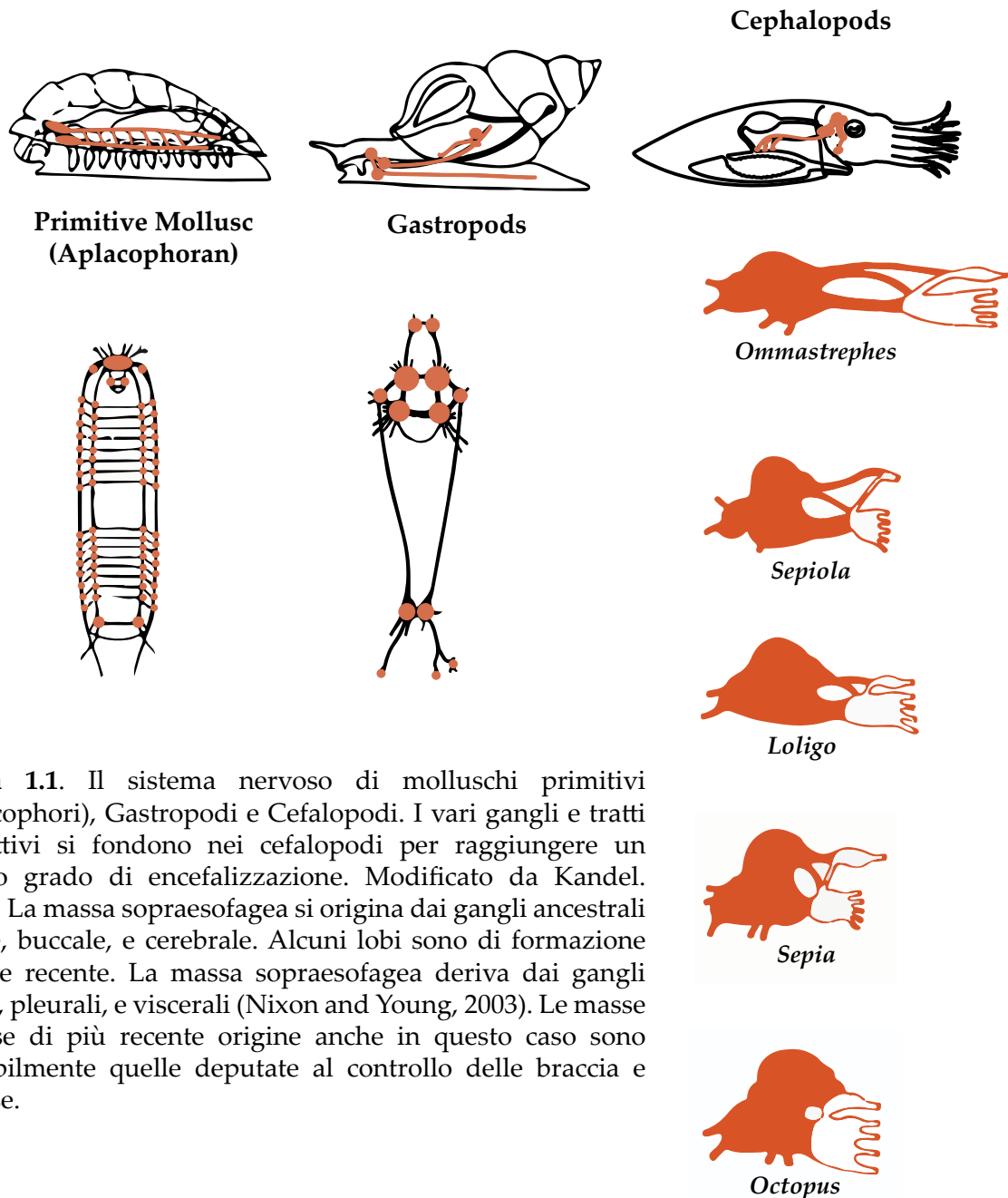


Figura 1.1. Il sistema nervoso di molluschi primitivi (Aplacophori), Gastropodi e Cefalopodi. I vari gangli e tratti connettivi si fondono nei cefalopodi per raggiungere un elevato grado di encefalizzazione. Modificato da Kandel. (1979). La massa sopraesofagea si origina dai gangli ancestrali labiale, buccale, e cerebrale. Alcuni lobi sono di formazione neurale recente. La massa sopraesofagea deriva dai gangli pedali, pleurali, e viscerali (Nixon and Young, 2003). Le masse nervose di più recente origine anche in questo caso sono probabilmente quelle deputate al controllo delle braccia e ventose.

2003). Il sistema nervoso centrale dei cefalopodi è caratterizzato da una significativa diversificazione in 'cerebrotipi'. Questa sembra essere correlata alle differenze specie-specifiche relative gli habitat occupati all'interno dell'ambiente marino (Nixon and Young, 2003; Borrelli, 2007; Grasso and Basil, 2009). Gli octopodi e i decapodi ad esempio, differiscono marcatamente a livello dei lobi brachiali e frontali inferiori; a causa dello stile di vita bentonico e delle peculiari caratteristiche del sistema sensoriale tattile, queste regioni infatti, hanno dimensioni maggiori nei primi. Le dimensioni relative e la morfologia generale del lobo verticale inoltre, rappresentano un esempio ancora più evidente dell'elevata variabilità

interspecifica esibita da queste specie (Nixon and Young, 2003).

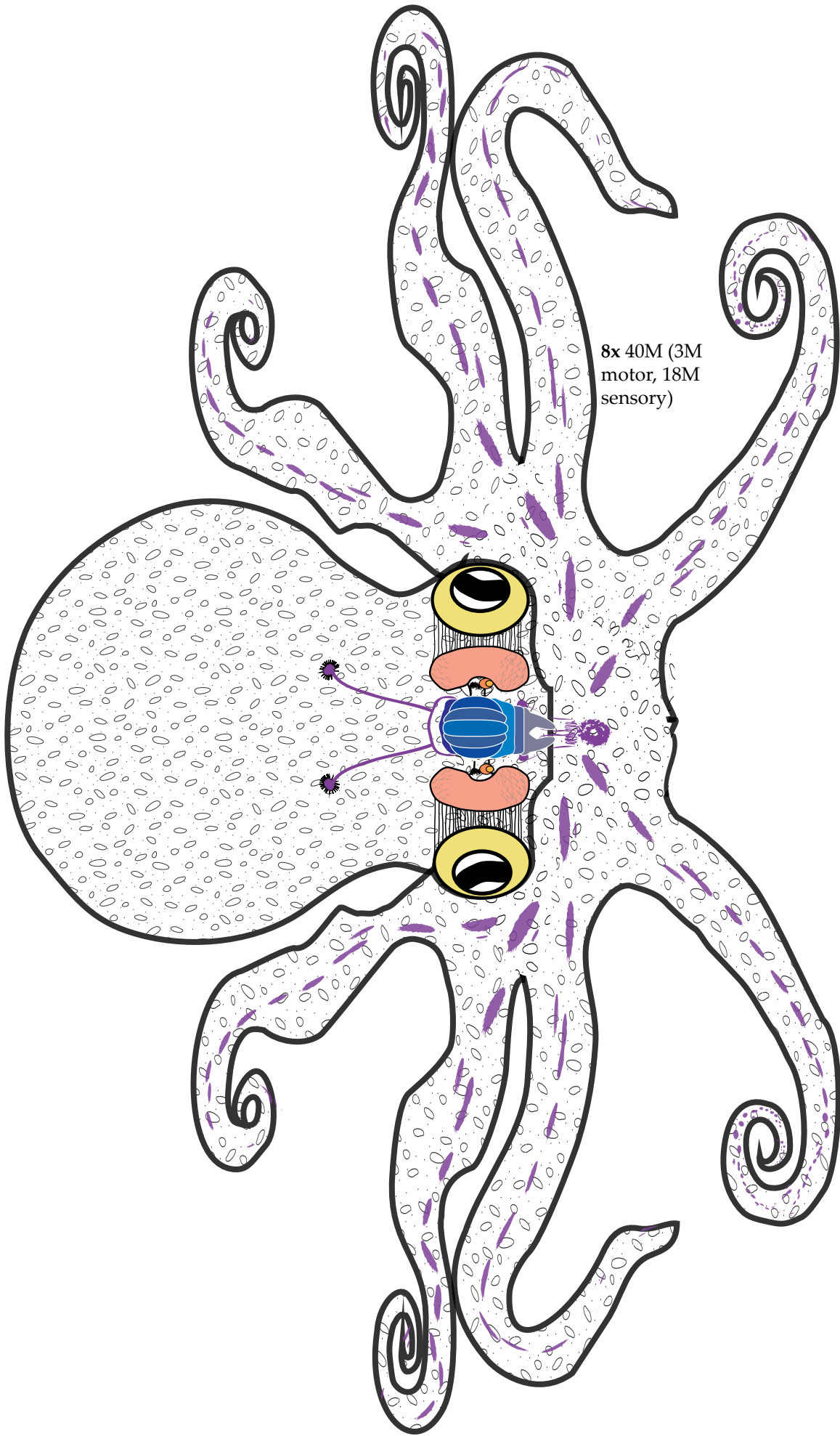
Se da un lato le preparazioni di sistema nervoso 'periferico' di cefalopode hanno significativamente contribuito al progresso delle neuroscienze (es. assone gigante), il 'cervello' è stato analizzato a fondo al fine di individuare e comprendere le basi neurali che regolano la plasticità della risposta comportamentale e dell'apprendimento (review in: Young 1991, 1995; Hochner et al., 2006; Borrelli & Fiorito, 2008).

Nella sua descrizione più essenziale, il sistema nervoso del polpo può essere riassunto come un sistema costituito da tre componenti (Fig. 1.2):

- i. un cervello centrale circondato da una capsula cartilaginea (il 'cranio') e composto da due masse: sopra- e sotto-esofagea, rispettivamente situate in posizione dorsale e ventrale rispetto all'esofago (vedere sotto);
- ii. due grandi lobi ottici: situati uno per ogni lato e connessi alla retina della camera oculare a alla massa sopra-esofagea;
- iii. il sistema nervoso periferico, che ha la sua maggiore rappresentazione nel sistema nervoso del braccio, dato che quest'ultimo contiene circa i due terzi delle cellule nervose in possesso dal polpo (Young, 1963).

Le masse del cervello dei cefalopodi decapodi e octopodi, sono rappresentate da un aggregato di lobi circum-esofagei (es. gangli o elementi ad esse appartenenti). Una caratterizzazione schematica del sistema nervoso del polpo confrontato con quello di altre specie di decapodi è mostrata nella Tabella 1.1; sono fornite inoltre anche informazioni relative alle funzioni attribuite ai vari lobi.

La descrizione che segue è incentrata su *Octopus vulgaris* con qualche accenno alle altre specie. La Fig. 1.3 fornisce anche una rappresentazione del piano generale del cervello del polpo. La descrizione qui inclusa è accompagnata da 15 tavole (Appendice 1). la descrizione fornita è basata sull'opera "The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*" di J.Z. Young (1971) e altri lavori, (principalmente Young, 1963).



8x 40M (3M motor, 18M sensory)

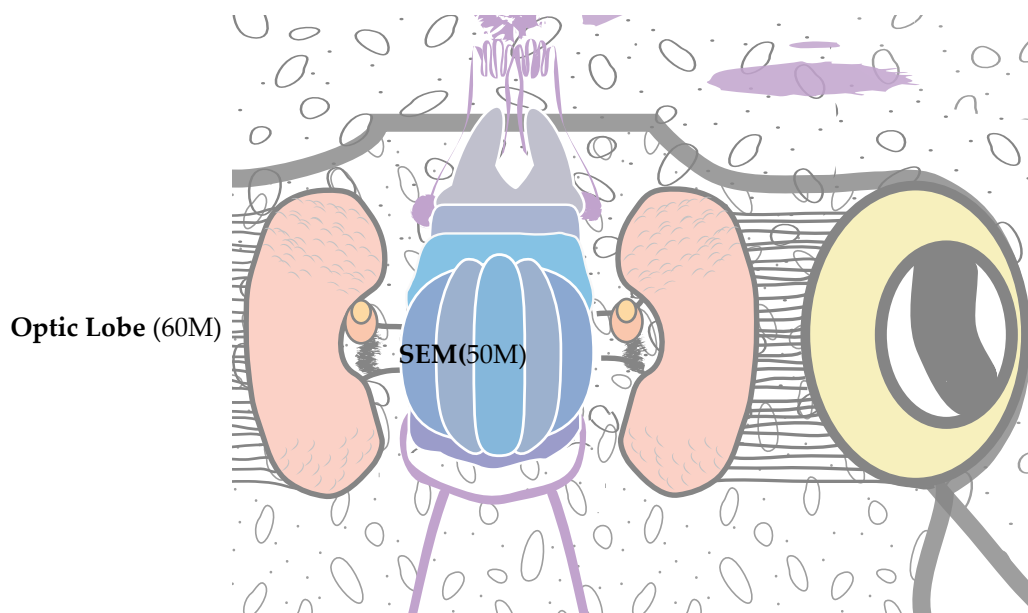


Figura 1.2. (a fronte) Il polpo e l'organizzazione e posizione relativa dei costituenti del sistema nervoso. In alto, un dettaglio per evidenziare le parti che costituiscono il "cervello" (si veda il testo per dettagli). E' fornita indicazione di massima del numero stimato di neuroni (in parentesi). SEM: massa sopraesofagea.

Il cervello di *O. vulgaris* è racchiuso in un cranio cartilagineo (l'equivalente del teschio) che svolge un ruolo di protezione del tessuto nervoso. La cavità interna creata dal cranio cartilagineo è quasi completamente occupata dal cervello, con la sola eccezione della massa sopra-esofagea che si proietta nella parte dorsale del cranio, lasciando in questo modo uno spazio circostante libero (circa il 60%), che è riempito da una matrice gelatinosa e translucida. L'analisi sonografica di questo spazio risulta completamente nera (ipo-ecogena; Grimaldi et al., 2007).

Tabella 1.1 - Schematizzazione delle parti costituenti il sistema nervoso centrale dei cefalopodi e le possibili analogie di queste strutture con i gangli “ancestrali” tipici dei molluschi. Sono indicate anche le funzioni dei diversi lobi. L'elencazione procede in ordine antero-posteriore, dal dorsale al ventrale secondo Young (1971). I lobi ottici sono qui considerati una estensione della massa sopraesofagea. Riferimento per l'inclusione di informazioni nella tabella sono i lavori di Young (1971, 1974, 1976, 1977a, 1979), Bullock (1965) e per le funzioni: Young (1971), Wells (1978), Nixon & Young, (2003). Per facilità ed uniformità espositiva la tabella è in inglese anche per la standardizzazione delle informazioni a seguito dell'applicazione della Direttiva 63/2010/EU.

Lobes	Decapods		Octopods		Function
	✓	✓	✓	✓	
I. Supraoesophageal mass					
Optic lobes	✓	✓	✓	New ganglia associated with orbit	Visual analysis and learning
Peduncle lobe	✓	✓	✓	New ganglia associated with orbit	Part of motor control system, coordinates motor activity, colour changes and ink-ejection
Olfactory lobe	✓	✓	✓	New ganglia associated with orbit	Part of motor control system, coordinates motor activity, colour changes and ink-ejection [?]
Optic gland	✓	✓	✓	Probably of nervous origin	Endocrine function
Subradular ganglia	✓	✓	✓	Ancestral buccal and labial ganglia [?]	Control of movement of the buccal apparatus (<i>i.e.</i> jaws, radula, palps) [?]
Inferior buccal ganglia = true buccal	✓	✓	✓	Ancestral buccal and labial ganglia	Contribution to the movement of beak and radula in feeding
Superior buccal lobe = old labial	✓	✓	✓	Ancestral buccal and labial ganglia	Motor control of feeding
Inferior frontal lobe system					
Lateral inferior frontal lobes	✓	✓	✓	Ancestral cerebral ganglion	Closely inter-related lobes which together form a functional system concerned with chemotactile information from arms

Tabella 1.1 - continua

Lobes	Decapods		Function
	Decapods	Octopods	
I. Supraoesophageal mass - continued			
Median inferior frontal lobe	✓	✓	Closely inter-related lobes which together form a functional system concerned with chemotactile information from arms
Posterior buccal lobes	✓	✓	Closely inter-related lobes which together form a functional system concerned with chemotactile information from arms
Subfrontal lobes	✓	✓	Closely inter-related lobes which together form a functional system concerned with chemotactile information from arms
Superior frontal-vertical lobe system			
Superior frontal lobe	✓	✓	Regulation of exploratory and learning behaviour and memory
Median and paired lateral superior frontal lobes	✓		
Anterior and posterior superior frontal lobes	✓		
Vertical lobe	✓	✓	Regulation of exploratory and learning behaviour and memory
Subvertical lobe	✓	✓	Regulation of exploratory and learning behaviour and memory

Tabella 1.1 - continua

Lobes	Decapods		Function
	Octopods	Origin	
I. Supraoesophageal mass - continued			
Basal lobe system			
Anterior basal lobe	✓	✓ Ancestral cerebral ganglion	Control of posture and movement of head and eyes, control of movements related to feeding
Precommissural lobe	✓	✓ Ancestral cerebral ganglion	Considered as the main output channel of the vertical lobe system
Dorsal basal lobe	✓	✓ Ancestral cerebral ganglion	Probably controls actions of defence and avoidance
Subpedunculate lobe	✓	✓ Probably of nervous origin	Neurosecretion, sexual maturity [?]
Median basal lobe	✓	✓ Ancestral cerebral ganglion	Concerned in institution and control of movements of funnel and mantle
Interbasal lobe	✓	✓ Ancestral cerebral ganglion	Dubbia (<i>sensu</i> Young, 1971)
Lateral basal lobes	✓	✓ Ancestral cerebral ganglion	Control of chromatophores and muscle of skin
II. Perioesophageal mass			
Magnocellular lobe	✓	✓ Ancestral pleural and visceral ganglia	Intermediate motor centre between supraoesophageal higher and suboesophageal lower motor centres; involved in defence and fast escape reactions. In Decabranchia the giant fibre system originates here

Tabella 1.1 - continua

Lobes	Decapods		Origin	Function
	✓	✓		
III. Suboesophageal mass Anterior suboesophageal mass = Brachial ganglion	✓	✓	New ganglia associated with arms	Actions of arms and suckers
Prebrachial lobe	✓	✓	New ganglia associated with arms	Actions of arms and suckers
Postbrachial lobe Middle suboesophageal mass = Pedal ganglion	✓	✓	Ancestral pedal ganglion	Intermediate and lower motor centres involved in most actions of animal
Anterior pedal lobe	✓	✓	Ancestral pedal ganglion	Colour changes of head and arms, textural changes
Anterior chromatophore lobes	✓	✓	Ancestral pedal ganglion	Intermediate and lower motor centres involved in most actions of animal
Lateral pedal lobes	✓	✓	Ancestral pedal ganglion	Intermediate and lower motor centres involved in most actions of animal
Posterior pedal lobe Posterior suboesophageal mass = Palliovisceral ganglion	✓	✓	Ancestral pedal ganglion	Intermediate and lower motor centres involved in most actions of animal
Palliovisceral lobe	✓	✓	Ancestral pleural and visceral ganglia	Actions of mantle and some of those of the viscera
Posterior chromatophore lobes	✓	✓	Ancestral pleural and visceral ganglia	Colour changes of fins and mantle, textural changes
Fin lobe	✓	✓	Ancestral pleural and visceral ganglia	Movements of fins
Vasomotor lobes	✓	✓	Ancestral pleural and visceral ganglia	Control of blood vessels

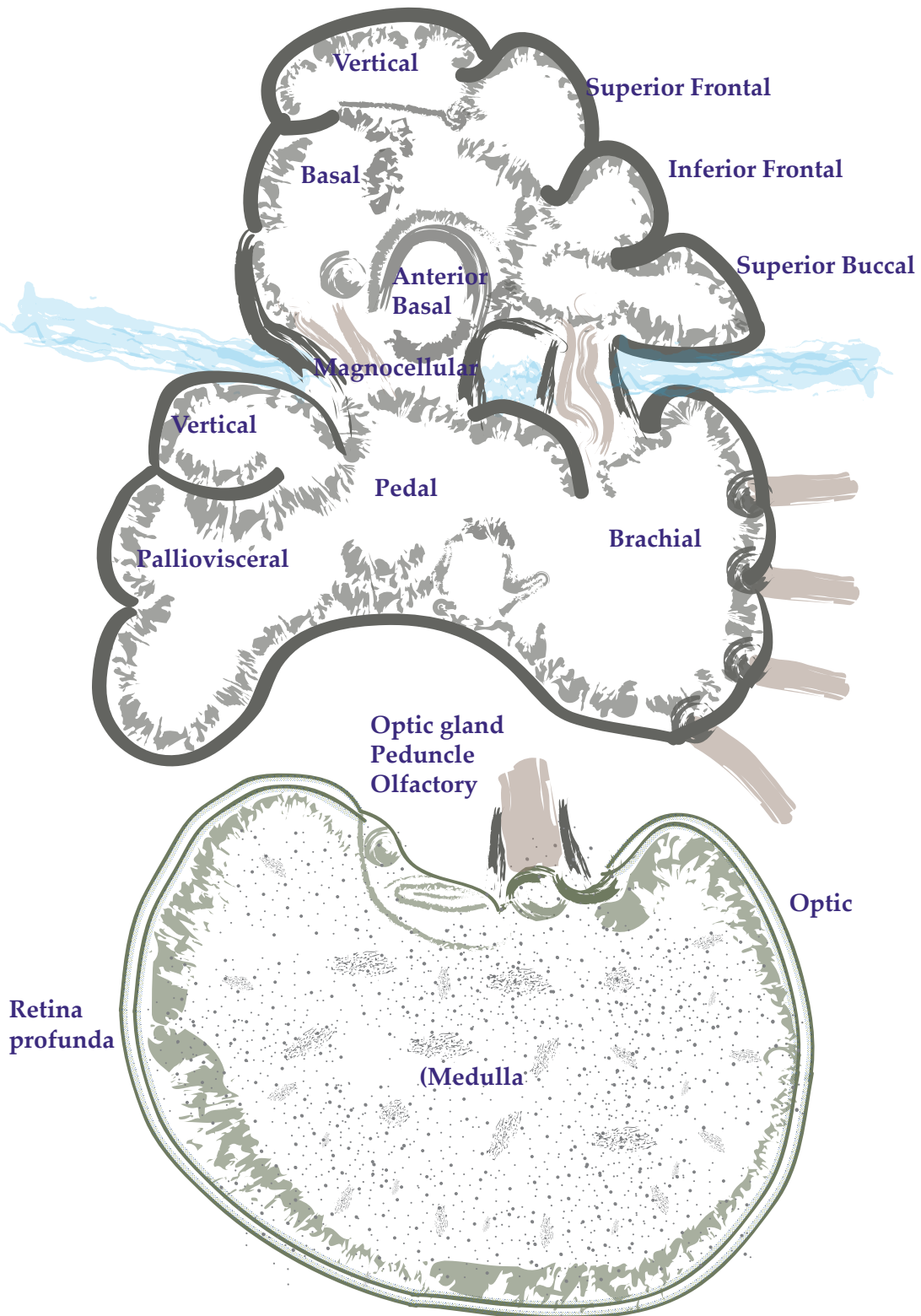


Figura 1.3. Il cervello del polpo in una sezione parasagittale (modificata ad evidenziare strutture diverse. I lobi e i loro limiti sono anche evidenziati. La denominazione è fornita solo per i lobi principali.

La massa sopra-esofagea (SEM) è composta da molti lobi.

Il lobo boccale superiore (quello situato nella regione più anteriore della SEM) è composto da 150×10^3 cellule, con dimensioni di circa $5 - 10 \mu\text{m}$; Young (1963), osserva che tra le peculiarità di questa regione c'è quella di ospitare un elevato numero di cellule con dimensioni maggiori di $10 \mu\text{m}$; alcune di esse possono raggiungere anche i $20 \mu\text{m}$. La parte posteriore del lobo boccale è strettamente connessa al lobo frontale inferiore (1085×10^3 cells), un centro di elaborazione delle informazioni chemiotattili. Il lobo è classicamente diviso nei lobi frontale inferiore laterale, frontale inferiore mediale e sotto-frontale. Queste tre parti si differenziano notevolmente tra loro. La parte mediale del lobo frontale inferiore presenta un grande neuropilo e un sottile strato di piccole cellule ($< 5 \mu\text{m}$; mentre solo una piccola frazione di cellule ha dimensioni maggiori: $5 - 20 \mu\text{m}$). Il lobo frontale inferiore laterale è composto da molte piccole cellule ($< 5 \mu\text{m}$) e da alcuni grandi neuroni (fino a $20 \mu\text{m}$). Il lobo sotto-frontale è in larga parte formato da cellule estremamente piccole (diametro nucleare inferiore a $3 \mu\text{m}$) che vanno a costituire masse dense; disperse nelle pareti di questo lobo ci sono cellule i cui nuclei raggiungono anche i $20 \mu\text{m}$.

Nel lobo frontale superiore (1772×10^3 cells) possono facilmente essere individuate due regioni: il lobo frontale superiore laterale e quello mediale. Il primo è composto circa per metà, da cellule con diametro inferiore a $5 \mu\text{m}$ (le restanti hanno invece dimensioni di $5 - 10 \mu\text{m}$); il lobo frontale superiore mediale ospita piccole cellule (circa $4 \mu\text{m}$ di diametro).

Il lobo verticale è la struttura più dorsale ed allungata della SEM. Esso è suddiviso in cinque giri (o lobuli; Fig. 1.2), che hanno una forma cilindrica e che si proiettano lungo l'asse antero-posteriore della struttura. Ogni 'cilindro' presenta un neuropilo circondato da una parete cellulare e in cui sono dispersi i corpi cellulari. L'intero lobo è composto da circa 10^6 cellule; l'elevato numero è rappresentato da piccole cellule: amacrine, le più piccole del cervello del polpo ($3 \mu\text{m}$ di diametro). È stato osservato anche un minor numero di cellule con diametro nucleare pari a $5 - 10 \mu\text{m}$. Contrariamente agli altri lobi, il pattern di distribuzione cellulare nel caso di questa struttura prevede che le cellule più grandi siano più prossime al neuropilo.

Anche l'ultrastruttura del lobo verticale è stata descritta (vedere sotto).

Al di sotto del lobo verticale è presente una struttura (lobo sotto-verticale, 810 x 103 cells) che si estende tra il lobo verticale, il frontale superiore e quello basale (ventrale). Questo è caratterizzato dalla presenza di una parete che è piegata in più regioni a formare gruppi isolati di cellule. Molte cellule hanno diametro inferiore a 5 µm, e poche di esse superano i 10 µm. Entrambi i versanti del lobo sotto-verticale ospitano cellule con diametro di 5 – 10 µm; allo stesso tempo in queste regioni sono presenti i neuroni più grandi della massa sopra-esofagea (i.e. 25 µm).

Al centro della massa sopraesofagea e sotto il lobo sotto-verticale, giace una struttura formata da un elevato numero di fibre: il lobo pre-commissurale (78 x 103 cells), considerato come il punto di incontro di numerosi sistemi di fibre. Questo è caratterizzato da un ridotto numero di strati cellulari, principalmente di piccole dimensioni (< 5 µm), in proporzioni simili da cellule intermedie (5 – 10 µm) e da alcune di elevate dimensioni (es. circa 1000 cellule, 10 – 15 µm). Il loro neuropilo è in continuità con il soprastante lobo sotto-verticale.

In posizione più ventrale rispetto alla massa sopra-esofagea, sono situati una serie di lobi appartenenti al sistema del lobo basale. Questo è il centro più alto del motore. Il sistema è caratterizzato da numerose strutture (sei lobi o parti) con cellule di dimensioni diverse e distribuite in strati o disperse all'interno del neuropilo (Tabella 1.2).

Tabella 1.2. Numero ($\times 10^3$) e dimensione delle cellule (µm) nelle diverse regioni del lobo basale di *O. vulgaris* (Young, 1963; 1971). Per uniformità descrittiva le strutture sono indicate in inglese.

		< 5	5-10	10-15
Anterior basal	(380)			
	dorsal			
	medial			
	ventral			
Dorsal basal	(2,000)			
	anterior			
	Posterior			
Subpedunculate				
Medial basal	(245)			
	Dorsal			
	ventral			
Interbasal	(57)			
Lateral basal	(127)			

All'esterno del cranio e su ogni lato della testa, ci sono le più grandi strutture lobulari dell'intero sistema nervoso, es. i lobi ottici. Questi contengono circa $92,000 \times 10^3$ cellule e rappresentano circa il 45% del volume totale del cervello del polpo (Nixon and Young, 2003). I lobi ottici sono caratterizzati dalla presenza di una corteccia più esterna e da una medulla centrale. La corteccia è composta da strati più esterni e più interni di cellule granulari separate da uno strato plessiforme (es. neuropilo). Questi strati contengono cellule più piccole di $5 \mu\text{m}$, e cellule di dimensioni intermedie ($5 - 10 \mu\text{m}$). Le cellule più piccole sono situate immediatamente al di sotto del neuropilo, quelle più grandi invece si trovano a maggiore distanza da questo. Nella regione centrale del lobo sono presenti raggruppamenti di cellule nervose e piccole cellule sparse. Le descrizioni di ultrastruttura e connessioni all'interno del lobo ottico sono disponibili in letteratura (Dilly et al., 1963; Saidel, 1982).

Posizionato sui tratti ottici e in posizione prossimale ai lobi ottici, ci sono i lobi peduncolari (142×10^3 cellule) e olfattivi (136×10^3 cells) e le ghiandole ottiche. Si ritiene che il lobo peduncolare sia coinvolto nel controllo dell'attacco e del movimento (un possibile analogo del cervelletto; Messenger, 1967). Questo contiene principalmente cellule di media grandezza ($5 - 10 \mu\text{m}$), oltre ad alcune cellule più piccole di $5 \mu\text{m}$. Il lobo olfattivo si presenta con una composizione cellulare simile a quello peduncolare e sembra rivestire funzioni chemiorettoriali. Secondo Wells e collaboratori, la ghiandola ottica ha un ruolo endocrino (Wells and Wells, 1959).

Nella massa sotto-esofagea (SUB), è possibile distinguere tre regioni: anteriore, mediale e posteriore (vedere anche Tabella 1.1).

La regione anteriore è costituita dai lobi prenachiali (261×10^3 cells) e postbrachiali (80×10^3 cells), ed è implicata nel controllo del movimento delle braccia. Il lobo prebrachiale, è costituito da un elevato numero di piccole ($5 \mu\text{m}$) e grandi cellule ($20 \mu\text{m}$ di diametro); in contrasto, le cellule grandi ($25 \mu\text{m}$) sono la componente principale del lobo postbranchiale.

La regione mediale della SUB comprende i lobi anteriori dei cromatofori ($217 \times$

103 cellule) e il lobo pedale (243 x 103 cellule). In questo caso i neuroni presenti in proporzioni maggiori sono quelli di dimensioni intermedie (5 – 15 μm) o grandi (15 – 20 μm), mentre solo poche cellule di piccole dimensioni (< 5 μm) sono osservabili. In contrasto, la parte laterale della massa sopra-esofagea mediale ospita un numero maggiore di cellule di piccole dimensioni.

La parte posteriore della SUB mediale contiene cellule a forma di pera (principalmente di medie dimensioni).

Nella regione posteriore della SUB sono identificabili i seguenti lobi: palioviscerale (108 x 103 cellule), posteriore dei cromatofori (309 x 103 cellule), vasomotore (1307 x 103 cellule) e magnocellulare (581 x 103 cellule).

Secondo Young (1971), il lobo pallioviscerale contiene neuroni che differiscono a livello funzionale anche in assenza di una separazione anatomica netta in distretti.

Lo strato cellulare più esterno è formato da grandi cellule (10 – 20 μm), a ridosso del neuropilo invece, si osservano poche cellule di dimensioni ridotte (5 μm).

Il lobo vasomotore presenta una spessa parete composta da numerose piccole cellule (5 – 10 μm), con alcune cellule grandi situate verso la periferia. I lobi dei cromatofori (uno per ogni lato) contengono un numero molto elevato di cellule; nella parte più anteriore sono presenti principalmente cellule piccole (5 – 10 μm), mentre in quella più posteriore le cellule hanno dimensioni comprese tra 15 – 20 μm .

I lobi magnocellulari circondano l'esofago (uno per ogni lato) e sono ritenuti sedi di controllo delle risposte comportamentali di base, inclusi i pattern motori di difesa. La parte più dorsale ospita cellule piccole e di medie dimensioni (5 - 10 μm), oltre a cellule grandi (10 – 15 μm) in numero ridotto. Nella parte ventrale gli strati cellulari appaiono più spessi e maggiormente caratterizzati dalla presenza di cellule di grandi dimensioni (tra 15 e 20 μm).

Il sistema periferico è una complessa rete di nervi che, ad eccezione di quello delle braccia, è stata dettagliatamente descritta da Pfefferkorn (1915). In questa tesi non verranno forniti ulteriori descrizioni del sistema nervoso periferico del polpo; il lavoro di Bullock (1965d) rappresenta una dettagliata visione d'insieme dal

punto di vista morfologico, e che allo stesso tempo elenca i nervi del cervello, la loro origine e posizione relativa o ruolo all'interno del network periferico.

E' utile sottolineare inoltre, che Bullock fornisce descrizioni di 10 serie di nervi che partono dalla massa sopra-esofagea, e più di 20 che hanno origine dalla massa sopra-esofagea (vedere tabella 25.1 in Bullock, 1965d).

In aggiunta agli otto cordoni nervosi delle braccia e dei gangli alla loro base (e a quelli delle ventose), il sistema periferico è costituito da: due gangli stellati (uno per ciascun lato del mantello; Fig. 1.2); due brachiali, due o quattro (dipendente dalla specie) gangli cardiaci. Essi sono considerati nuove 'aggiunte' nei cefalopodi (Bullock, 1965d).

In ciascun braccio (Fig. 4) i componenti nervosi possono essere così riassunti:

- i. cordone nervoso centrale;
- ii. quattro sottili cordoni nervosi longitudinali, prossimi alla periferia del braccio;
- iii. un ganglio sub-acetabulare in prossimità di ciascuna ventosa;
- iv. nervi regolari;
- v. piccole emergenze nervose sparse nei muscoli;
- vi. un considerevole numero di cellule nervose (probabilmente sensoriali) superficiali.

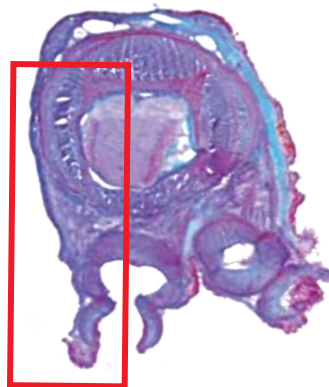


Figura 1.4. Una sezione del braccio del polpo e una rappresentazione schematica del sistema nervoso che lo compone.

Le braccia contengono circa i due terzi dei 500 milioni di neuroni che costituiscono il sistema nervoso del polpo.

Di recente siamo stati in grado di identificare il cordone nervoso delle braccia del polpo in vivo con metodi ecografici (Margheri et al., 2011) e di stimare la proporzione relativa del tessuto nervoso e muscolare lungo il braccio: esso non appare costante, il tessuto nervoso è maggiormente rappresentato verso la parte distale. Nell'ottica della citata Direttiva 2010/63/EU, l'approccio ecografico in combinazione con tecniche di contrasto in vivo risulterà benefica per la riduzione della invasività di studi morfologici e funzionali. Dal punto di vista funzionale il sistema nervoso del polpo è distribuito sia in termini anatomici che di processamento sensorimotorio. Il sistema periferico appare "collegato" a quello centrale che coordina e provvede alle "decisioni" (review in: Young, 1991; Borrelli and Fiorito, 2008; Hochner, 2012). La complessità (o semplicità) dell'organizzazione del sistema nervoso del polpo è anche rappresentata dall'autonomia delle braccia (Hochner, 2012). Tale autonomia dipende dall'organizzazione gerarchica funzionale da parte dei centri motori superiori ma consente di compiere movimenti stereotipati in assenza di stimolazione "superiore" (Altman, 1971; Sumbre et al., 2001, 2005, 2006).

L'analisi di centinaia di esperimenti di lesione/ablazione (review in Sanders, 1975) e di migliaia di sezioni istologiche ha consentito a Young e collaboratori di descrivere l'anatomia funzionale del sistema nervoso identificando il circuito che sottende al processamento visivo e tattile: un circuito governato da una serie di matrici (Young, 1991).

Il sistema tattile e la conseguenziale decisione di raccogliere o rigettare un oggetto è basata sull'interazione di un network di otto matrici (Tabella 1.3).

Tabella 1.3. Le strutture della massa sopraesofagea di *O. vulgaris* che costituiscono le matrici di processamento delle informazioni 'visive' e 'tattili' (Young, 1991, 1995). Per uniformità con la nomenclatura standard le indicazioni sono fornite in inglese.

	Tactile	Visual
Anterior	Posterior buccal	
	Median inferior frontal	
	Lateral inferior frontal	
	Subfrontal	
	Median superior frontal	Median superior frontal
	Lateral superior frontal	Lateral superior frontal
Posterior	Vertical	Vertical
	Subvertical	Subvertical

Il sistema è 'sintonizzato' a raccogliere ogni oggetto a meno che uno stimolo nocivo non venga percepito. La memorizzazione di queste informazioni è conservata nel lobo frontale inferiore (Young, 1991).

Come quello tattile, il sistema visivo classifica e processa le informazioni attraverso un network di 4 matrici (Tabella 1.3). I lobi ottici anche svolgono un ruolo essenziale in questo processo. Il sistema visivo è 'sintonizzato' a promuovere l'attacco dell'animale a meno di sensazioni spiacevoli. Il segnale dai lobi ottici procede verso aree diverse del cervello: verso i lobi magnocellulari dove probabilmente promuove la fuga da pericoli, il lobo del peduncle e basale che servono a regolare i movimenti, mentre altre procedono verso le "matrici" (Tabella 1.3). Secondo Young, è l'interazione tra l'azione amplificatoria del lobo frontale superiore (facilita attacco) e il verticale (inibitore) che provveder a regolare il comportamento dell'animale (for review see Sanders, 1975). La memorizzazione delle esperienze visive è localizzata secondo Young nel lobo ottico (Young, 1991, 1995).

L'idea di Young e collaboratori dell'esistenza di matrici multiple che controllano il comportamento dell'animale trovano anche la loro radice negli studi di Cajal (1917) e Sanders and Young (1940). I due sistemi lavorano secondo principi simili. L'informazione è 'processata' per facilitare il comportamento esploratorio ed è considerato analogo all'ippocampo dei mammiferi (Young, 1995). L'interazione

tra sistema visivo e tattile appare relegata ai soli effettori (Allen et al., 1986), sebbene limitata cross-modalità sembra possibile (Michels et al., 1987).

Studi recenti di neurofisiologia nel polpo confermano l'idea di una evoluzione convergente tra cefalopodi e vertebrati superiori (Hochner et al., 2003, 2006) soprattutto a livello del lobo verticale. Tale analogia non è completa, la principale differenza esiste nell'organizzazione morfologica e biofisica (Hochner et al., 2006). Preparazioni in vitro di fettine di cervello, simili a quelle di ippocampo dei mammiferi, hanno iniziato nuove strade di studio prima considerate impossibili (Young, 1985). Ne sono esempio i lavori pionieristici di Williamson and Budelmann (1991). In anni recenti Hochner e collaboratori hanno utilizzato il lobo verticale per predisporre una preparazione 'brain-slice' (Hochner et al., 2003). In essa sono state applicate stimolazioni tetaniche al livello dei tratti afferenti e registrati potenziali di campo extracellulari dalle aree corticali del lobo che hanno consentito di individuare fenomeni analoghi al potenziamento a lungo termine dei mammiferi (LTP) (Hochner et al., 2003). Così come nel sistema dei cromatofori del calamaro (Lima et al., 2003) neurotrasmettitore sembra essere il glutamato agendo su recettori AMPA-like (Hochner et al., 2003). Sebbene recettori NMDA sembrano essere presenti nel sistema nervoso centrale dei cefalopodi (Di Cosmo et al., 2004, 2006), esperimenti neuro-farmacologici sembrano suggerire che essi non hanno ruolo nei fenomeni di plasticità osservati (Hochner et al., 2003, 2006), inoltre la serotonina (co-modulata da octopamina) probabilmente interviene in questa modulazione (Shomrat et al., 2010). Una forma simile di 'LTP' è stata anche identificata nel lobo verticale della seppia dove probabilmente la mediazione interviene sulla base di modulazione colinergica (Shomrat et al., 2011).

Ciò riporta la nostra attenzione alla similarità tra network neurali di vertebrati e cefalopodi, nonostante le differenze a livello biofisico.

Tutti gli studi sopra menzionati si basano sulla valutazione della prestazione predatoria di *O. vulgaris*. L'analisi del modello del cervello del polpo trova un suo analogo cibernetico (Clymer, 1973), dove il mnemon (Young, 1965) è attivato da un segnale visivo classificato e attivato o meno sulla base delle informazioni

derivate dalle esperienze precedenti così da determinare la decisione 'attacca' 'ritirata' (Clymer, 1973; cfr anche Myers, 1992).

Sulla base delle conoscenze attuali, i centri motori superiori (lobi basali) non sembrano avere un'organizzazione somatotopica (Zullo et al., 2009). La stimolazione dei neuroni nei lobi basali non attiva movimenti localizzati ma piuttosto un comportamento complesso, la cui complessità aumenta con l'intensità dello stimolo. Inoltre, la stimolazione dei centri motori superiori evoca estensioni di braccia diverse. Questi risultati suggeriscono che i centri motori superiori contengono rappresentazioni di programmi motori piuttosto che di parti del corpo. Risposte tattili e visivi registrate in queste aree motorie non sono inoltre somatotopicamente organizzate, un sito che risponde a una stimolazione tattile locale di un braccio risponde ugualmente bene alla stimolazione lungo tutto il braccio di braccia diverse. Aree senso-motorie sembrano quindi avere una funzione integrativa (Zullo et al, 2009; Höchner, 2012). Altre evidenze sperimentali forniscono una visione contrastante. Utilizzando un compito operante *O. vulgaris* è stato in grado di guidare un suo braccio verso un bersaglio in un labirinto suggerendo così che i polpi possono combinare informazioni periferiche sulla posizione del braccio con input visivo per controllare il traguardo diretto verso movimenti complessi (Gutnick et al., 2011). Inoltre, ci sono prove per una rappresentazione somatotopica nel cervello di strutture della pelle (cromatofori) così da avere un controllo del patterning del corpo (Gaston e Tublitz, 2004; Tublitz et al, 2006.).

Mantello, braccia e cromatofori sono tutti finemente innervati (Bone et al., 1994; Matzner et al., 2000; Florey and Kriebel, 1969) e tecniche neurofisiologiche ne hanno rilevato le caratteristiche di dinamica sinaptica.

I cromatofori, nella pelle, consentono agli animali di mutare la propria apparenza. Coordinando l'espansione e/o contrazione i cromatofori consentono all'animale di cambiare colore. Ciascun cromatoforo contiene un pigmento (giallo, rosso, marrone, nero) ed è connesso a una rete di muscoli radiali (20-25) che ne regolano

l'espansione e la contrazione. Essi sono innervati da nervi direttamente connessi con il cervello (Messenger, 2001). Il glutammato sembra funzionare come neurotrasmettente a questo livello (Bone and Howarth, 1980; Florey et al., 1985) e recettori AMPA-like, e NMDA-like sembrano coesistere (Lima et al., 2003). Modulatore diversi intervengono in questo processo: 5-HT, ossido nitrico peptidi (Florey and Kriebel, 1969; Loi et al., 1996; Mattiello et al., 2010). Inoltre il lato dorsale e ventrale della pelle sembra offrire differenze nella dinamica sinaptica con quella dorsale che mostra segni di plasticità (Florey and Kriebel, 1969) che sembrano mancare a livello ventrale.

A livello delle giunzioni neuromuscolari delle braccia, invece, l'acetilcolina sembra avere il maggior ruolo (Matzner et al., 2000).

Neuromodulazione

Il dettaglio delle conoscenze disponibili sulla organizzazione morfologica e funzionale del 'cervello' sono stati anche completati da studi ultrastrutturali. Questi hanno dimostrato chiaramente che la grande maggioranza delle sinapsi nel sistema nervoso centrale di cefalopodi è di natura chimica (Gray e Young, 1964). Nel loro lavoro, gli autori hanno riconosciuto: a livello presinaptico vescicole chiare e dense (500 Å di diametro), vescicole dense (1000-1500 Å) in aggregazione contro la superficie citoplasmatica della membrana presinaptica, e materiale extracellulare. A livello postsinaptico un 'ispessimento', rendendo il contatto asimmetrico e "presumibilmente funzionalmente polarizzato" (Gray e Young, 1964, p. 101). Questa configurazione ha portato gli autori a suggerire che le sinapsi nel cervello polpo sono molto simili a quelle osservate nei vertebrati tra cui mammiferi (Gray e Young, 1964; ma si veda anche Cobb e Pentreath, 1978). Inoltre, ed a livello del lobo verticale, sinapsi seriali sono evidenti tra le fibre provenienti dal lobo frontale superiore e le cellule amacrine. Tali sinapsi seriali hanno configurazioni che rappresentano un parallelo morfologico delle sinapsi in serie dei vertebrati "che si ritiene di essere responsabili per l'inibizione presinaptica" (Gray e Young, 1964, p. 102). Studi ultrastrutturali sono stati anche condotti per i lobi ottici (Dilly et al., 1964) il lobo vertical (Gray, 1970) e l'organizzazione glio-vascolare del cervello (Gray, 1969).

Considerato che le sinapsi chimiche sono quelle maggiormente presenti nel cervello del polpo, ne deriva l'importanza della loro caratterizzazione.

Sedici anni or sono J.B. Messenger ha pubblicato una review "Neurotransmitter of cephalopods" (Messenger, 1996). Questo lavoro segue quello di Elizabeth M. Tansey (1979) sui neurotrasmettitori dei cefalopodi. L'autrice rileva la non evidenza di glutammato, glicina e taurina.

Va fatto rilevare che L-glutamato è invece incluso da Messenger e rinvenuto in vari lobi (1996) così come nel sistema periferico, negli organi di senso, ecc (Messenger, 1996, 2001). Nel corso di questo dottorato ho determinato per HPLC

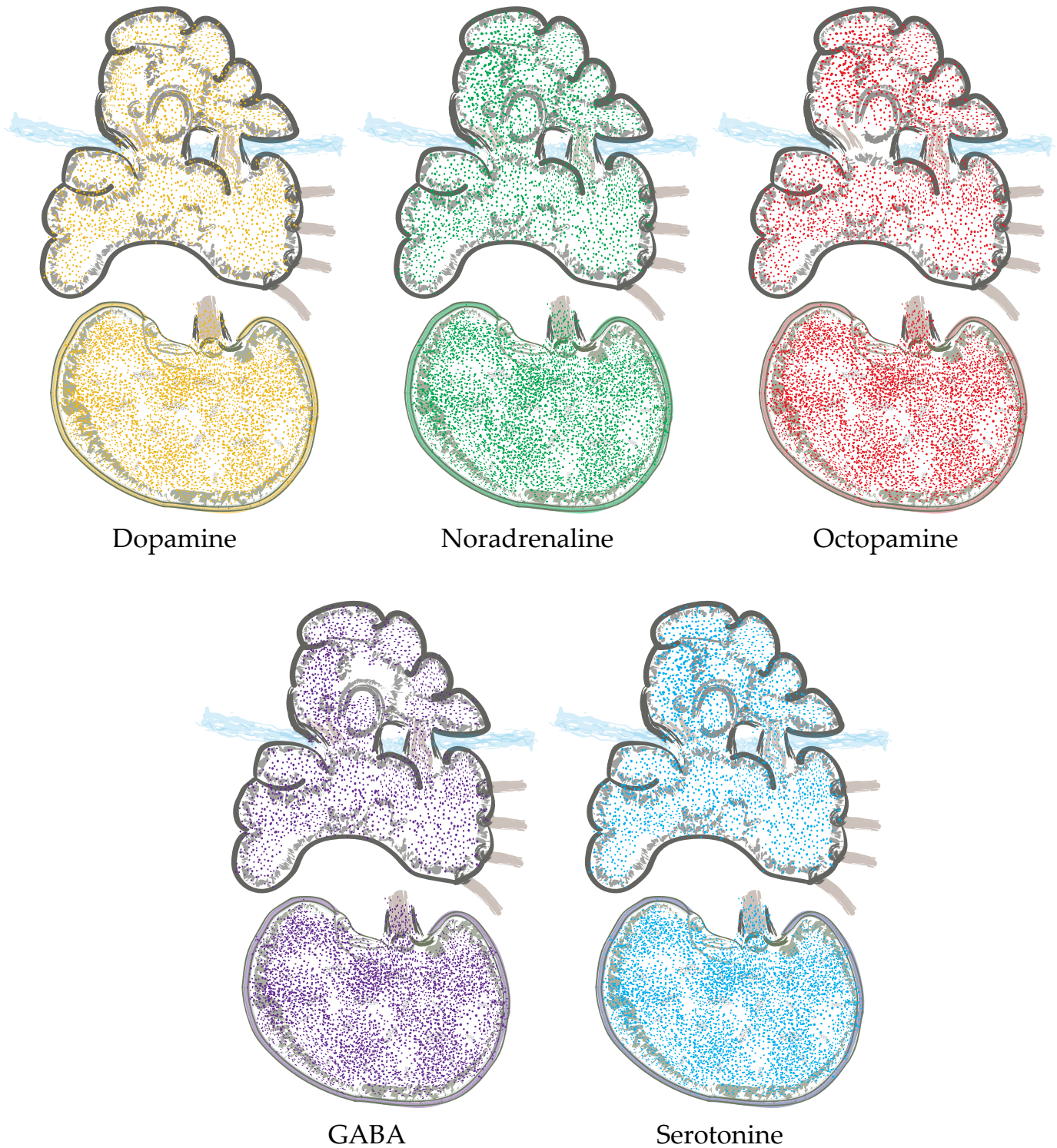


Figure 5. Rappresentazione grafica della distribuzione di cinque modulatori come indicato da Messenger (1996). Appare evidente la distribuzione pressochè uniforme di dopamina, noradrenalina, octopamina, GABA e serotonine nel cervello di *Octopus vulgaris*.

elevati livelli di taurina nella massa sopraesofagea di *O. vulgaris* (Ponte et al., 2010; cfr D'Aniello et al., 1995). Infine la glicina è stata riportata non solo nei tessuti dei cefalopodi (e.g. Shirai et al., 1997; Kany et al., 2007, 2008) ma anche agire a livello synaptico nel calamaro probabilmente agendo sul canale del cloro (Vinogradova et al., 2002).

Una rassegna dettagliata dell'esistenza di acetylcholine, dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina, octopamina, purine, amino-acidi, ossido nitrico, substance-P, somatostatina, FMRF-amide e altri peptidi è presentata da Messenger (1996). I dati sono dedotti da più di 50 contributi apparsi tra il 1935 e il 1995. Il gran numero di trasmettitori e modulatori nel cervello dei cefalopodi è anche evidenza di numerosi 'loops' che controllano il (Messenger, 1979, 1996).

I dati riassunti da Messenger sono qui raffigurati nella Fig. 1.5. Nonostante l'accuratezza dei risultati raccolti e degli studi i dati presentati da Messenger (1996) mettono in luce che non è possibile fare delle distinzioni regionali (Fig. 5). Di conseguenza è tuttora valida la considerazione che "the chemical identity of the transmitter is not known for any synapse in the cephalopod brain" (Tansey, 1979, p. 173) almeno fino a metà degli anni'90 (Kime and Messenger, 1990; Messenger, 1996).

Nel corso degli ultimi 30 anni alcune nuove scoperte sono state aggiunte. Ho pertanto contato i lavori indicizzati su Web of Science e PubMed, e pubblicati tra il 1996 e Agosto 2012. L'analisi ha rilevato 316 lavori ma nessuno su octopamina (Tabella 1.4).

Tabella 1.4. Numero di lavori indicizzati pubblicati dopo il 1996 che hanno riguardato le modulatori (qui elencati in ordine alfabetico) e cefalopodi. Fonte: ISI-Web of Science & Pubmed; ultimo aggiornamento: Agosto 2012. Si veda il testo per dettagli. Il numero di lavori che riguardano l'octopamina vanno dal 1971 al 1993; studi più recenti non sono risultati disponibili.

<i>Modulator</i>	<i>Number of papers</i>
Acetylcholine	59
Octopamine	8
Noradrenaline	10
Dopamine	22
GABA	4
Serotonine	39
Glutammate	83
Nitric oxide	57
Neuropeptides	73

In tal senso per il polpo e nonostante alcuni lavori su serotonina, oxytocin, vasopressin, NMDA-receptor (Di Cosmo et al., 2004; Boyer et al., 2007; Bardou et al., 2009; Wollesen et al., 2008, 2010, 2012) le conoscenze sulla distribuzione dei modulatori di interesse in questa tesi di dottorato restano lacunosi.

Scopo

Lo scopo di questa tesi di dottorato è di dare informazioni aggiornate sulla presenza e distribuzione di modulatori derivati dalla tirosina nel sistema nervoso del mollusco cefalopode *Octopus vulgaris*.

La presenza di octopamine, noradrenalina e dopamina è stata rilevata nel cervello di alcuni cefalopoli incluso il polpo. Tuttavia l'informazione disponibile ad oggi è lacunosa e basata su dati di presenza/assenza che non consentono l'identificazione di distretti definibili (review in: Tansey, 1978, 1979; Messenger, 1996).

I polpi sono considerati modelli emergenti per lo studio della plasticità comportamentale essenzialmente basata sulla risposta predatoria e su come questa venga modulata dalla 'ricompensa' (review in Hochner et al., 2006; Borrelli and Fiorito, 2008).

Il sistema della 'ricompensa' appare chiave in ogni comportamento, incluso quello umano, ed evidenze sperimentali anche recenti confermano il ruolo del sistema dopaminergico nei processi di 'decision making' e 'reward' (e.g.: Bromberg-Martin et al., 2010; Berry et al., 2012; Lee et al., 2012). E' interessante rilevare che anche l'octopamina sembra giocare un ruolo analogo negli invertebrates).

Per gli scopi di questo dottorato io qui:

1. analizzo la distribuzione di dopamina, octopamina e noradrenalina a mezzo di tecniche di immunoistochimica e ibridazione in situ in diverse parti del sistema nervoso del polpo;
2. formulo ipotesi preliminari sul contributo differenziale del sistema 'dopaminergico' e octopaminergico nei sistemi di memoria visivo e tattile nel polpo (Young, 1991);
3. tento di rappresentare una mappa preliminare di colocalizzazione di diversi modulatori tentando una correlazione con altri (GABA e serotonina).

Dopamina, Noradrenalina e Octopamina: cenni

Tra i derivati della tirosina molte molecole si sono rivelate a giocare, nella quasi totalità di organismi, il ruolo di modulatori e in qualche caso di neurotrasmettitori. Attenzione nelle pagine che seguono verrà data a dopamina, noradrenalina e octopamina. E' fuori degli scopi di questa sezione introduttiva procedere a una rassegna delle conoscenze disponibili su questi modulatori in vertebrati e/o invertebrati.

La dopamina è una catecolamina che deriva dalla tirosina a seguito di due reazioni enzimatiche, la prima catalizzata dalla tirosina idrossilasi (TH) e la seconda dalla DOPA decarbossilasi (DDC).

La dopamina è a sua volta precursore della noradrenalina e della adrenalina e probabilmente contribuisce anche alla sintesi della octopamina (Yamamoto and Vernier, 2011). Nelle piante partecipa al processo di "imbrunimento" nella fase di maturazione del frutto giacchè è anche metabolita della via che porta alla produzione di melanina; inoltre esiste evidenza di un ruolo di difesa giacchè in alcune alghe l'accumulo di dopamina porta ad azione "anti-erbivora" (Val Alstyne et al., 2011).

Nel sistema nervoso di vertebrati ed invertebrati la dopamina gioca innumerevoli ruoli essenziali: sistema visivo-olfattorio, sensori-motorio, motivazione, memoria, emozione e come regolatore di risposte endocrine. Nei mammiferi si ritiene svolga un ruolo eccitatorio e inibitorio attraverso la modulazione di vari canali. La differente azione è esercitata da recettori D1/D5 (eccitatori) e D2/D3 (inibitori) che reagiscono direttamente sull'adenilato ciclasi.

Nel corso degli ultimi anni la dopamina è stata implicata sia nella cura e/o cause del Parkinson ma soprattutto in quei processi che portano a deficit attenzionali e più in generale al meccanismo della ricompensa. La somministrazione di L-DOPA in associazione alle altre molecole è tuttora a lungo considerata come un valido

approccio per alleviare i sintomi del Parkinson.

In tutti i vertebrati la dopamina funziona contribuendo alla regolazione di processi neurali così come quelli legati alla crescita e alla gran parte dei meccanismi endocrini. Ad esempio nei mammiferi la dopamina modula il rilascio di prolattina mentre nei pesci la osmoregolazione (Smeets and Gonzalez, 2000).

Per quanto riguarda il meccanismo della ricompensa, benchè siano ancora limitati gli studi in specie di invertebrati, appare evidente come essa abbia un ruolo chiave di modulatore. Ne sono esempio studi condotti su *Caenorhabditis elegans* o *Aplysia* (Barron et al., 2010). Nei cefalopodi, numerosi contributi ne hanno evidenziato la presenza nel tessuto nervoso (Tansey, 1978-1979; Messenger, 1996). Esiste inoltre evidenza farmacologica per la modulazione dopaminergica probabilmente a carico di recettori D2-like della adenilato ciclasi del sistema nervoso del polpo (lobi ottici) (Capasso et al.,). Inoltre in seppia la dopamina riduce la frequenza e l'ampiezza di potenziali sinaptici a seguito di stimolazione; in questo caso gli effetti inibitori dose-dipendenti sono stati imputati a recettori D4-like (Chrachri and Williamson, 2005).

Infine la dopamina contribuisce alla modulazione delle risposte comportamentali in condizioni "aversive" mentre sembra che l'octopamina giochi ruoli opposti. Tuttavia le evidenze sperimentali si accumulano negli ultimi anni e probabilmente il ruolo della dopamina nella modulazione del comportamento in diversi taxa di invertebrati potrebbe essere diverso (Mizunami and Matsumoto, 2010).

La norepinefrina, o noradrenalina, è un'altra catecolamina a cui anche in questo caso sono attribuiti molteplici ruoli fisiologici. I due termini sono intercambiabili e derivano rispettivamente dal greco e dal latino. La funzione classica attribuita alla noradrenalina è la modulazione simpatica del battito cardiaco.

Il molteplice ruolo di modulatore della noradrenalina viene esercitato ad esempio nella modulazione del ciclo di veglia e nella regolazione delle esperienze emotive. In questi casi si ritiene che l'attivazione noradrenergica funga da "integratore" con altri segnali facilitando gli effetti sul consolidamento delle esperienze o inibendolo, inclusi gli effetti sulla memoria di lavoro (Roosendaal and McGaugh,

2011).

Negli invertebrati, la presenza della noradrenalina è stata rinvenuta in diversi taxa (Cottrell, 1967). Questa evidenza appare in contrasto con l'apparente non implicazione di questa molecola nei processi modulatori negli invertebrati (Roeder, 2005).

Infine la noradrenalina è ritenuta giocare un ruolo di modulazione in risposta a stress acuti. In particolare, evidenze sperimentali sembrano dimostrare che nei cordati e nei molluschi questa risposta sia modulata dalla noradrenalina mentre negli insetti dalla octopamina. Infine, entrambe le molecole modulano la risposta immune (cfr Adamo, 2008). Da ultimo, negli ultimi dieci anni, la noradrenalina è stata implicata nella modulazione della plasticità del sistema nervoso a carico della glia (Haydon, 2001; Laming et al., 2000).

L'octopamina e la tiramina sono definite ammine in traccia per gli studi in vertebrati. Esse sono molto abbondanti negli invertebrati. In questi ultimi esse svolgono azioni analoghe a quelle della noradrenalina e della adrenalina negli invertebrati e sono pertanto considerate loro equivalenti (Roeder, 2005). L'octopamina è sintetizzata a partire dalla tirosina attraverso due vie metaboliche.

Descrivi vie metaboliche

E' stata scoperta da Vittorio Erspamer nelle ghiandole salivari del polpo e contribuisce al controllo di innumerevoli funzioni fisiologiche sia nel sistema nervoso centrale che periferico, modula attività motorie (Roeder, 2005), regola i livelli di aggressività (Zhou et al., 2008).

Livelli di octopamina nelle emolinfe risultano accresciuti a causa di stress o durante tutte quelle situazioni in cui l'organismo è sottoposto a sforzi o ad attività prolungate. Evidenza è anche disponibile nell'essere coinvolto nell'incremento di emociti circolanti in risposta a challenge immunologico (Farooqui, 2012). La sua azione dinamica si esercita come neuromodulatore, neurotrasmettitore e neurormone. Nei molluschi promuove e modula i programmi motori legati all'assunzione di cibo, ad esempio in *Lymnaea* e *Aplysia* (Hiripi et al., 1998;

Vehovszky 2005; Martinez-Rubio et al., 2009). Nei cefalopodi non è mai stato dimostrato il suo coinvolgimento nel comportamento o nei fenomeni di plasticità ma alcuni studi datati riportano l'indiretta modulazione dei cromatofori della classe "rossa", l'attivazione di alcuni muscoli del derma (papille) e l'innalzamento della frequenza respiratoria (Andrews et al., 1981-1983). Essa è anche ritenuta coinvolta nella modulazione della risposta di fuga (Messenger 1996).

Materiali e Metodi

Animali e campioni

In questo studio sono stati impiegati individui di *Octopus vulgaris* di entrambi i sessi (peso corporeo: 150-400 g), pescati nel Golfo di Napoli (Italy). Tutti gli animali erano in condizioni ottimali di salute, non presentavano danni ed erano acclimatati alle condizioni di laboratorio secondo le procedure standardizzate del laboratorio di G. Fiorito alla Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli (e.g. Fiorito et al., 1990). Tutte le procedure sperimentali applicate seguono le regole bioetiche vigenti in Italia; in questo paese *O. vulgaris* non è ancora incluso nell'elenco degli animali "regolati" da norme per il trattamento e la sperimentazione. Tuttavia, in considerazione del mio coinvolgimento attivo nell'applicazione della Direttiva 2010/63/EU che include i cefalopodi nella legislazione vigente (Smith et al., in press; see also: <http://www.cephres.org/eu-directive>), e nel contribuire alla predisposizione delle Linee Guida sulla sperimentazione per Cefalopodi (<http://www.felasa.eu/announcements/felasa-collaboration-on-cephalopods>), ho dedicato molta attenzione al benessere degli animali e nel tentativo di ridurre al minimo distress, sofferenza o "dolore" ai polpi.

La taglia corporea e il sesso degli individui è stata determinata pre- e post-mortem. Gli animali sono stati anestetizzati per immersione in una soluzione di cloruro di magnesio (2 l di acqua di mare a cui sono aggiunti 3.5% MgCl₂; Messenger et al., 1985). In queste condizioni, dopo una iniziale reazione di fuga, la frequenza respiratoria e i movimenti spontanei diminuiscono fino a cessare entro 15 minuti. Trenta minuti sono necessari a raggiungere uno stato di anestesia profonda (Grimaldi et al., 2007), come richiesto ad oggi per applicare 'eutanasia' al polpo (Boyle, 1991). In tale condizione gli interventi chirurgici di qualsiasi tipo non inducono spasmi e/o reazioni nell'animale.

I campioni sono stati prelevati secondo la prassi (cfr. Young, 1971). La maturità sessuale degli individui non è stata determinata nel mio campione.

Immunoistochimica

Dopamina, noradrenalina, e octopamina

Una serie di esperimenti preliminari, seguendo altri studi che impiegavano tecniche di immunoistochimica nei cefalopodi, non hanno dato risultati soddisfacenti. Successivamente ho comparato una serie di protocolli diversi alla ricerca della migliore opzione per localizzare dopamina, noradrenalina and octopamina nel cervello del polpo (Tabella 2.1). Dopo un'altra serie di insuccessi, i migliori risultati sono stati ottenuti applicando il protocollo utilizzato nella locusta (Kononenko et al., 2009) con alcune modifiche (Protocol 1). In breve, i campioni sono stati fissati [6.25% glutaraldehyde, 75% picric acid, 5% (glacial) acetic acid, 1% sodium metabisulfite (SMB)] per 3 ore. Dopo lavaggi e deidratazione in serie crescenti di etanolo, i campioni sono stati permeabilizzati, reidratati e lavati in 0.1 M Tris-HCl-SMB (pH 7.6), e successivamente inclusi in agarosio (soluzione 4%). Le parti sono state incluse con attenzione per garantire un buon orientamento durante il taglio. Sezioni di 50 μm sono state tagliate per mezzo di un vibratomo (VT 1000S, Leica, Wetzlar, Germany) and processate per i passi successivi. L' incubazione (4°C) con anticorpo primario (rabbit polyclonal anti Dopamine/Noradrenaline/Octopamine, GemacBio, France) è durata fino a 72 ore.

Tabella 2.1. Comparazione di protocolli pubblicati in studi su specie diverse di invertebrati e impiegati in vario modo negli esperimenti iniziali per la localizzazione di dopamina, noradrenalina e octopamina nel cervello del polpo.

Bardou et al., 2009	Boyer et al., 2007	Blecker et al., 2006	Cornwell et al., 1993	Chrachri and Williamson, 2003
<i>Distribution of oxytocin-like and vasopressin-like immunoreactivities within the central nervous system of the cuttlefish, Sepia officinalis</i>	<i>Distribution of neurokinin A-like and serotonin immunoreactivities within the vertical lobe complex in Sepia officinalis</i>	<i>Octopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of two parasitic wasps, Cotesia glomerata and Cotesia rubecula</i>	<i>Distribution of GABA immunoreactivity in the octopus brain (Fleedone cirrata)</i>	<i>Modulation of spontaneous and evoked EPSCs and IPSCs in optic lobe neurons of cuttlefish Sepia officinalis by the neuropeptide FMRFamide</i>
Fixed in PAF 4% dissolved in phosphate buffer, pH 7.4 (PB) for 16 h at 4 °C	Fixed in PAF 4% dissolved in phosphate buffer, pH 7.4 (PB) for 16 h at 4 °C	Fixed in one part 25% glutaraldehyde and three parts saturated picric acid with 0.1% glacial acetic acid (CPA)	Fixed in PAF 4% + Glut 0.1 % for 4 h	Fixed in PAF 4% for 24 h
Washes in PB 0.2M (pH7.4)	Washes in cold Coons buffer, pH 7.4	Washes in increasing EtOH and after rehydrated in PBS	Washes Tris-Azide Buffer	Washes PBS 0.1M
Cryoprotect in Sucrose 20 % in PB 0.2M and cut on a cryostat collected on gelatin-coated glass slides	Cryoprotect in Sucrose 20 % and cut on a freezing microtome collected on gelatin-coated glass slides	NaBH ₄ (0.5%) 20 Min	Cryoprotect in Sucrose 30% O/N; Sections were cut at 40 µm on a freezing microtome	Cut into 50-µm-thick slices: free-floating sections and stored at 4 °C ON in PBS
Washes PB 0.1M	Washes Coons buffer, pH 7.4	Washes PBS (Dulbecco A)	Washes Tris-Azide Buffer with Tx 0.025%	Washes PBS
		Collagenase 0.5 mg/ml in PBS 1h		Solution of 0.1M glycine in PBS
		Washes PBS with Tx 0.5%		
		NGS 10% 1 h RT in PBS with Tx 0.5%	NSS (1:10) 1 h RT in Tris-Azide Buffer	NGS 5% in PBS with Tx 0.3% and Na Azide 0.1% for 3-5 h
AbI: 1500 (rabbit polyclonal anti-oxytocin or only guinea pig) in 0.1M PB with Tx 0.25% for 16 h at RT	AbI (1:2500 rabbit polyclonal antiserum-Nka [conjugated to HSA] or 1:50000 mouse monoclonal antibody-5-HT [conjugated toBSA] ON at RT in Coons Buffer with Tx 0.25%	AbI (1:1500) Rabbit anti-Octopamine-AP007 (GemacBio) + NGS 10% in PBS + Tx 0.5%, 20 h in a moist chamber at RT	AbI (1:500) Rabbit anti-Gaba (Sigma) in NSS 1% Tris-Azide Buffer with Tx 0.025%, 12 h t 4 °C	AbI (1:600) anti-FMRFa (Chernicon) 4 °C ON
Washes PB 0.1M	Washes Coons buffer, pH 7.4	Washes PBS + Tx 0.5% 3 h	Washes Tris-Azide Buffer + Tx 0.025%	Washes PBS
AbII (1:100) 90 Min at RT in 0.1M PB with Tx 0.25% e.g.F(ab')2 fragments of donkey anti-rabbit IgG linked to (TRITC)	AbII (1:300) 90 Min at RT in Coons buffer with Tx 0.25 e.g.F(ab')2 fragments of donkey anti-rabbit IgG linked (TRITC)	AbII 1:200 Goat-anti-rabbit conjugated to Fluorolink Cy2 (Amersham) with NGS 10% in PBS and Tx 0.5% for 4 h at RT	AbII 5% Swine anti-rabbit Ab (Dako) in NGS 10% Tris-Azide Buffer with Tx 0.025% 1 h at RT	AbII 1:200 Biotinylated Antirabbit (prepared in goat)
Washes PB 0.1M	Washes in cold Coons Buffer	Washes PBS + Tx 0.5% 4 h and after ON in PBS	Washes Tris-Azide Buffer	Washes PBS
			Rabbit PAP (Dako) 2.5% 1 h at RT	ABC Kit 1 h (1:400)
			Washes Tris-Azide Buffer	Washes PBS
			Reaction using DAB	Reaction using DAB
			Washes Tris-Azide Buffer	
Sections mounted in an anti-fade medium (0.1% paraphenylenediamine, 3 vol glycerol, and 1 vol PB) and coverslipped	Sections were mounted in an anti-fade medium and coverslipped	Sections were mounted in Depex after dehydration and coverslipped	Sections were mounted in Histomount after dehydration and coverslipped	Slices were mounted on poly-L-lysine-coated slides, were next dehydrated in an alcohol series, cleared in methyl salicylate

Protocol 1

FIRST DAY

1. Brains and ganglia were dissected and fixed for 3 hours in:

for 50 ml (one animal only brain masses)

6.25 % glutaraldehyde
(25%)

12.5 ml glutaraldehyde

75 % picric acid
solution)

35 ml picric acid (saturated

5% glacial acetic acid

2.5 ml glacial acetic acid

1% sodium metabisulfite (SMB)

0.5 g to dissolve in solution

2. Washed 2 x 5 minutes each in 1% SMB in distilled water;

3. Dehydrate in an ascending ethanol series (50%, 70%, 90%, 100% for 10 minutes each);

4. Permeabilize in a 1:1 mixture of 100% ethanol and methylsalicylate for 5 minutes;

5. Rehydrate in a descending ethanol series (100%, 90%, 70%, 50%, 10 minutes each);

6. Wash 6 X 5 minutes each in 0.1 M Tris-HCl-buffer containing 0.45% SMB (Tris-HCl-SMB, pH 7.6);

7. Store specimens 4°C O/N in Tris-HCl-SMB, pH 7.6

SECOND DAY

1. Dry samples on paper;

2. Place the polystyrene ring mold, fill the ring mold with 62°C agarose solution (4% in 0.1 M Tris-HCl-SMB, pH 7.6.) and cool for about 2min. Transfer the tissue into agarose solution. Use forceps to orient the tissue in agarose so that it is suspended halfway between the top and bottom of the ring mold and incubate the tissue at 4°C until the agarose has solidified;

3. Cut specimens with vibratome, adjust the microtome section thickness to 50µm, the speed to 0.4, and the blade amplitude to 1.8 and begin cutting tissue sections;

4 Transfer each tissue section to a 24-well culture plate well that contains ice-cold Tris-HCl-SMB, pH 7.6;

5. Washed sections in 0.1 M Tris-HCl-SMB, pH 7.6, for 15 minutes;

6. Then for 10 minutes in 1% Na-borohydride (Sigma) in 0.1M Tris-HCl-SMB, pH 7.6;
7. Wash in 1% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl-SMB, pH 7.6 for 10 minutes;
8. Incubate with 1% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl containing 10% normal goat serum O/N at 4°C.

THIRD DAY

1. Remove the blocking solution;
2. Incubate with primary antibodies for 3 days (72 h) at 4°C. The primary anti – dopamine, noradrenaline, and octopamine antibodies (rabbit polyclonal, GemacBio, France) was diluted at 1:1,000 in the antisera diluent (1% Triton X-100, 0.05% sodium azide (NaN₃), 5% normal goat serum in 0.1 M Tris-HCl). For control slices omit primary or secondary antibody, or use primary antibody pre-incubated ON with the corresponding epitope.

... Three days ...

SIXTH DAY

1. Remove the primary antibody solution;
2. Wash 6x20 minutes each in 1% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl;
3. Incubate with AbII (alexafuor 546-antirabbit H-L) 1:1000 in 1% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl O/N 4°C. In the case of control without secondary antibody omit it.

SEVENTH DAY

1. Remove the secondary antibody solution;
2. Wash 6x20 minutes each in 1% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl;
3. Incubate with DAPI 1:1000 for 30 minutes;
4. Wash extensively 6x20 minutes each with 1% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl;
5. Mount the slices on glass slides (superfrost) and cover with fluoromount (remember to close the slide with nail polish).

GABA e serotonina

Allo scopo di replicare in *O. vulgaris* lavori precedenti (5-HT in *Sepia officinalis*: Boyer et al, 2007; GABA in *Eledone cirrhosa*: Cornwell et al., 1993) gli esperimenti di immuno istochimica con GABA e 5-HT sono stati realizzati con doppia-marcatura utilizzando anticorpi policlonali anti-serotonina (rabbit, SIGMA, 1:100) and monoclonali anti-GABA (mouse, SIGMA, 1:500). Anticorpi secondari sono stati coniugati con fluoroforo Alexa Fluor 555 (donkey anti-rabbit IgG) e Alexa Fluor 488 (goat anti mouse IgG1, entrambi 1:200). I nuclei marcati con DAPI.

I campioni dopo dissezione sono stati fissati (5 h at 4 °C) in paraformaldehide 4% in acqua di mare. Dopo fissazione, lavati almeno per 6 ore a temperatura ambiente (0.1 M phosphate buffer, pH 7.6, PB) and crioprotetti (30% sucrose/0.1 M PB, 4 °C). I campioni sono stati quindi inclusi in Tissue Freezing Medium (Killik, Bio-Optica), congelati su ghiaccio secco and conservati a -80 °C fino a ulteriore trattamento. Sezioni seriali (20 µm) sono state ottenute utilizzando un criostato (Leica CM3050S, Leica Microsystems), raccolte su vetrini SuperFrost Plus (Thermo Scientific), lavate in 3 bagni successivi di 0.1 M PB, and incubate per 90 min (RT) in 5% goat serum (Vector Laboratories Ltd) diluito in 0.1 M PB contenente 0.05% Tween (PBTw). I vetrini sono stati poi incubati con anticorpo primario (1:500 monoclonal anti-GABA - mouse, SIGMA; 1:100 polyclonal anti-serotonin - rabbit, SIGMA) per almeno 12 ore (4 °C). Il giorno successivo i vetrini sono stati lavati diverse volte PBTw e incubati (RT, 90 min) con anticorpi secondari (Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG, 5-HT; Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1, GABA) entrambi 1:200 in PBTw. Le sezioni sono state lavate e i nuclei colorati con DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR). Dopo ulteriori lavaggi le sezioni sono state montate (Fluoromount, Sigma) e coperte con copri-oggetto.

Controlli

Per tutti gli antisieri, l'anticorpo primario e/o del secondario non aggiunti alla reazione non ha prodotto 'segnale'. In aggiunta, specificità è stata assicurata pre-incubando (4 °C, per la notte) gli anticorpi con 1mg/mL di epitopo sintetico

(Dopamine/Noradrenaline/Octopamine coniugati con BSA e glutaraldehyde; 5-HT and GABA coniugati con BSA con paraformaldehyde) prima di fissazione; anche in questi casi nessuna reazione è stata osservata.

Image acquisition

I vetrini sono stati esaminati per mezzo di un microscopio invertito a fluorescenza (DMI 3000 B, Leica Microsystems) con una telecamera Leica DFC 360FX. Le immagini acquisite e processate con Leica Application Suite software (Leica Microsystems).

Ibridazione In situ

Esperimenti di ibridazione in situ sono stati condotti seguendo il protocollo di Lisa et al. (2011) con modifiche (Protocol 2). Sonde marcate con digoxigenina for *O. vulgaris* tyrosine hydroxylase (frammento 525bp Ov-TH, accession number: FJ617442) and *O. bimaculoides* D1 Dopamine Receptor (ObDRD1, regalo del Professor Ragsdale, Chicago) sono state utilizzate per la reazione di ibridazione a 60.5°C and rilevate con fosfatasi alcalina. La sequenza di *O. bimaculoides* D1 Dopamine Receptor è anche presente nel trascrittoma di *O. vulgaris* (Zhang et al., 2012) come D1 Dopamine Receptor con cui mostra elevato consenso (96%). Per la sintesi di sonde cRNA ho utilizzato come template, plasmidi ricombinanti precedentemente sub-clonati in TOPO-TA pCRII (Invitrogen) e Express 1 vectors (Express Genomics) per Ov-TH e OvDRD1, rispettivamente. Per la sintesi dei probe si veda anche Appendice 2.

Protocol 2

Preparation of Tissues

1. Incubate freshly dissected samples for 3h at 4°C in PBS containing 4% paraformaldehyde fixative;
2. Dehydrate tissues by washing for 10min at 25°C in a series of graded methanol/PBSTw (1:3, 1:1, 3:1 v/v) solutions;
3. Store samples at –20°C in 100% methanol at least overnight;

PBSTw solution: PBS containing 0.1% Tween™ 20 and 0.2mM sodium azide, filtered through the 0.22µm Stericup® filter unit.

Embedding Tissue in Agarose

1. Prepare tissues for sectioning by rehydrating archived tissues. Wash for 10min at 25°C in a series of graded methanol/PBSTw (3:1, 1:1, 1:3 v/v, 100% PBSTw) solutions;
2. Fill the ring mold with 62°C agarose solution and cool for about 2min;
3. Transfer the tissue into agarose solution. Use forceps to orient the tissue in agarose and incubate the tissue at 4°C until the agarose has solidified;

Prepare a 4% low-melt agarose solution in PBS.

Microwave solution to dissolve agarose and maintain solution at 62°C.

Sectioning Tissue With a Vibrating Microtome

1. Clean Wilkinson blade by rinsing with the following solvents, at 100% concentration: petroleum ether, xylene, chloroform, methanol, and MilliQ water;
2. Adjust the microtome section thickness to 50 μ m, the speed to 0.4, and the blade amplitude to 1.8 and begin cutting tissue sections;
3. Use blunt forceps to transfer each tissue section to a 24-well culture plate well that contains ice-cold PBSTw;
4. Mount slices on suprefrost plus slides and dry O/N under hood;

Pre-hybridization Treatment

1. Prepare a humidified hybridization chamber –falcon dish- with bibula paper and place the slides inside;
2. Incubate tissue sections for 30min at 25°C with 6% H₂O₂ in PBSTw;
3. Wash tissue sections 4 x 5min at 25°C in PBSTw;
4. Incubate tissue sections for 12min at 25°C in PBSTw containing 5µg/mL proteinase K;
5. Wash tissue sections 1 x 5min at 25°C in PBSTw;
6. Post-fix tissue sections for 20min at 25°C in PBS containing 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde;
7. Wash tissue sections 2 x 5min at 25°C in PBSTw.

Hybridization

8. Add prewarmed prehybridization buffer and incubate tissue sections inside humidified hybridization chamber for at least 1hr at 60.5°C;
9. Drain prehybridization buffer and add hybridization buffer containing at least -1.0 µg/ml labeled riboprobe and incubate tissue sections overnight in the humidified hybridization chamber with tissue towels soaked in 50% formamide and 5X SSC overnight at at 60.5 °C

Preheat prehybridization buffer (50% formamide, 5x SSC, 1% Blocking reagent, 10µg/mL yeast tRNA, 10µg/mL heparin store at -20°C) to 60.5°C.

Keep RNase Free work condition from step 1 to step 9!

Post-hybridization

1. Wash tissue sections 3 X 30min at 60.5°C with pre-warmed Solution 1. Use the humidified chamber during washes;
2. Wash tissue sections 1 X 10min at 60.5°C with pre-warmed Solution 1/Solution 2 (1:1 v/v) solution. Use the humidified chamber during the wash;
3. Wash tissue sections 4 X 10min at 25°C with Solution 2;
4. Incubate tissues sections for 15min at 37°C in Solution 2 containing 0.25µg/mL RNase;
5. Wash tissue sections 1 X 10min at 25°C with Solution 2 (without RNase);
6. Wash tissue sections 1 X 10min at 25°C with Solution 3, followed by 2 X 1hr washes at 60.5°C with Solution 3. Use the humidified chamber during the 60.5°C washes;

Immunological detection

7. Wash 3 X 10 min at 25°C with TBSTw;
8. Incubate the tissue sections at least 2hr at 25°C in TB buffer;
9. Remove tissue sections from TB buffer and incubate them overnight in a humidified chamber at 4°C in AD buffer containing anti-DIG-alkaline phosphatase (1:1000, Roche Diagnostics, USA)

Prepare the following solutions for post-hybridization washing steps:

Solution 1 (50% formamide, 5x SSC, 1% SDS);

Solution 2 (10mM Tris-HCL pH 7.5, 0.5M NaCl, 0.1% Tween™ 20, 0.2mM sodium azide, 0.22µm filtered);

Solution 3 (2x SSC, 50% formamide).

Prepare the following solutions for immunohistochemical detection of the DIG-labeled riboprobes:

TB: Tissue Blocking Buffer (1X TBS pH 7.5, 10% sheep serum, 1% blocking reagent, 1% BSA, 0.1% Tween™ 20, 0.22µm filtered);

AD: Antibody Dilution Buffer (1xTBS, 5% sheep serum, 1% blocking reagent, 1% BSA, 0.1% Tween™ 20, 0.2mM sodium azide, 0.22µm filtered);

TBSTw (1xTBS, 0.1% Tween™ 20, 0.2mM sodium azide, 0.22µm filtered).

Staining reaction

1. Wash the tissues 8 X 10 min at 25°C with TBSTw containing 2mM levamisole;
2. Wash tissues 1 X 10 min at 25°C with NTMT;
3. Incubate with NBT and BCIP (NTMT -containing 2mM levamisole- 4,5 µlNBT+3,5µl BCIP x ml) in the dark for several hours (it depends from experiments) monitoring the signal at RT. Monitor color development and change solution if it accumulates precipitated crystals or if it undergoes color change from yellow to purple. After full color development (4-250 hours);
4. Wash tissues 2 X 5min at 25°C with 1mL/tube of NTMT containing 2mM levamisole;
5. Incubate tissues overnight at 4°C in 1mL/tube of PBS containing 4% paraformaldehyde post-fixative;
6. To bleach the tissues (if need be), incubate tissues for 30min at 25°C in 1mL/tube of PBSTw containing 3% H₂O₂;
7. Wash extensively with PBS;
8. Add aqueous mounting (glycerin/gelatin) on the sections which are covered by a cover slide.

Color development solution NTMT (100mM Tris-HCL pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.2mM sodium azide, 0.22µm filtered). Immediately prior to use, add 2mM levamisole and 0.1% Tween™ 20.

Risultati e Discussione

La localizzazione di corpi cellulari e fibre per DA-, NA-, OA-ir nel sistema nervoso centrale del polpo, *Octopus vulgaris*, è stata analizzata con grande dettaglio nelle diverse sezioni e immagini selezionate sono state fotografate. Il pattern di immunoreattività rivelato è stato consistente tra individui diversi e non sono risultate evidenti differenze tra animali di diverso sesso. Un riassunto schematico dei risultati sono riassunti in Tabella 3.1 e sono qui confrontati con quelli ottenuti dopo ibridazione in situ.

La descrizione è organizzata per masse e in senso antero-posteriore.

Massa sopraesofagea

Superior Buccal Lobe. Centro motorio deputato al controllo delle azioni legate al “feeding”, il lobo buccale superiore è connesso con la bozza, la massa buccale, le braccia (da un lato) e il lobo subverticale attraverso il subfrontale. Continua posteriormente e lateralmente con i due lobi buccali posteriori i cui neuropili appaiono continui (Young, 1971).

Cellule. La positività riconosciuta è per NA disposte nello strato dorsale e in parte di quello ventrale (20 μ m). Non sono risultate evidenti positività per DA e OA.

Fibre. Sono distinguibili fibre positive di tutte e tre le amine biogene considerate. Alcune fibre DA sono evidenti decorrendo esternamente a livello degli strati dorsale e ventrale con orientamento circolare. Le numerose fibre NA sono invece riconoscibili nel neuropilo interno dove sono orientate tangenzialmente e sembrano procedere verso il lobo buccale posteriore. Maggiore densità di fibre positive è osservabile in prossimità dello strato cellulare. Numerosissime fibre

octopaminergiche sono presenti già a partire dall'inizio del buccale (a livello del posterior salivary gland nerve) fin verso il lobo buccale posteriore. Si rinvengono anche sparse fibre OA positive nei nervi labiali e una forte marcatura di bundle di fibre intrasecantisi distribuite intorno ai nervi labiali. D'altro canto le fibre NA-IR non sono presenti nei nervi labiali e della ghiandola salivare posteriore, tuttavia sono rinvenibili distribuite intorno a questi nervi. A livello del connettivo cerebro-brachiale si rinvengono numerosissime fibre NA-IR e soprattutto OA-IR, ma poche DA-IR.

Inferior Frontal Lobe. Considerato come un sistema composto da una serie di lobi e strutture con la funzione di elaborazione e storage delle informazioni chemiotattili, il lobo è caratterizzato da un neuropilo in matrice unica dove sono comunque distinguibili "isole" dovute a gruppi di fibre e tratti. A livello del subfrontale si rinvengono molte cellule amacrine. Le fibre che originano dal lobo decorrono verso il centro a raggiungere il frontale superiore. Da qui o direttamente procedono verso il vertical e subverticale.

Cellule. Così come nel lobo buccale le sole cellule positive osservate sono NA distribuite nello strato cellulare a livello dorsale e parte del ventrale (20 μm).

Fibre. Positività è notata in fibre marcate con OA-IR e NA-IR. Così come in precedenza le fibre DA formano un leggero plesso circolare che circonda lo strato cellulare. Tuttavia, esse sono più evidenti nel lobo subfrontale, suggerendo un collegamento diretto con quello del frontale inferiore. Tali fibre DA-IR procedono verso il basso (inferior frontal verso il subfrontal) circondando le cellule amacrine, e procedono lungo il frontale laterale a raggiungere la commissura cerebro-brachiale.

Analogamente fibre NA-IR creano una rete che circonda lo strato cellulare (orientamento circolare); tale rete è più diffusa di quella delle fibre DA. Nel neuropilo tali fibre appaiono più rare rispetto al buccale. Nel subfrontale, invece, le fibre procedono direttamente verso il connettivo cerebro-brachiale.

Le fibre più abbondanti del lobo frontale inferiore sono quelle octopaminergiche.

La distribuzione della positività da' l'idea di una rete che circonda la struttura a "isola". Sono evidenti correre parallele o trasversali al piano di taglio (coronale) alternantisi ad aree dove la positività non è visibile. Verso il subfrontale e il posterior buccal, le fibre positive all'octopamine sono nella grande maggioranza.

Superior frontal lobe

Questo lobo disposto a mo' di fascia anteriore tra i lobi frontale inferiore e verticale si distingue una porzione laterale (una per lato) e una mediana. La parte mediana è continua con le parti laterali che riceve input dagli altri lobi. Le fibre del lobo mediano raggiungono prevalentemente il lobo verticale con pochi fasci che proseguono verso il lobo subverticale. Deputati al controllo (positivo) dell'attacco ricevono input dai lobi ottici.

Cellule. Lo strato esterno di cellule della parte mediana mostra una chiara positività NA-IR. In queste aree si rinvengono anche cellule positive per DA e OA. Tuttavia, in contrasto con l'evidente positività NA in questi altri casi il segnale sembra più una leggera rete distribuita intorno ai corpi nucleari di queste cellule piccole (< 5 µm in diametro). Tali cellule hanno poco citoplasma così che diventa difficile distinguere se il segnale appartiene alle fibre che le circondano o alle cellule stesse.

Analogamente accade al livello delle parti laterali. Il lobo subfrontale, invece mostra esclusivamente positività per DA e NA (< 10 µm).

Fibre. Il lobo mediano superiore frontale mostra un diverso pattern per i tre modulatori. Nel suo neuropilo interno sono presenti solo fibre octopaminergiche. Queste sembrano originarsi dallo strato cellulare del lobo e intrecciano nella parte centrale del neuropilo e raggiungono i lobi laterali e quello subfrontale. Una rete di media-trama circonda anche le cellule procedendo verso la parte laterale. Il neuropilo del median superior frontale manca di fibre DA e NA-IR. Queste ultime sono solo presenti nello strato di cellule a formare una leggera rete. Tali processi così come le fibre OA raggiungono le parti laterali. Per il subfrontale si conferma quanto descritto. Le cellule DA e NA qui presenti appaiono connesse con una rete complessa di fibre estesa tra la parte ventrale del mediano superior

frontal and il subfrontale.

The basal lobe system

Il sistema del lobo basale include anterior basal, median basal, lateral basal e dorsal basal. In aggiunta il posterior basal ('occipital lobe' di Thore 1939) include il subverticale, subpeduncular, e il precommissurale. Esso è un importante stazione di controllo motorio superiore che riceve e proietta da e verso lobi ottici e centri motori sottoesofagei. Le fibre creano un complesso sistema di "bundles" ai lati dell'esofago a confluire nei connettivi anterior basal-suboesophageal o posterior basal-suboesophageal. Basale laterale e mediano controllano molte funzioni motorie e regolative incluso l'orientamento e il body patterning.

Infine, il lobo dorsale basale occupa tutta la parte superiore posteriore della massa sopraesofagea sotto verticale e subverticale, e sopra il lobo mediano basale e le sue connessioni sembrano interessare l'elaborazione di modelli di azione di difesa e prevenzione e alcune attività viscerali.

Cellule. Mancano cellule dopaminergiche. Corpi cellulari positivi per NA e OA sono riconoscibili in tutte le strutture del lobo basale (anterior, median, lateral and dorsal basal). Tuttavia queste sono principalmente frequenti nelle pareti laterali e ventrali. A questo livello il gran numero di cellule NA-IR e OA-IR cell bodies rappresenta tuttavia solo una piccola popolazione dell'intero strato di cellule. Cellule noradrenergiche sono tuttavia in numero inferiore di quelle octopaminergiche. La sola eccezione è data dal basale dorsale dove tale proporzione è invertita. Inoltre, è evidente che procedendo dalla parte anteriore (lobo anteriore basale) attraverso la parte mediana e laterale, fino alla parte dorsale (lobo dorsale basale), entrambi i tipi di corpi cellulari immunoreattivi sono stati trovati meno frequentemente.

Fibre. Fibre DA-IR sono presenti nel sistema basale, ma principalmente di connessione tra il lobo basale e il lobo magnocellulare. DA-IR fibre sono molto meno di NA-IR e OA-IR, che si presentano come un collegamento tra

i lobi circostanti (lobi verticali e subverticali) e il lobo attraverso il sistema magnocellulare lobo basale (la rotta di attraversamento). Alcuni DA-IR fibre sono presenti anche vicino alla commissura ottica, come una rete tra il lobo subverticali e la commissura ottica. D'altra parte, numerose fibre NA-IR e IR-OA stati visti attraverso il neuropilo del sistema basale. I NA-IR processi nel lobo anteriore basale sembrano essere longitudinale all'asse anteriore e posteriore non sono così tanto. Muovendo verso la parte posteriore del resto del lobo anteriore basale, i NA-IR fibre erano sempre più numerosi (come per le cellule) e più discendente. Anche nei lobi laterali mediani basali del numero di fibre è enorme. Inoltre è interessante notare che nel lobo dorsale basale, commissura ottica è prevalentemente ricca di paralleli NA-IR fibre che sono direttamente collegati ai tratti ottici, anche se essi sono stati trovati (vedi sotto). Nella parte più posteriore NA-IR fibre rappresentano uno strato circostante (netto) che dalla parte ventrale del lobo basale raggiungere attraverso la parte laterale del lobo verticale. Ultimo ma non meno importante, l'enorme quantità di OA-IR fibre del sistema basale è impressionante. L'unica 'riduzione' rilevabile è nel lobo dorsale basale. L'OA-IR modello è la corrispondenza con la connessione della struttura: longitudinale, trasversale e parallela secondo la connessione delle strutture. Anche per le fibre dell'octopamina c'è una forte evidenza nella commissura ottica.

Lobi verticali e subverticali

Il lobo verticale è più grande in octopods che in qualsiasi altri cefalopodi ei suoi strati cellulari Cellule. Poche celle visibili positivi per tutti i tre ammine biogene sono visibili solo vicino ai fasci che collegano il circonvoluzioni al lobo subverticali. In questa regione è possibile seguire un piccoli gruppi di cellule positive lungo la parete accanto a questo collegamento. Nello strato delle cellule spessore di tutti le circonvoluzioni, analogamente al lobo frontale superiore, è possibile visualizzare una fitta rete che circonda i nuclei delle cellule amacrine (quasi 3 micron di diametro e con citoplasma poco). Ma, anche in questo caso, sulla base di questa particolare disposizione delle cellule Sono dubbio se il segnale è nelle cellule o around loro. Altri DA-IR cellule sono presenti nel

gruppo centrale di isole di cellule nella parte centrale del lobo subverticale. Fibre. Ancora una volta, come in lobi precedenti, tutte le tre neuromodulatori dare un segnale positivo per le fibre che, in questo caso, circondano in un modello circolare, come una rete, la spessa parete cellulare in ogni giro. Lo spessore delle fibre positive aumentare nel seguente ordine OA > NA > DA. All'interno di ciascuna delle fibre gyrus positivi ai tre anticorpi sono anche orientata in un modello orientato verso discendente subverticale lungo i fasci che nascono dal piccolo numero di grandi cellule micron (5-10). Nel lobo subverticale il modello dei tre neuromodulatori è diversa. DA-IR fibre sono assemblati in discendente ben ordinata, longitudinale e trasversale all'interno della struttura. NA-IR fibre di dare un modello più intrecciato. Invece OA-IR fibre sono certamente, nuovamente, il più abbondante rispetto alle altre due, e danno una rete più complessa intrecciati.

Lobo Ottico

Celle. Poche cellule sembrano positivo DA-IR e IR-NA sparsi in tutte le zone dello strato esterno della corteccia esterna. Nella stessa regione, invece, molte cellule appaiono positive per OA-IR. Nello strato interno senza cellule positive per tutti i tre modulatori sono visti. Sempre nel midollo non ero in grado di vedere le cellule positive. Dall'altro lato, invece, vi è una differenziazione tra le strutture del 'complesso peduncolo'. La ghiandola ottica mostra segnali positivi per DA-IR e NA-IR cellule circondato da una rete di fibre. In questo OA ghiandola non sembrano essere presenti, ma intorno ad esso, pochi OA-IR cellule appare. Invece nel peduncolo molti complessi OA-IR cellule vengono osservate. Essi sono localizzati sia nella olfattiva e nei lobi peduncolo, circondato da molte fibre. Fibre. Uno dei più importanti risultati del lobo ottico è la positività diversa nello strato plessiforme della retina profunda. Come riportato sopra dello strato plessiforme è diviso in otto strati di processi (4 radiali e 4 tangenziali). Non ci sono dati in letteratura al meglio delle mie conoscenze sul significato e la funzione di questi diversi livelli. DA-IR fibre sono visti solo in 1a e 2a strati tangenziali. I NA-IR fibre coprire solo gli strati 2 radiali e tangenziali. Infine i OA-IR fibre sono

presenti sia negli strati 2 e 4 radiali, e nelle prime e quarte strati tangenziali. La distribuzione di segnali nella medulla interna è diversa, ma immunoreattività positiva per tutti i tre neuromodulatori è chiara. OA-IR fibre sono, ancora una volta, il più abbondante, e dare una rete più complessa intrecciata. Molto vicino al lobo ottico e il complesso peduncolo aumentano in numero (vedi sopra per le cellule). Così, l'immunoreattività positiva nel tratto ottico conferma di quanto sopra riportato nella massa supraesophageal, come per NA-IR fibre. Nella midollare interna e nel tratto ottico il NA-IR e IR-DA fibre hanno un andamento simile, sebbene DA-IR è meno frequente.

Massa sottoesofagea

Anteriore massa suboesophageal.

La massa suboesophageal lobo anteriore comprende brachiale, consistente in Octopus di due parti, una anteriore, il lobo prebrachial e una posteriore, il lobo postbrachial. Questa è la stazione da cui le otto nervi brachiali che raggiungono gli otto bracci (cordoni nervosi) sono originari. Dorsalmente, le cerebro-brachiale connettivi immette lateralmente trasporto sia ascendente e discendente fibre. Posteriormente è continua con la massa suboesophageal mezzo e un brachio-palliovisceral connettivo lati fibre trasporta da e verso la massa suboesophageal posteriore. Le cellule presenti in questo lobo sono una miscela di alcune celle medie moderatamente grandi (più grande rispetto alla parte posteriore) e molti ma pochi quelli molto piccoli (con nuclei 5-10 micron).

Cellule. Nella parte anteriore (lobo prebrachial) alcune DA-IR cellule sono visibili formare uno strato discendente di cellule specializzate. Questo modello per DA continua in tutta la regione anteriore (lobo brachiale). In questa parte anteriore ci sono OA-IR cellule. NA-IR cellule sono assenti nel lobo prebrachial ma con la formazione del lobo brachiale è circondato tutto lo strato di cellule (ventralmente, lateralmente e dorsalmente) da una rete di fibre NA-IR. Fibre. Nelle reti di intrecciando fibre del neuropilo, OA-NA-IR e IR fibre erano abbondanti. NA-IR fibre sono stati meno aspetti, ai OA-IR. Nella parte posteriore (lobo brachiale) aumentano di numero circostante, come sopra descritto, le cellule

grandi (ventralmente, lateralmente e dorsalmente). Inoltre, nella zona neuropile sono identificabili alcune fibre longitudinali (visto in questo piano come punti). La quantità di OA-IR fibre è impressionante e sembrano palle di lana nella regione neuropile. Essi sono espressi ovunque. Il modello di DA-IR fibre, invece, è diverso. Come sopra descritto, risulta essere presumibilmente collegato alla DA-IR cellule che formano una rete discendente.

La massa suboesophageal centrale comprende i neuroni che formano intermedi o centri motori inferiori e sono coinvolti in quasi tutte le azioni di un polpo. Queste cellule innervano le braccia, l'imbuto, i muscoli retrattori della testa, gli occhi, e anche i cromatofori della parte anteriore del corpo. Dorsalmente, a metà linea, si trova al di sotto del seno venoso perioesophageal, lateralmente riceve il subesophageal anteriore basale e mediana basale-suboesophageal connettivi e piccoli tratti dai lobi ottici e del peduncolo. Le regioni che possono essere riconosciuti all'interno della massa suboesophageal mezzo sono il lobo pedale, anteriore e posteriore, e una coppia di lobi chromatophore anteriori. Celle. Nel lobo chromatophore qualche DA-IR e NA-IR cellule sono presenti, OA-IR sono molto pochi. Nel lobo pedale (anteriore e posteriore) positività per il DA non è semplice da capire. Il segnale è molto alto, ma sembra essere presente in tutto il mondo (per maggiori dettagli vedere di seguito i risultati in situ). NA-IR cellule siano ben visibili nel lobo pedale anteriore e nel lobo pedale posteriore. Nella parte anteriore sono localizzate nella parte ventrale e laterale dello strato di cellule, invece, nella parte posteriore sono visibili anche nella parte dorsale. Tutte queste cellule NA creare una rete circostante di fibre che scendono nella massa subesophageal. L'intera regione mediana è priva di cellule anche fortemente ricche di fibre OA-OA-IR IR. Fibre. Le fibre più abbondanti in questa regione della massa subesophageal sono OA-IR. Nella neuropilo della parte dorsale del lobo anteriore del pedale scendono dal lato, a cui è collegata la massa con la massa supraesophageal. Nella parte centrale, il nervo imbuto anteriore contiene molti OA-IR fibre. Andando verso la parte ventrale le fibre sono più intrecciati e aumentare di numero. Alcuni OA-IR fibre sono presenti anche nello strato cellulare. Commissura mediale del pedale

è ricco di trasversali OA-IR fibre, collega i due lati. D'altra parte, nel neuropilo NA-IR fibre erano meno di OA-IR con orientamento tangenziale. Le fibre OA più immunoreattive sono circa le cellule dello strato.

Diversamente, nel lobo chromatophore ci sono alcuni longitudinali OA-IR fibre e una rete intrecciata di NA-IR fibre

Posteriore massa suboesophageal

Le regioni che possono essere riconosciuti all'interno della massa suboesophageal posteriore sono: il lobo palliovisceral, una coppia di lobi chromatophore posteriori, i lobi vasomotori e il lobo magnocellulare. I lobi della massa suboesophageal posteriore controllare le operazioni del mantello e alcuni di quelli dei visceri.

Cellule. Nel lobo chromatophore posteriore ci sono solo alcuni DA-IR e NA-IR cellule, invece OA-IR sono molto pochi. Per quanto riguarda le cellule DA-IR, come per la massa suboesophageal centrale, non è semplice da comprendere la loro presenza. Il segnale continua ad essere molto alto, ma sembra essere presente in tutto il mondo (per maggiori dettagli vedere i risultati in situ). NA-IR cellule sono chiaramente visibili in tutti i lobi. Anche in questa regione, tutte le cellule NA creare una rete circostante che scendono nella massa suboesophageal lungo i nervi palliovisceral e imbuto. Anche in questo caso, come sopra nella massa suboesophageal mezzo, OA-IR cellule sono assenti anche fortemente ricco di OA-IR fibre.

Fibre. Come nel mezzo della massa suboesophageal, anche nella parte posteriore le fibre più abbondanti sono l'OA-IR. Il modello di distribuzione è simile: da dorsale a ventrale, via laterale più, discendente fibre, nella parte ventrale più intrecciati raggiungere l'imbuto posteriore e nervi palliovisceral, sotto. Alcuni OA-IR fibre sono presenti anche nello strato cellulare. Commissura mediale del pedale è ricco di trasversali OA-IR fibre, collega i due lati. Inoltre, più OA-IR fibre sono presenti nello strato cellulare intorno neuropilo, qualche discendente e altri come isola di fibre. La positività del fibre NA è molto simile alla parte centrale. Inoltre, qui la quantità di fibre negli strati laterali di cellule è più abbondante. L'imbuto posteriore e i nervi palliovisceral sono anche ricchi di fibre NA-IR.

I risultati ottenuti da esperimenti di ibridazione in situ sono particolarmente interessanti.

Per la tirosina idrossilasi il lobo buccale e, in particolare, nel lobo posteriore buccale, l'enorme quantità di cellule positive TH è impressionante. Essi rappresentano, possono essere, tutta la popolazione. Nel lobo frontale inferiore cellule TH molti positivi sono visti, come nei processi verso il lobo subverticale. Il subverticale contiene molte cellule anche nella parte ventrale. Allo stesso modo, nel lobo frontale superiore ci sono cellule TH positive, ma di nuovo le sue connessioni sono ricche di cellule. Il lobo anteriore basale contiene abbondanti cellule positive, in tutto lo strato, ventrale, laterale e dorsale. Quando l'inizio lobo subverticale (dal anteriore all'asse posteriore), vi è una forte positività delle cellule sul lato ventrale, ma diventa progressivamente più laterale e centrale verso la zona più posteriore. Nella zona centrale di questo lobo le cellule sono sparse ovunque. Il lobo basale verso la parte posteriore mostra lo stesso schema. È interessante notare che il collegamento della subverticali con le circonvoluzioni è caratterizzato dal gruppo di cellule. Nel lobo verticale, ci sono cellule positive poche ma grandi.

Lobo ottico. Il lobo ottico contiene molte cellule positive. Essi strato esterno della corteccia esterna sembra essere un numero elevato in rapporto al totale. Non c'è alcun segnale positivo nello strato plessiforme e nello strato interno della corteccia, ma la midollare interna chiusa ad esso mostrare molte cellule a raggiera. Tutta la zona interna del midollo contiene un grande numero di cellule TH. Infine, anche il complesso peduncolo, in tutte le sue componenti contiene una grande quantità di cellule TH.

Massa Sottoesofagea. Tutti i lobi della massa subesophageal contengono cellule TH positive. La localizzazione di queste cellule nel lobo prebrachial e brachiale è molto simile a quello sopra riportato per le cellule della dopamina. Notevolmente inferiori corpi cellulari TH positivi sono stati rilevati nella nella parte centrale che nella parte anteriore. Tuttavia, il segnale di cellule TH positivo aumenta procedendo attraverso le zone posteriori, dove c'è il numero maggiore di cellule.

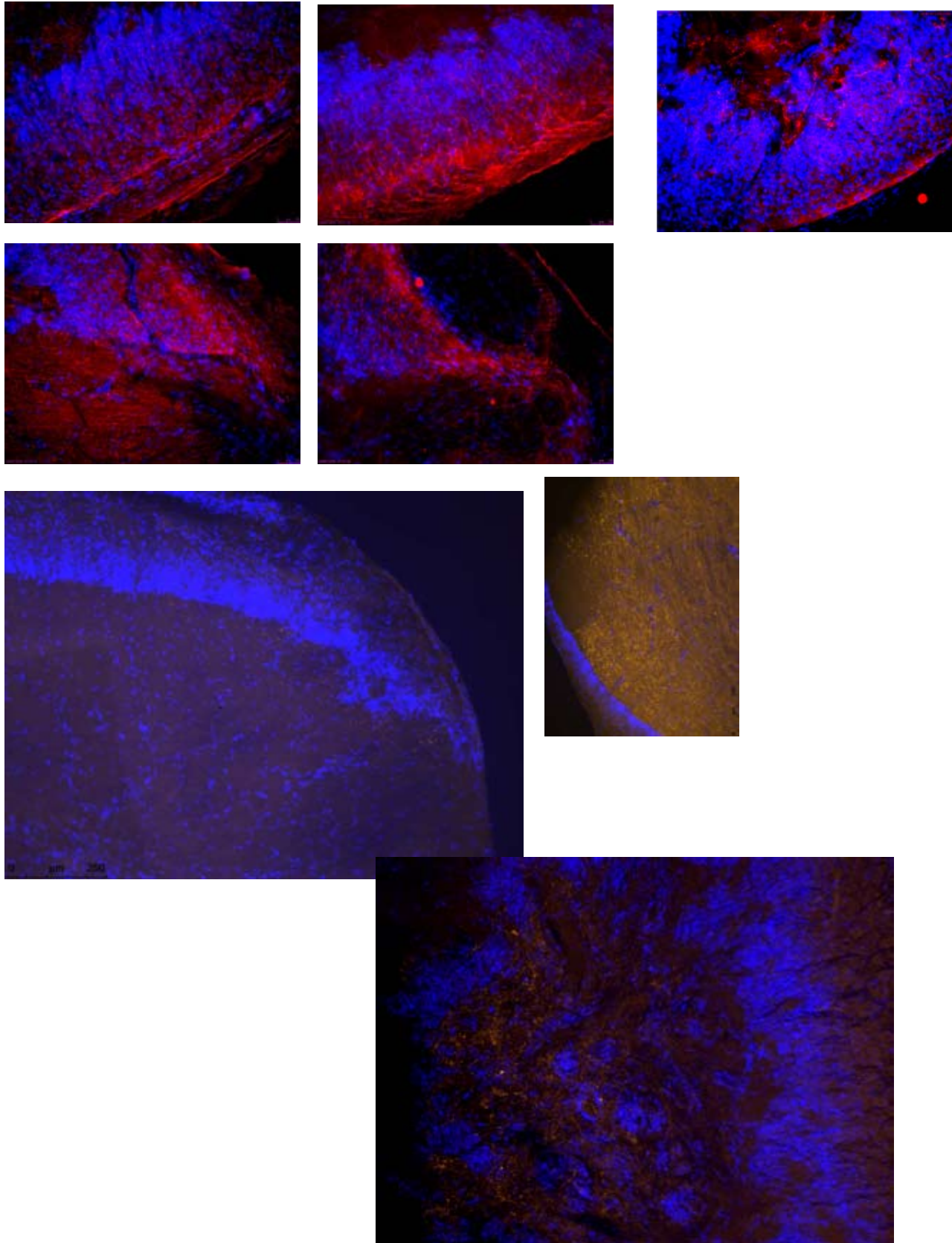
Per il Recettore della dopamina (DRD-1). Alcuni sporadici DRD-1 cellule positive

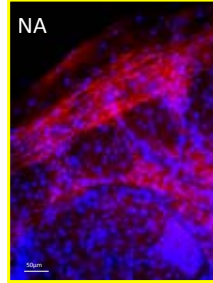
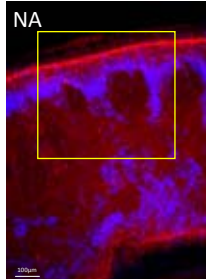
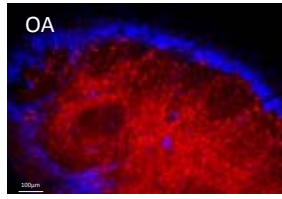
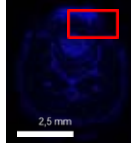
sono presenti nel lobo buccale, tuttavia, l'aumento del numero raggiungendo lobo posteriore buccale. Queste cellule sono meno di cellule TH in questo settore. Lo strato di cellule del lobo frontale superiore e inferiore indicano un numero di cellule positive DRD-1, invece del subfrontal e nel lobo laterale frontale superiore all'aumento numero. Il lobo basale contiene un gran numero di DRD-1 cellule positive, e in particolare il collegamento con il lobo subverticale mostrano un forte strato di queste cellule. Il subverticale è anche uno dei lobi con più positività, sulla dorsale, laterale e ventrale. Chiusa al collegamento tra le circonvoluzioni dei lobi verticali e subverticali abbiamo trovato lo stesso modello di DA-IR cellule sopra riportato. Lo stesso vale anche per la parte centrale della subverticale. All'interno della gyri alcune cellule grandi sono positive per DRD-1.

Massa Subesophageal. Tutti i lobi della massa subesophageal contengono DRD-1 cellule positive. La localizzazione di queste cellule nel lobo prebrachial e brachiale è molto simile a quello riportato sopra per DA-IR cellule, tuttavia il numero di cellule positive è più grande. Rispetto al TH risulta la DRD-1 positività nella parte centrale è sempre più grande. Inoltre, e in accordo con i risultati di cui sopra il segnale del DRD-1 cellule positive aumentano progredendo attraverso le aree posteriori. Il numero di queste cellule nella parte posteriore è impressionante.

Nelle pagine che seguono vengono riportate alcune immagini di sezioni con evidente positività descritta.

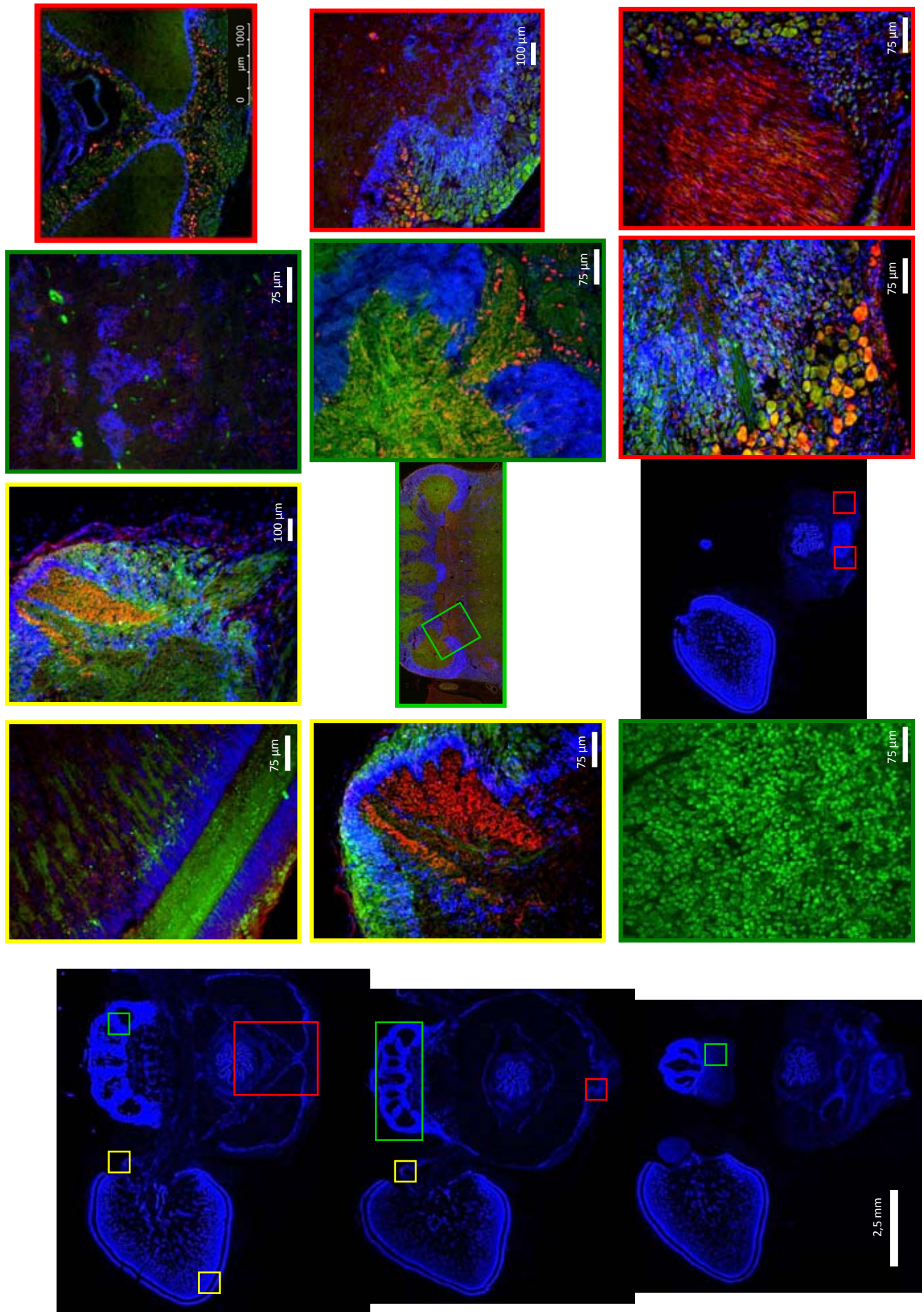
Gastric Ganglion and Stellate Ganglion (vibratome sections)
known for abundance of dopamine/noradrenaline/octopamine
No overlap in the distribution of positive reaction with the three antibodies





SEM





Distribution of GABAergic neuronal populations in the octopus brain: an immunofluorescence study

1 Abstract

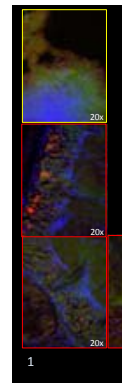
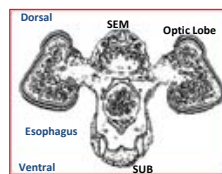
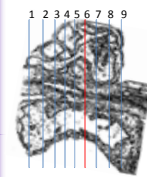
The identification of local populations of excitatory and inhibitory neurons is critical to understanding the anatomy of functional circuitry in the nervous systems of vertebrates and invertebrates alike. In addition to the numerous studies in which GABAergic inhibitory pathways have been characterized in diverse vertebrates, GABAergic neurons have also been identified in the nervous systems of a variety of invertebrates, including insects, marine and terrestrial arthropods, and cephalopods—most notably, the brain lobes of *Eledone cirrhosa* (the northern octopus). In the present study, we report the first characterization of GABAergic neuronal populations in the brain lobes of *Octopus vulgaris* using immunofluorescence labeling. In contrast to more traditional immunohistochemical staining techniques, immunofluorescence labeling allows the possibility of colocalization studies within the same tissue sample, and is therefore useful for investigating the spatial distribution of putatively inhibitory and excitatory populations of neurons.

Specifically, we found, that GABA immunoreactivity is localized to interneurons (amacrine cells) and their presynaptic contacts in the vertical and inferior and superior frontal lobes, i.e., those regions comprising the so-called 'vertical system', a structure considered analogous to limbic lobe. GABA immunoreactivity was also detected in various regions of the optic lobes. Co-labeling with an antibody against serotonin (5-HT), an excitatory neuromodulator in octopus, we found a characteristic distribution of the two in the neuronal structures. For example, in the optic lobe GABA resulted in cells of the outer and inner granular layers, whereas 5-HT is more evident in the plexiform zone. This suggests a typical arrangement of local inhibitory interneurons interacting with non inhibitory projections, similar to what appear in other invertebrate species



3 Results

Omission of primary or secondary antibodies resulted in no specific labelling between the antibodies in the octopus brain, as demonstrated by omission of either primary or secondary antibodies. The absence of relevant signal in control experiments



2 Background

GABAergic inhibitory pathways have been characterized in many Vertebrate and invertebrate species. Similarly, serotonin (5-HT) functions as a neurotransmitter in the nervous systems of simple as well as complex animals. Their intimate link is not limited to the fact of being considered essentially as of opposite function. In many cortical areas, for example, 5-HT receptors are localized on GABAergic interneurons. Activation of these interneurons enhances GABA release, which secondarily slows the firing rate of target cells.

A detailed analysis of the distribution of different modulators in the central nervous system of cephalopods is lacking. The table below summarizes data available for GABA and 5-HT in this taxon. A distinct lack of data regarding the precise distribution within the brain emerges.

A tabularized summary of data on distribution of GABA and 5-HT in different species of the Cephalopod molluscs (not exhaustive list). Data are presented for the three different masses: Optic lobes, supraesophageal (SEM) and subesophageal (SUB) masses.

References	Species	Methods	Optic Lobe	SEM	SUB	Completeness
Uemura et al., 1987	<i>O. vulgaris</i>	IHC		5-HT	5-HT	Incomplete
Cornwell et al., 1993	<i>E. cirrhosa</i>	IHC	GABA	GABA	GABA	Complete
Messenger, 1996	various	Biochemicals	GABA	GABA	GABA	Incomplete
			5-HT	5-HT	5-HT	Incomplete
Suzuki et al., 2000	<i>O. vulgaris</i>	IHC/IF	5-HT			Complete
Boyer et al., 2007	<i>S. officinalis</i>	IF		5-HT		Incomplete
Wollesen et al., 2010	<i>I. notoides</i>	IF	5-HT	5-HT	5-HT	Complete

5 Discussion

GABA and 5-HT are not uniformly distributed in the octopus brain. Serotonin immunolabelling appears much abundant in the anterior and lateral basal lobes; SUB: brachial, pallidum to play important associative sensory-motor functions. Serotonin result: serotonergic positive labelling mostly abundant in the lobules of the vertical lobe (read-in, read-out memory). Diffuse appears the distribution of GABAergic fibers in the lobes, SEM). GABA is also present in most fibers of the vertical lobe (or nerves) are mainly GABAergic (with positive serotonergic). Most evident positive labelling of tracts and nerves is observed in the positive immunostaining in the peduncle lobe.

This work provides for the first time mapping of GABAergic neuronal populations of neurons in the brain of this animal, with

3 Methods

We processed five brains of naïve *O. vulgaris* (n=5) with double-immunolabelling experiments by using polyclonal anti-Serotonin (rabbit, Sigma, 1:100) and monoclonal anti-GABA (mouse, Sigma, 1:500). The antigen-antibody binding sites were visualized using Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG1 (1:200). Cell nuclei were labelled with DAPI. Sections were observed under Leica Fluorescence microscope equipped with specific filters.

nervous system of *Octopus vulgaris*:

Giovanna Ponte¹, Graziano Fiorito¹, David B. Edelman²

¹Octopus Behavioral Biology, Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli, Naples, Italy

²The Neurosciences Institute, San Diego, California

136.5

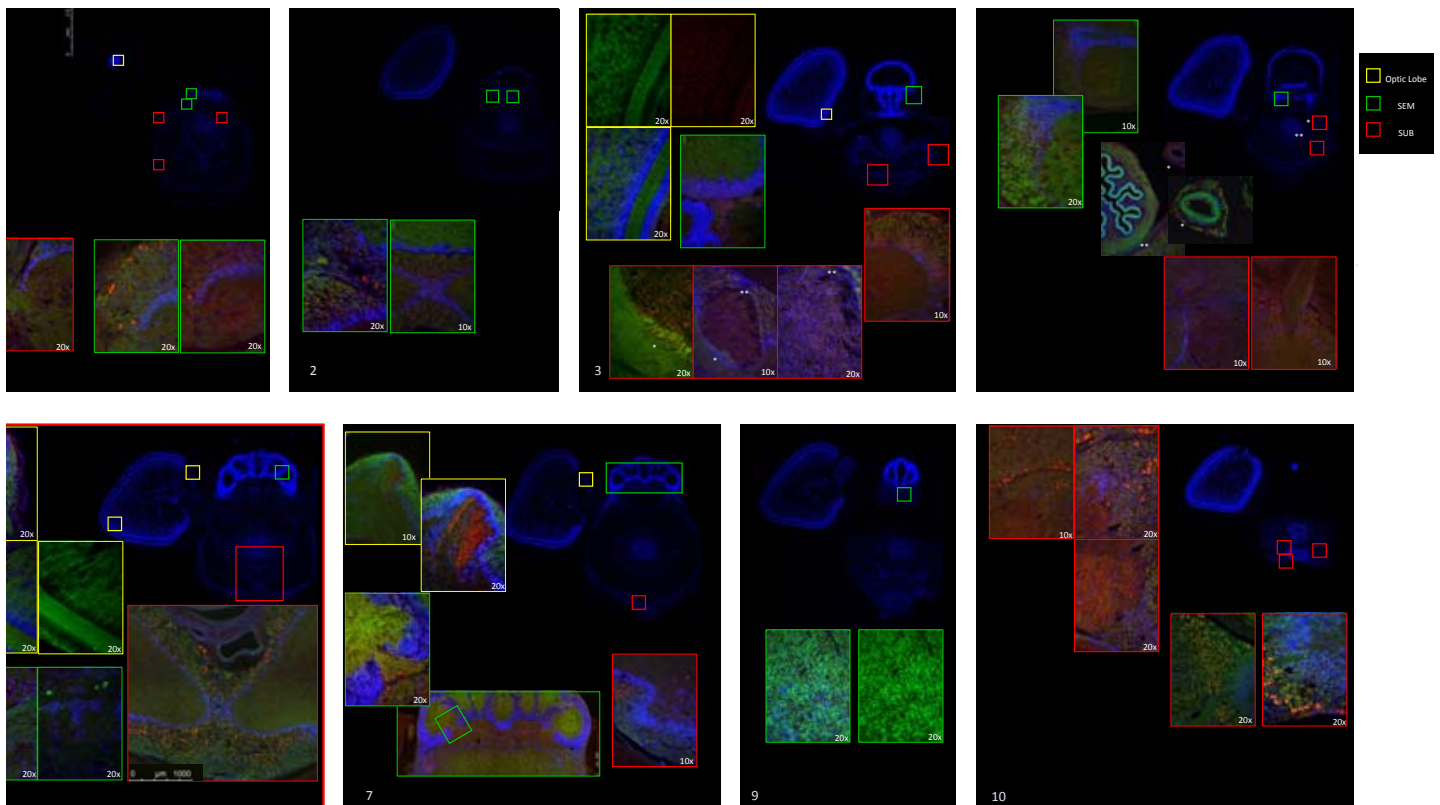


email: Giovanna Ponte – giovanna.ponte@szn.it

lary antibodies in immunolabelling experiments
g. Additionally, the absence of cross-reactivity
double-immunolabelling experiments was
me of the primary antibodies and consecutively
etection.

The distribution of immunoreactive cell bodies and fibers within the brain of *O. vulgaris* is summarized in the figures below. Each figure is numbered (1-9) according to the schematic drawing and arranged according to antero-posterior direction.

Every figures include a complete picture of the arrangements of cells in the whole brain lobes (Dapi, blue; nuclear staining). The optic lobe of only one side is presented. GABA-immunoreactivity (green), and serotonin-immunoreactivity (red)



brain of the octopus. In addition, co-localization occurs in few cases.

: in lobes which are known to play a role in higher coordination of motor patterns and feeding (SEM: buccal, visceral and chromatophore lobes). Furthermore, 5-HT is also localized in cells and fibers of lobes considered as (SEM: inferior and superior frontal, vertical lobes). However, a distinctive distribution of 5-HT in these lobes is abundant in lateral cell layers and fibers. Peculiar appears the presence of 5-HT cells and fibers in the lateral layer and associative function).

s in the whole brain, with specific regions of distinctive abundance (e.g. buccal, inferior frontal and vertical tracts and nerves both in SUB and SEM. It is noteworthy to report that our data show that in some cases tracts of GABAergic labelling surrounding; e.g. sub-frontal to vertical tract). As opposite, in SUB serotonin provides the e.g. brachial to palliovisceral tract) with GABAergic neurons in their contour. Remarkable is the segregation of

GABAergic and serotonergic neuronal populations in the brain lobes of the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*. Double labeling allowed us to investigate the reciprocal relation of putatively inhibitory and excitatory with unprecedented accuracy.

6 Bibliography

- Uemura *et al.*, 1987. *Brain Research*, 406: 73-86.
- Cornwell *et al.*, 1993. *Brain Research*, 621: 353-357.
- Messenger, 1996. *Invertebrate Neuroscience*, 2: 95-114.
- Suzuki *et al.*, 2000. *Brain Research*, 865: 168-176.
- Boyer *et al.*, 2007. *Brain Research*, 1133: 53-66.
- Wollesen *et al.*, 2010. *Cell and Tissue Research*, October 27 (on line).

Acknowledgments

We are grateful to H. Makarenkova (NSI) for advice.

Il pattern di positività osservato per le cellule e fibre di dopamina, noradrenalina e octopamina nei centri nervosi superiori del polpo mostrano che benché largamente distribuiti queste amine biogene individuano territori di competenza nel cervello.

Ne sono di esempio il caratteristico pattern di fibre positive all'interno dello strato plessiforme della retina profonda nel lobo ottico dove i diversi strati (radiali e tangenziali) si sovrappongono solo in parte quando octopamina e dopamina o noradrenalina sono considerati. In analogia un pattern distinto si rileva nei centri della massa sopra e sotto esofagea dove dopamina e octopamina appaiono ben distinte tra lobi di competenza chemio-tattile e visivo e dove i centri considerati di processamento motorio a diversi livelli (sopra e sotto esofagea) mostrano pattern caratteristici.

Un discorso a parte merita la noradrenalina. Essa sembra meno abbondante rispetto agli altri ma un pattern diffuso di fibre appare nella grande maggioranza dei lobi considerati.

E' da rilevare che le circa 200 milioni di cellule che costituiscono il sistema nervoso centrale di octopus non sono tutti neuroni. Benché non e' stata finora individuata la struttura e/o la partecipazione delle cellule di supporto alla numerosità in cellule dei diversi lobi, Young (1971) suggerisce che almeno la metà di questa popolazione sia da imputare a cellule di supporto.

Studi futuri saranno urgenti per:

1. valutare e convalidare con approcci di farmacologia comportamentale il diverso ruolo di dopamina e octopamina nel sistema visuo-tattile del polpo;
2. valutare i livelli di modulatori presenti e misurarne la variabilità inter-individuale;
3. tentare di 'co-localizzare' competenze nelle cellule e fibre da parte di territori nervosi distinguendo da quelli di cellule di supporto.

Reference List

- Abler, L. L., Mehta, V., Keil, K. P., Joshi, P. S., Flucus, C. L., Hardin, H. A., Schmitz, C. T., and Vezina, C. M.** (2011). A high throughput in situ hybridization method to characterize mRNA expression patterns in the fetal mouse lower urogenital tract. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J., and Ram, S. J.** (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Albertin, C. B., Bonnaud, L., Brown, C. T., Crookes-Goodson, W. J., da Fonseca, R. R., Di Cristo, C., Dilkes, B. P., Edsinger-Gonzales, E., Freeman, J., Hanlon, R. T., Koenig, K. M., Lindgren, A. R., Martindale, M. Q., Minx, P., Moroz, L. L., Näf, M. T., Nyholm, S. V., Ogura, A., Pungor, J. R., Rosenthal, J. J. C., Schwarz, E. M., Shigeno, S., Strugnelli, J. M., Wollesen, T., Zhang, G., and Ragsdale, C. W.** (2012). Cephalopod Genomics: A Plan of Strategies and Organization. *Standards in Genomic Sciences; Vol 7, No 1 (2012): Standards in Genomic Sciences*.
- Allen, A., Michels, J., and Young, J. Z.** (1986). Possible interactions between visual and tactile memories in *Octopus*. *Mar.Behav.Physiol.* **12**, 81-97.
- Altman, J. S.** (1971). Control of accept and reject reflexes in the octopus. *Nature* **229**, 204-206.
- Aronson, R. B.** (1991). Ecology, paleobiology and evolutionary constraint in the octopus. *Bull. Mar.Sci.* **49**, 245-255.
- Bardou, I., Maubert, E., Leprince, J., Chichery, R., Cocquerelle, C., Launay, S., Vivien, D., Vaudry, H., and Agin, V.** (2009). Distribution of oxytocin-like and vasopressin-like immunoreactivities within the central nervous system of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Cell Tissue Res.* **336**, 249-266.
- Berry, J. A., Cervantes-Sandoval, I., Nicholas, E. P., and Davis, R. L.** (2012). Dopamine Is Required for Learning and Forgetting in *Drosophila*. *Neuron* **74**, 530-542.
- Bone, Q. and Howarth, J. V.** (1980). The Role of L-Glutamate in Neuromuscular-Transmission in Some Mollusks. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **60**, 619-626.
- Bone, Q., Pulsford, A., and Chubb, A. D.** (1981). Squid Mantle Muscle. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **61**, 327-342.
- Borrelli, L., Gherardi, F., and Fiorito, G.** (2006). *A Catalogue of Body Patterning in Cephalopoda* pp. 1-626. Napoli, Italy: Stazione Zoologica A. Dohrn; Firenze University Press.
- Borrelli, L.** (2007). Testing the contribution of relative brain size and learning capabilities on the evolution of *Octopus vulgaris* and other cephalopods. 1-451., Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli, Italy; Open University, London, UK.
- Borrelli, L. and Fiorito, G.** (2008). Behavioral Analysis of Learning and Memory in Cephalopods. In: *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (ed. Editor-in-Chief: Byrne, J. J.), pp. 605-627. Oxford: Academic Press.
- Boycott, B. B.** (1954). Learning in *Octopus vulgaris* and other cephalopods. *Pubbl.Staz.Zool. Napoli* **25**, 67-93.
- Boyer, C., Maubert, E., Charnay, Y., and Chichery, R.** (2007). Distribution of neurokinin A-like and serotonin immunoreactivities within the vertical lobe complex in *Sepia officinalis*. *Brain Res.* **1133**, 53-66.
- Boyle, P. R.** (1991). *The UFAW Handbook on the Care and Management of Cephalopods in the Laboratory* pp. 1-63. Potters Bar: Universities Federation for Animal Welfare.

- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O.** (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* **68**, 815-834.
- Bullock, T. H.** (1965). Mollusca: Cephalopoda. In: *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*, vol. II (eds. Bullock, T. H. and Horridge, G. A.), pp. 1433-1515. San Francisco and London: W.H. Freeman and Company.
- Bullock, T. H.** (1965). Mollusca: Amphineura and Monoplacophora. In: *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*, vol. II (eds. Bullock, T. H. and Horridge, G. A.), pp. 1273-1281. San Francisco and London: W.H. Freeman and Company.
- Bullock, T. H.** (1965). Mollusca: Gastropoda. In: *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*, vol. II (eds. Bullock, T. H. and Horridge, G. A.), pp. 1283-1386. San Francisco and London: W.H. Freeman and Company.
- Bullock, T. H.** (1965). Mollusca: Pelecypoda and Scaphopoda. In: *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*, vol. II (eds. Bullock, T. H. and Horridge, G. A.), pp. 1387-1431. San Francisco and London: W.H. Freeman and Company.
- Cajal, S. R.** (1917). Contribución al conocimiento de la retina y centros opticos de los Cephalopodos. *Trab.Lab.Invest.biol.Univ.Madrid* **15**, 1-83.
- Capasso, A., Carginale, V., Madonna, L., Mancaniello, D., Scudiero, R., Deprisco, P. P., Depetrocellis, B., and Parisi, E.** (1991). A Dopamine-Sensitive and Octopamine-Sensitive Adenylate-Cyclase in the Nervous-System of Octopus-Vulgaris. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **100**, 805-808.
- Capasso, A., Carginale, V., Borrelli, L., and Parisi, E.** (1993). Receptor-Mediated Inhibition of Octopamine-Stimulated Adenylate-Cyclase in the Optic Lobe of Octopus-Vulgaris. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **106**, 555-559.
- Chapko, M. K.** (1962). *Devilfish. A Practical Guide to the Dissection of Octopus*. pp. 1-40. N.J.: Wayne.
- Chrachri, A. and Williamson, R.** (2004). Cholinergic and glutamatergic spontaneous and evoked excitatory postsynaptic currents in optic lobe neurons of cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Brain Research* **1020**, 178-187.
- Clarke, M. R.** (1988). Evolution of buoyancy and locomotion in recent cephalopods. In: *The Mollusca. Paleontology and Neontology of Cephalopods*, vol. 12 (eds. Clarke, M. R. and Trueman, E. R.), pp. 203-213. San Diego: Academic Press, Inc.
- Clarke, M. R.** (1988). Evolution of recent cephalopods - A brief review. In: *The Mollusca. Paleontology and Neontology of Cephalopods*, vol. 12 (eds. Clarke, M. R. and Trueman, E. R.), pp. 331-340. San Diego: Academic Press, Inc.
- Clymer, J. C.** (1973). A computer simulation model of attack-learning behavior in the octopus. 1-129., The University of Michigan.
- Cobb, J. L. S. and Pentreath, V. W.** (1978). Comparison of Morphology of Synapses in Invertebrate and Vertebrate Nervous Systems - Analysis of Significance of Anatomical Differences and Interpretation of Morphological Specializations. *Progress in Neurobiology* **10**, 231-252.
- Cornwell, C. J., Messenger, J. B., and Williamson, R.** (1993). Distribution of Gaba-Like Immunoreactivity in the Octopus Brain. *Brain Research* **621**, 353-357.
- D'Aniello, A., Nardi, G., DeSantis, A., Vetere, A., diCosmo, A., Marchelli, R., Dossena, A., and Fisher, G.** (1995). Free L-amino acids and D-aspartate content in the nervous system of Cephalopoda. A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **112**, 661-666.

- Denton, E. J. and Gilpin-Brown, J. B.** (1973). Floatation mechanisms in modern and fossil cephalopods. *Adv.Mar.Biol.* **11**, 197-268.
- Denton, E. J.** (1974). On buoyancy and the lives of modern and fossil cephalopods. *Proc.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* **185**, 273-299.
- Di Cosmo, A., Paolucci, M., and Di Cristo, C.** (2004). N-methyl-D-aspartate receptor-like immunoreactivity in the brain of Sepia and Octopus. *Journal of Comparative Neurology* **477**, 202-219.
- Di Cosmo, A., Di Cristo, C., and Messenger, J.** (2006). L-Glutamate and its ionotropic receptors in the nervous system of cephalopods. *Current Neuropharmacology* **4**, 305-312.
- Dilly, P. N., Gray, E. G., and Young, J. Z.** (1963). Electron Microscopy of Optic Nerves and Optic Lobes of Octopus and Eledone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character.* *Royal Society (Great Britain)* **158**, 446-456.
- Edelman, D. B. and Seth, A. K.** (2009). Animal consciousness: a synthetic approach. *Trends in Neurosciences* **32**, 476-484.
- Edgecombe, G. D., Giribet, G., Dunn, C. W., Hejnol, A., Kristensen, R. M., Neves, R. C., Rouse, G. W., Worsaae, K., and Sorensen, M. V.** (2011). Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution* **11**, 151-172.
- Finn, J. K., Tregenza, T., and Norman, M. D.** (2009). Defensive tool use in a coconut-carrying octopus. *Current Biology* **19**, R1069-R1070.
- Fiorito, G., Vonplanta, C., and Scotto, P.** (1990). Problem-Solving Ability of Octopus-Vulgaris Lamarck (Mollusca, Cephalopoda). *Behavioral and Neural Biology* **53**, 217-230.
- Fiorito, G. and Scotto, P.** (1992). Observational-Learning in Octopus-Vulgaris. *Science* **256**, 545-547.
- Fiorito, G.** (1993). Social-Learning in Invertebrates - Response. *Science* **259**, 1629.
- Florey, E., Dubas, F., and Hanlon, R. T.** (1985). Evidence for L-Glutamate As A Transmitter Substance of Motoneurons Innervating Squid Chromatophore Muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **82**, 259-268.
- Florey, E. and Kriebel, M.** (1969). Electrical and mechanical responses of chromatophore muscle fibers of the squid, *Loligo opalescens*, to nerve stimulation and drugs. *Z.Vgl. Physiol.* **65**, 98-130.
- Gaston, M. R. and Tublitz, N. J.** (2004). Peripheral innervation patterns and central distribution of fin chromatophore motoneurons in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J.Exp.Biol.* **207**, 3089-3098.
- Grasso, F. W. and Basil, J. A.** (2009). The Evolution of Flexible Behavioral Repertoires in Cephalopod Molluscs. *Brain Behavior and Evolution* **74**, 231-245.
- Gray, E. G. and Young, J. Z.** (1964). ELECTRON MICROSCOPY OF SYNAPTIC STRUCTURE OF OCTOPUS BRAIN. *The Journal of Cell Biology* **21**, 87-103.
- Gray, E. G.** (1969). Electron Microscopy of the Glio-Vascular Organization of the Brain of Octopus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **255**, 13-32.
- Grimaldi, A. M., Agnisola, C., and Fiorito, G.** (2007). Using ultrasound to estimate brain size in the cephalopod *Octopus vulgaris* Cuvier in vivo. *Brain Research* **1183**, 66-73.

- Gutnick, T., Byrne, R. A., Hochner, B., and Kuba, M.** (2011). Octopus vulgaris Uses Visual Information to Determine the Location of Its Arm. *Current Biology* **21** , 460-462.
- Haase, A., Stern, M., Wachtler, K., and Bicker, G.** (2001). A tissue-specific marker of Ecdysozoa. *Development Genes and Evolution* **211**, 428-433.
- Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M. A., Liva, S. M., Hillis, D. M., and Lake, J. A.** (1995). Evidence from 18S Ribosomal Dna That the Lophophorates Are Protostome Animals. *Science* **267**, 1641-1643.
- Hanlon, R. T. and Messenger, J. B.** (1996). *Cephalopod behaviour* pp. 1-232. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hochner, B., Brown, E. R., Langella, M., Shomrat, T., and Fiorito, G.** (2003). A learning and memory area in the octopus brain manifests a vertebrate-like long-term potentiation. *J.Neurophysiol.* **90**, 3547-3554.
- Hochner, B., Shomrat, T., and Fiorito, G.** (2006). The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. *Biol.Bull.* **210**, 308-317.
- Hochner, B.** (2012). An embodied view of octopus neurobiology. *Current biology : CB* **22**, R887-R892.
- Huffard, C. L., Boneka, F., and Full, R. J.** (2005). Underwater bipedal locomotion by octopuses in disguise. *Science* **307**, 1927.
- Kandel, E. R.** (1979). *Behavioral Biology of Aplysia. A contribution to the comparative study of opisthobranch molluscs* pp. 1-463. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Kani, Y., Yoshikawa, N., Okada, S., and Abe, H.** (2007). Comparison of extractive components in muscle and liver of three Loliginidae squids with those of one Ommastrephidae species. *Fisheries Science* **73**, 940-949.
- Kani, Y., Yoshikawa, N., Okada, S., and Abe, H.** (2008). Taste-active components in the mantle muscle of the oval squid *Sepioteuthis lessoniana* and their effects on squid taste. *Food Research International* **41**, 371-379.
- Kime, D. E. and Messenger, J. B.** (1990). Monoamines in the Cephalopod CNS - An HPLC Analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **96**, 49-57.
- Kononenko, N. L., Wolfenberger, H., and Pfluger, H. J.** (2009). Tyramine as an Independent Transmitter and a Precursor of Octopamine in the Locust Central Nervous System: An Immunocytochemical Study. *Journal of Comparative Neurology* **512**, 433-452.
- Kroeger, B., Vinther, J., and Fuchs, D.** (2011). Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules. *Bioessays* **33**, 602-613.
- Laschi, C., Cianchetti, M., Mazzolai, B., Margheri, L., Follador, M., and Dario, P.** (2012). Soft Robot Arm Inspired by the Octopus. *Advanced Robotics* **26**, 709-727.
- Lee, P. N., Callaerts, P., de Couet, H. G., and Martindale, M. Q.** (2003). Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties. *Nature* **424**, 1061-1065.
- Lima, P. A., Nardi, G., and Brown, E. R.** (2003). AMPA/kainate and NMDA-like glutamate receptors at the chromatophore neuromuscular junction of the squid: role in synaptic transmission and skin patterning. *European Journal of Neuroscience* **17**, 507-516.
- Loi, P. K., Saunders, R. G., Young, D. C., and Tublitz, N. J.** (1996). Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish *Sepia officinalis*. *J.Exp.Biol.* **199**, 1177-1187.

- Maldonado, H.** (1963). The positive learning process in *Octopus vulgaris*. *Z.Vgl.Physiol.* **47**, 191-214.
- Margheri, L., Laschi, C., and Mazzolai, B.** (2012). Soft robotic arm inspired by the octopus: I. From biological functions to artificial requirements. *Bioinspiration & Biomimetics* **7**, 025004.
- Margheri, L., Ponte, G., Mazzolai, B., Laschi, C., and Fiorito, G.** (2011). Non-invasive study of *Octopus vulgaris* arm morphology using ultrasound. *J.Exp.Biol.* **214**, 3727-3731.
- Mathger, L. M., Shashar, N., and Hanlon, R. T.** (2009). Do cephalopods communicate using polarized light reflections from their skin? *J.Exp.Biol.* **212**, 2133-2140.
- Mattiello, T., Fiore, G., Brown, E. R., d'Ischia, M., and Palumbo, A.** (2010). Nitric Oxide Mediates the Glutamate-dependent Pathway for Neurotransmission in *Sepia officinalis* Chromatophore Organs. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 24154-24163.
- Matzner, H., Gutfreund, Y., and Hochner, B.** (2000). Neuromuscular system of the flexible arm of the octopus: Physiological characterization. *Journal of Neurophysiology* **83**, 1315-1328.
- Mazzolai, B., Margheri, L., Cianchetti, M., Dario, P., and Laschi, C.** (2012). Soft-robotic arm inspired by the octopus: II. From artificial requirements to innovative technological solutions. *Bioinspiration & Biomimetics* **7**.
- Messenger, J. B.** (1967). The peduncle lobe: a visuo-motor centre in octopus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)* **167**, 225-251.
- Messenger, J. B.** (1979). The nervous system of *Loligo* IV. The peduncle and olfactory lobes. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B* **285**, 275-309.
- Messenger, J. B., Nixon, M., and Ryan, K. P.** (1985). Magnesium-Chloride As An Anesthetic for Cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **82**, 203-205.
- Messenger, J. B.** (1996). Neurotransmitters of cephalopods. *Invertebrate Neuroscience* **2**, 95-114.
- Messenger, J. B.** (2001). Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biological Reviews* **76**, 473-528.
- Michels, J., Robertson, J. D., and Young, J. Z.** (1987). Can conditioned aversive tactile stimuli affect extinction of visual responses in octopus. *Mar.Behav.Physiol.* **13**, 1-11.
- Milligan, B. J., Curtin, N. A., and Bone, Q.** (1997). A thin-slice preparation of cuttlefish mantle muscle for study of contraction. *Journal of Physiology-London* **504P**, 3-4.
- Myers, C. E.** (1992). *Delay learning in artificial neural networks* pp. 1-157. London: Chapman & Hall.
- Nixon, M. and Young, J. Z.** (2003). *The brains and lives of Cephalopods* pp. 1-392. New York: Oxford University.
- Packard, A.** (1963). The behaviour of *Octopus vulgaris*. *Bull.Inst.Oceanogr.(Monaco) Numéro spécial 1D*, 35-49.
- Packard, A.** (1972). Cephalopods and fish: the limits of convergence. *Biol.Rev.(Camb.)* **47**, 241-307.
- Pfefferkorn, A.** (1915). Das NervenSystem der Octopoden. *Z.wiss.Zool.* **114**, 425-531.

- Ponte, G., Maiorino, M., and Fiorito, G.** (2009). Limiti esterni e loro corrispondenze neuro-anatomiche interne nel cervello di *Octopus vulgaris*. *70° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana Rapallo (GE), Italy; 21-24 Sept. 2009*, 1.
- Ponte, G., Pagano, E., and Fiorito, G.** (2010). HPLC-profiling: detecting neurotransmitters in the brain of *Octopus vulgaris*. *New Perspectives in Neuroscience: Joint Meeting of Young Italian and Japanese Neuroscientists Napoli, Italy; 21 Sept. 2010*, 1.
- Ponte, G., Edelman, D., and Fiorito, G.** (2011). Anti-Hrp Epitope in *Octopus Vulgaris* Neural Tissue: the First Among Lophotrochozoans. *Journal of Shellfish Research* **30**, 1018.
- Saidel, W. M.** (1982). Connections of the Octopus Optic Lobe - An Hrp Study. *Journal of Comparative Neurology* **206**, 346-358.
- Sanders, F. K. and Young, J. Z.** (1940). Learning and other functions of the higher nervous centres of *Sepia*. *J. Neurophysiol.* **3**, 501-526.
- Sanders, G. D.** (1975). The Cephalopods. In: *Invertebrate Learning. Cephalopods and Echinoderms*, vol. 3 (eds. Corning, W. C., Dyal, J. A., and Willows, A. O. D.), pp. 1-101. New York, N.Y.: Plenum Press.
- Shirai, T., Kikuchi, N., Matsuo, S., Uchida, S., Inada, H., Suzuki, T., and Hirano, T.** (1997). Taste components of boreo Pacific gonate squid *Gonatopsis borealis*. *Fisheries Science* **63**, 772-778.
- Shomrat, T., Feinstein, N., Klein, M., and Hochner, B.** (2010). Serotonin Is A Facilitatory Neuromodulator of Synaptic Transmission and "Reinforces" Long-Term Potentiation Induction in the Vertical Lobe of *Octopus Vulgaris*. *Neuroscience* **169**, 52-64.
- Shomrat, T., Graindorge, N., Bellanger, C., Fiorito, G., Loewenstein, Y., and Hochner, B.** (2011). Alternative Sites of Synaptic Plasticity in Two Homologous "Fan-out Fan-in" Learning and Memory Networks. *Current Biology* **21**, 1773-1782.
- Smith, J. A., Andrews, P. L. R., Hawkins, P., Louhimies, S., Ponte, G., and Dickel, L.** (1900). Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: requirements, impacts and ethical review processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Smith, M. R. and Caron, J. B.** (2010). Primitive soft-bodied cephalopods from the Cambrian. *Nature* **465**, 469-472.
- Sumbre, G., Gutfreund, Y., Fiorito, G., Flash, T., and Hochner, B.** (2001). Control of octopus arm extension by a peripheral motor program. *Science* **293**, 1845-1848.
- Sumbre, G., Fiorito, G., Flash, T., and Hochner, B.** (2005). Motor control of flexible octopus arms. *Nature* **433**, 595-596.
- Sumbre, G., Fiorito, G., Flash, T., and Hochner, B.** (2006). Octopuses use a human-like strategy to control precise point-to-point arm movements. *Current Biology* **16**, 767-772.
- Sweeney, M. J. and Roper, C. F. E.** (1998). Classification, type localities, and type repositories of recent Cephalopoda. In: *Systematics and Biogeography of Cephalopods*, vol. II (eds. Voss, N. A. et al.), pp. 561-599. Washington, D.C.: Smithsonian Institution.
- Tansey, E. M.** (1978). A histochemical study of the cephalopod brain. 1-169., University of Sheffield, UK.
- Tansey, E. M.** (1979). Neurotransmitters in the Cephalopod Brain. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **64**, 173-182.
- Tublitz, N. J., Gaston, M. R., and Loi, P. K.** (2006). Neural regulation of a complex behavior: body patterning in cephalopod molluscs. *Integrative and Comparative Biology* **46**, 880-889.

- Vinogradova, I. M., Zajicek, J., Gentile, S., and Brown, E. R.** (2002). Effect of glycine on synaptic transmission at the third order giant synapse of the squids *Alloteuthis subulata* and *Loligo vulgaris*. *Neurosci.Lett.* **325**, 42-46.
- Wardill, T. J., Gonzalez-Bellido, P. T., Crook, R. J., and Hanlon, R. T.** (2012). Neural control of tuneable skin iridescence in squid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* doi: [10.1098/rspb.2012.1374](https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1374).
- Wells, M. J. and WELLS, J.** (1959). Hormonal Control of Sexual Maturity in Octopus. *J.Exp. Biol.* **36**, 1-33.
- Wells, M. J.** (1994). The evolution of a racing snail. *Mar.Fresh.Behav.Physiol.* **25**, 1-12.
- Williamson, R. and Budelmann, B. U.** (1991). Convergent inputs to *Octopus* oculomotor neurons demonstrated in a brain slice preparation. *Neurosci.Lett.* **121**, 215-218.
- Wollesen, T., Loesel, R., and Wanninger, A.** (2008). FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the cephalopod mollusc, *Idiosepius notoides*. *Acta Biol.Hung.* **59 Suppl:111-6.**, 111-116.
- Wollesen, T., Degan, B. M., and Wanninger, A.** (2010). Expression of serotonin (5-HT) during CNS development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Cell Tissue Res.* **342**, 161-178.
- Wollesen, T., Sukhsangchan, C., Seixas, P., Nabhitabhata, J., and Wanninger, A.** (2012). Analysis of neurotransmitter distribution in brain development of benthic and pelagic octopod cephalopods. *Journal of Morphology* **273**, 776-790.
- Young, J. Z.** (1963). The number and sizes of nerve cells in *Octopus*. *Proc.Zool.Soc.Lond.* **140**, 229-254.
- Young, J. Z.** (1965). The organization of a memory system. *Proc.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* **163**, 285-320.
- Young, J. Z.** (1971). *The anatomy of the nervous system of Octopus vulgaris* pp. 1-690. London: Oxford University Press.
- Young, J. Z.** (1985). Cephalopods and neuroscience. *Biol.Bull.* **168**, 153-158.
- Young, J. Z.** (1991). Computation in the learning system of cephalopods. *Biol.Bull.* **180**, 200-208.
- Young, J. Z.** (1995). Multiple matrices in the memory system of *Octopus*. In: *Cephalopod Neurobiology* (eds. Abbott, J. N., Williamson, R., and Maddock, L.), pp. 431-443. Oxford: Oxford University Press.
- Zhang, X., Mao, Y., Huang, Z. X., Qu, M., Chen, J., Ding, S. X., Hong, J. N., and Sun, T. T.** (2012). Transcriptome Analysis of the *Octopus vulgaris* Central Nervous System. *Plos One* **7**.
- Zullo, L., Sumbre, G., Agnisola, C., Flash, T., and Hochner, B.** (2009). Nonsomatotopic Organization of the Higher Motor Centers in Octopus. *Current Biology* **19**, 1632-1636.

Appendice 1 - Il cervello di *Octopus vulgaris*

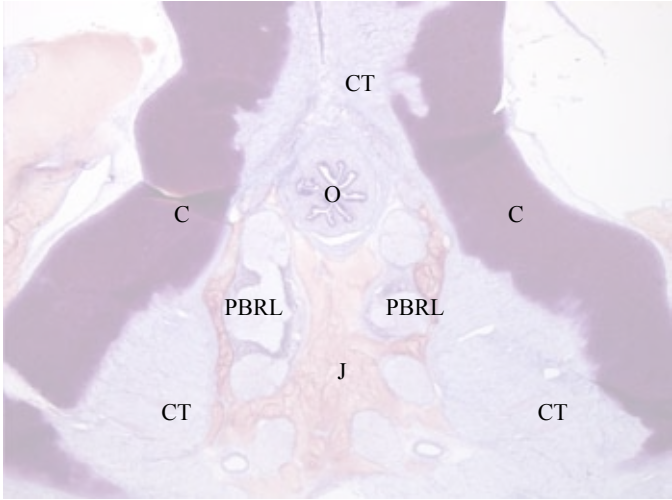
Nelle pagine seguenti sono incluse 15 sezioni coronali non consecutive provenienti da serie da cervello di polpo dopo colorazione di Nissl allo scopo di favorire e assistere l'identificazione delle aree al suo interno. Ci si riferisce a strutture presenti nei lobi di ciascuna massa ed in particolare, SEM: massa sopra-esofagea; SUB: massa sotto-esofagea. I lobi ottici sono inclusi nella SEM. Le varie sezioni sono state selezionate per favorire la massima rappresentatività di lobi e strutture. Il piano di taglio non risulta essere perfettamente perpendicolare all'asse antero-posteriore.

Ciascun lobo è identificato da un acronimo e il suo nome equivalente è riportato in legenda per ciascuna pagina. Per uniformità con la classica descrizione di Young (1971) è preferita la nomenclatura in lingua inglese.

La distanza dall'origine in μm di alcuni punti di repere rispetto alla parte più anteriore della massa sopra-esofagea è indicata in alcune tavole. Si veda anche il testo (Introduzione) per una descrizione dei lobi.

ANTERIOR MARGIN OF SUPRA-ESOPHAGEAL MASS

Distance from the anterior margin: 0 μm

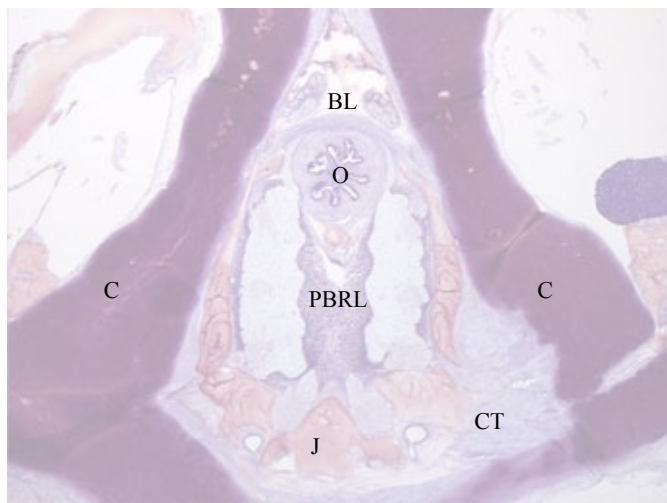
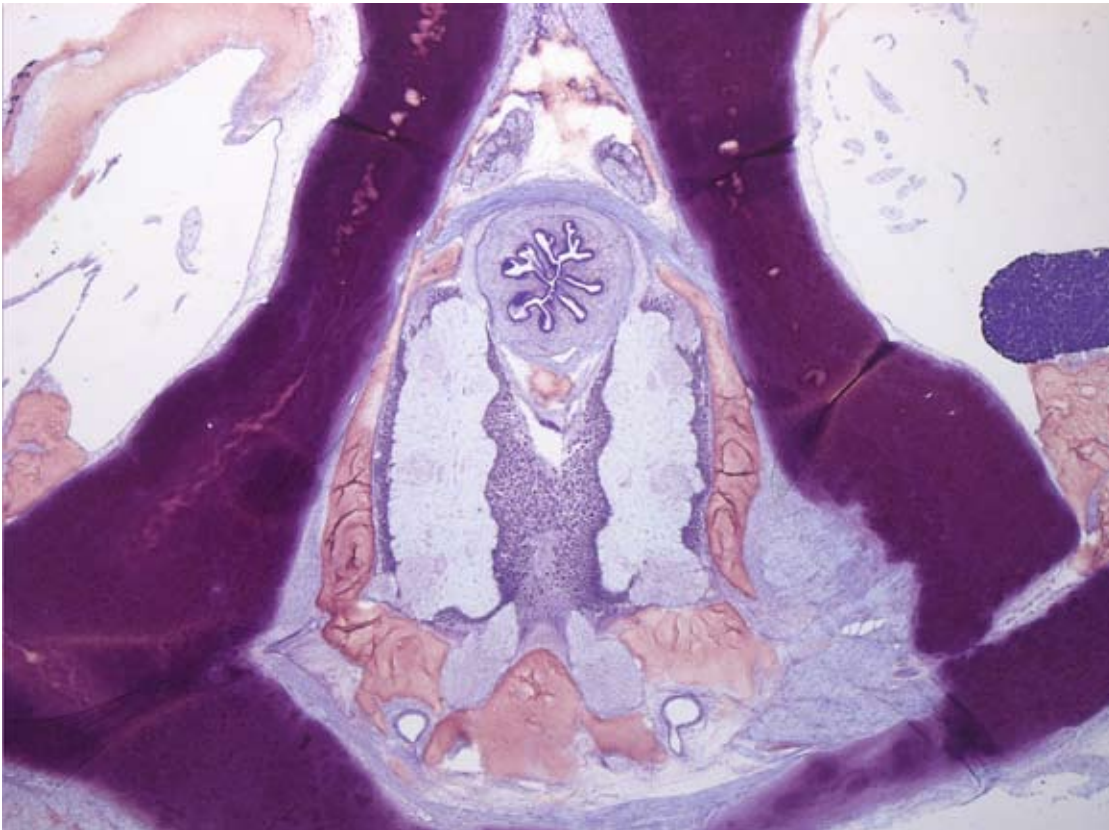


Legend
SEM

SUB

PBRL: Pre brachial Lobe

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- CT: Connective tissue
- O: Esophagus



Legend

SEM

BL: Buccal Lobe

SUB

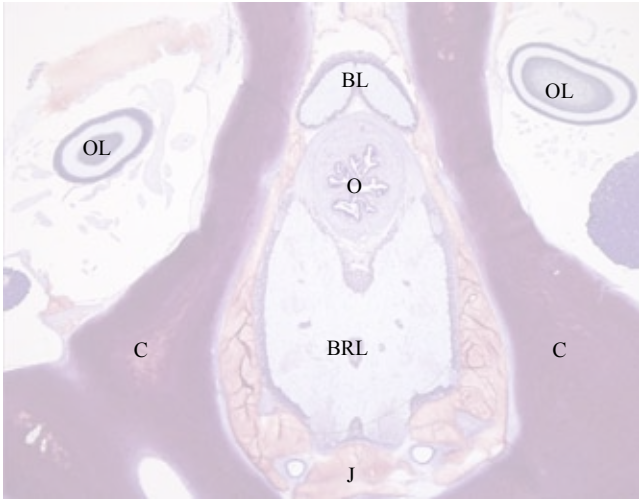
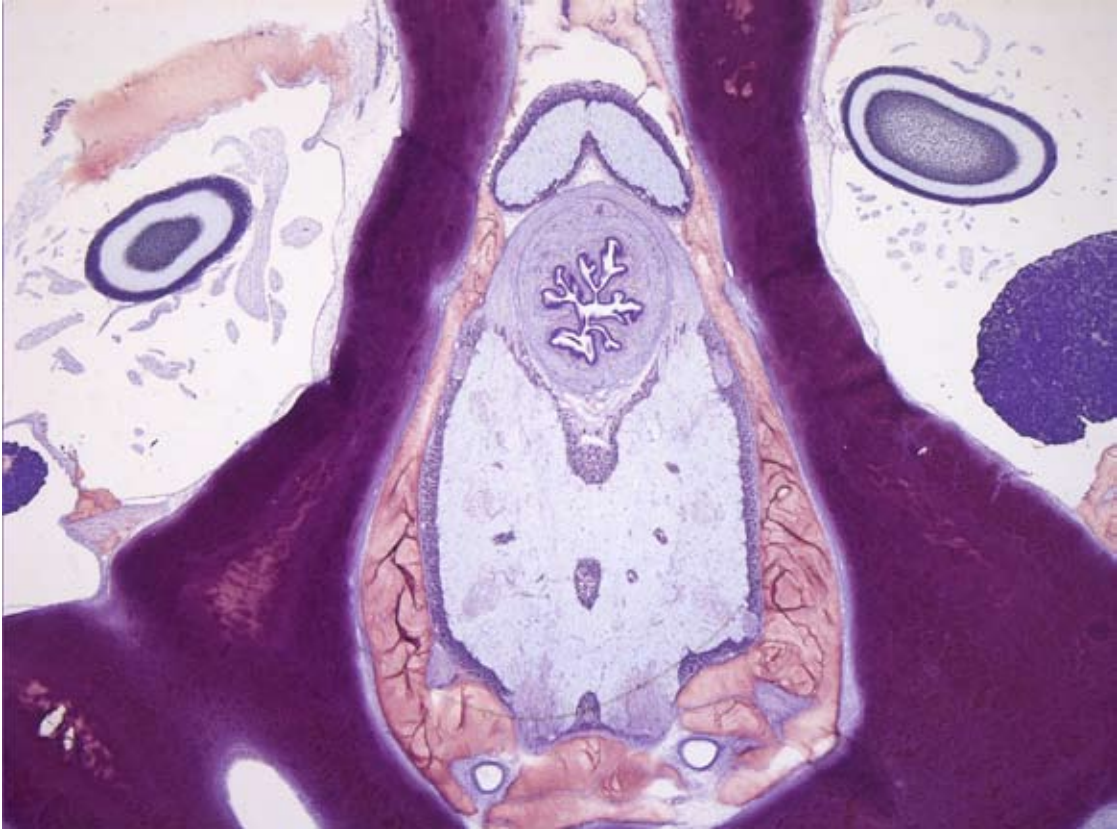
PBRL: Pre brachial Lobe

C: Cranium (skull)

J: Jelly

CT: Connective tissue

O: Esophagus



Legend

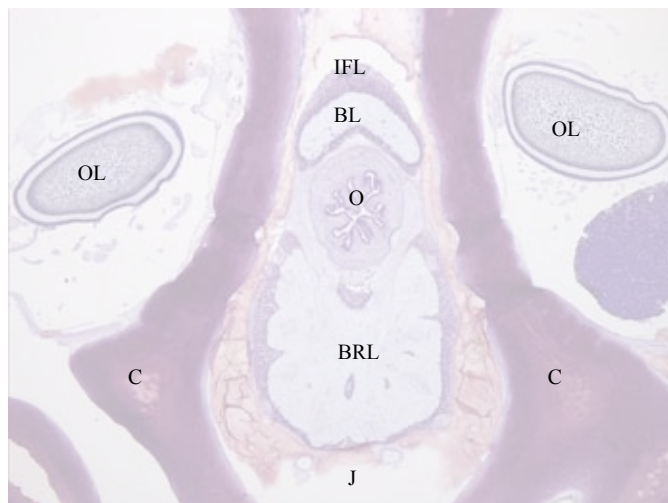
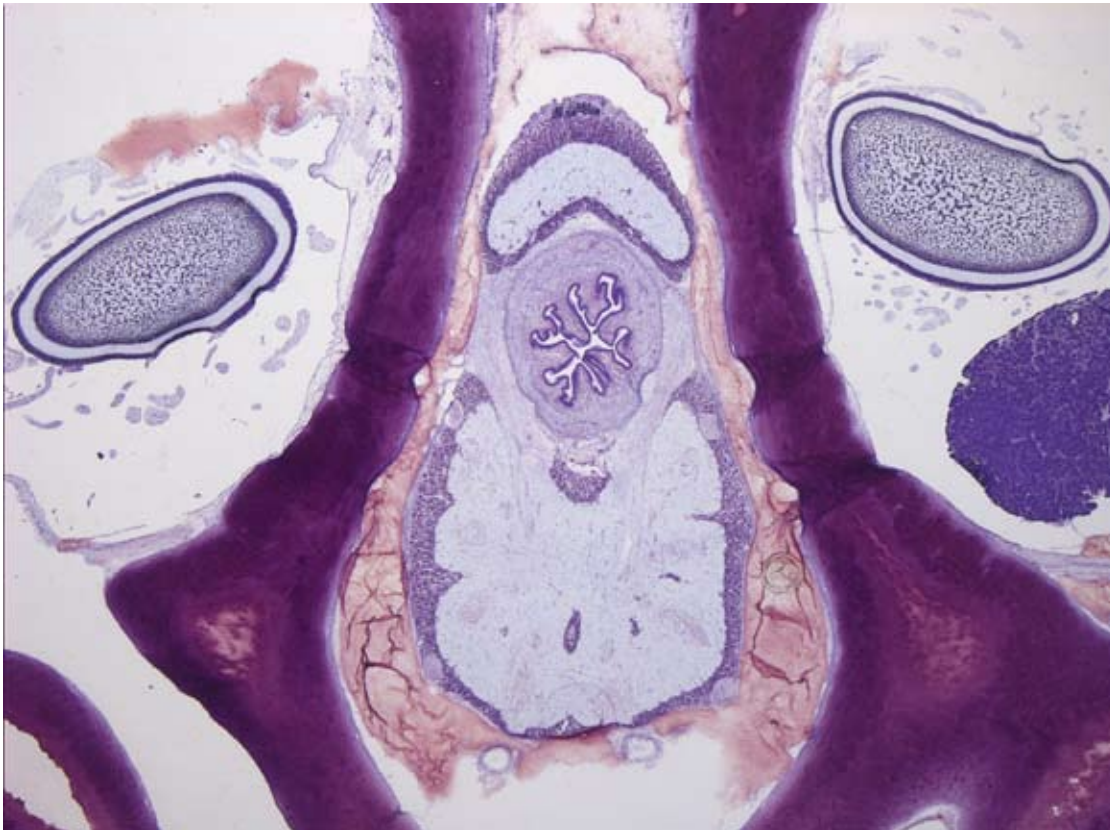
SEM

BL: Buccal Lobe
OL: Optic Lobe

SUB

BRL: Brachial Lobe

C: Cranium (skull)
J: Jelly
O: Esophagus



Legend

SEM

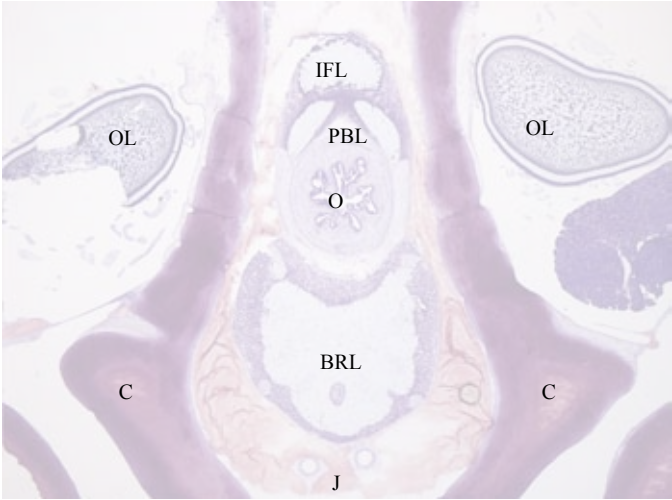
IFL: Inferior Frontal Lobe
BL: Buccal Lobe
OL: Optic Lobe

SUB

BRL: Brachial Lobe

C: Cranium (skull)
J: Jelly
O: Esophagus

Distance from the anterior margin: about 1050 μm



Legend

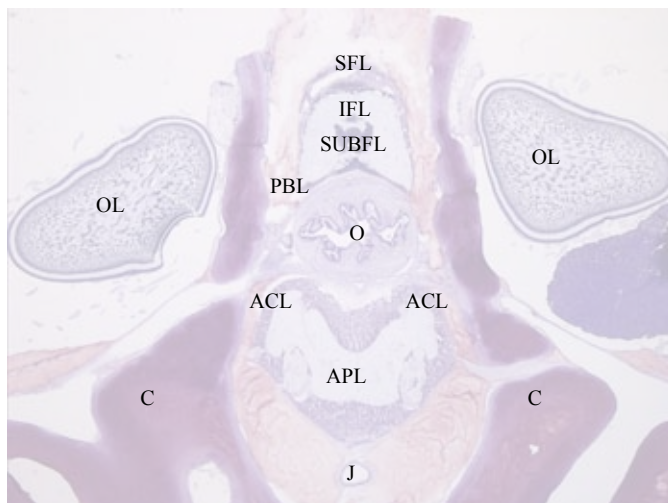
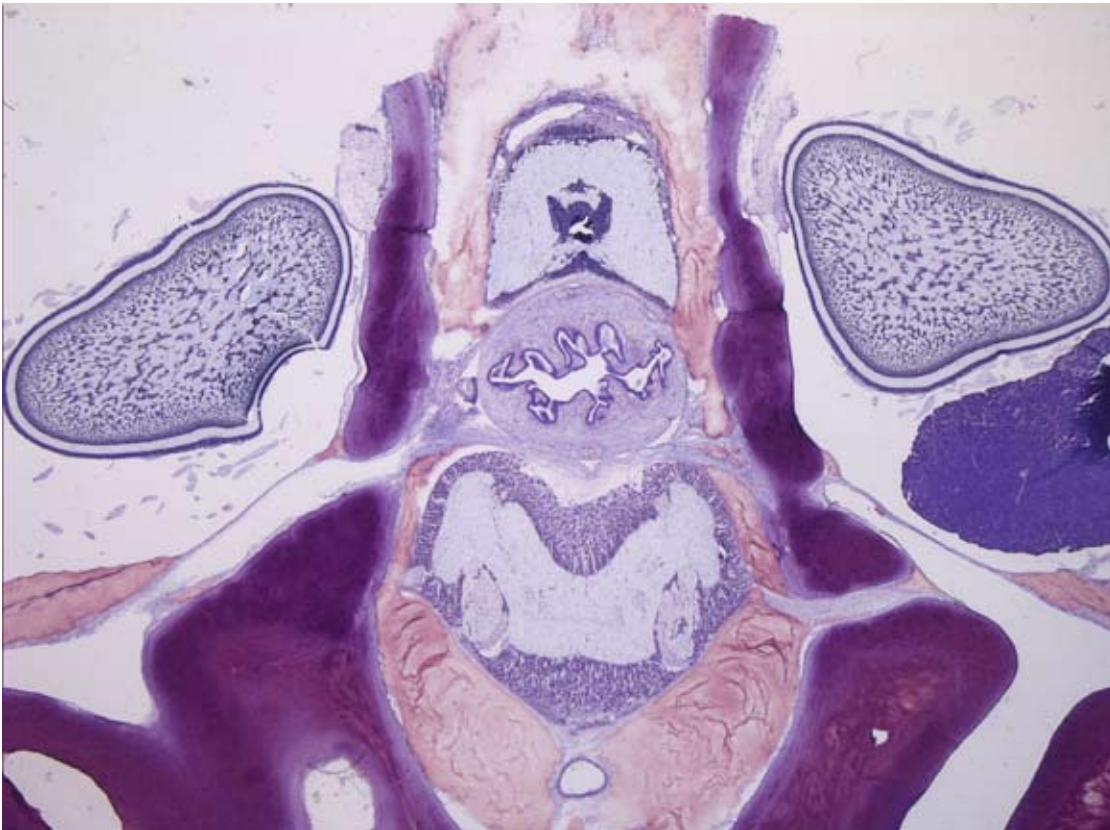
SEM

- IFL: Inferior Frontal Lobe
- PBL: Posterior Buccal Lobe**
- BL: Buccal Lobe
- OL: Optic Lobe**

SUB

- BRL: Brachial Lobe**

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus



Legend

SEM

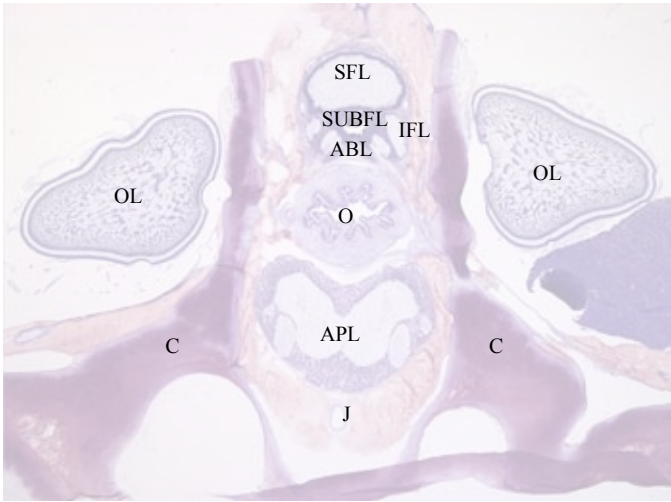
- SFL: Superior Frontal
- IFL: Inferior Frontal Lobe
- SUBFL: SubFrontal Lobe
- PBL: Posterior Buccal Lobe
- OL: Optic Lobe

SUB

- ACL: Anterior Chromatophore Lobe
- APL: Anterior Pedal Lobe

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus

Distance from the anterior margin: about 1800 μm



Legend

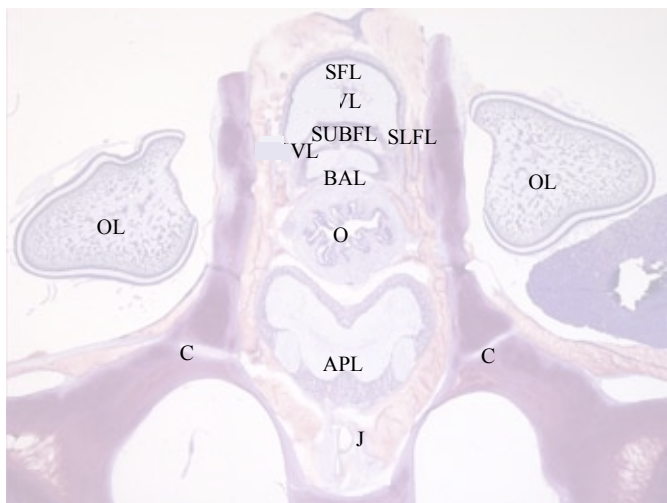
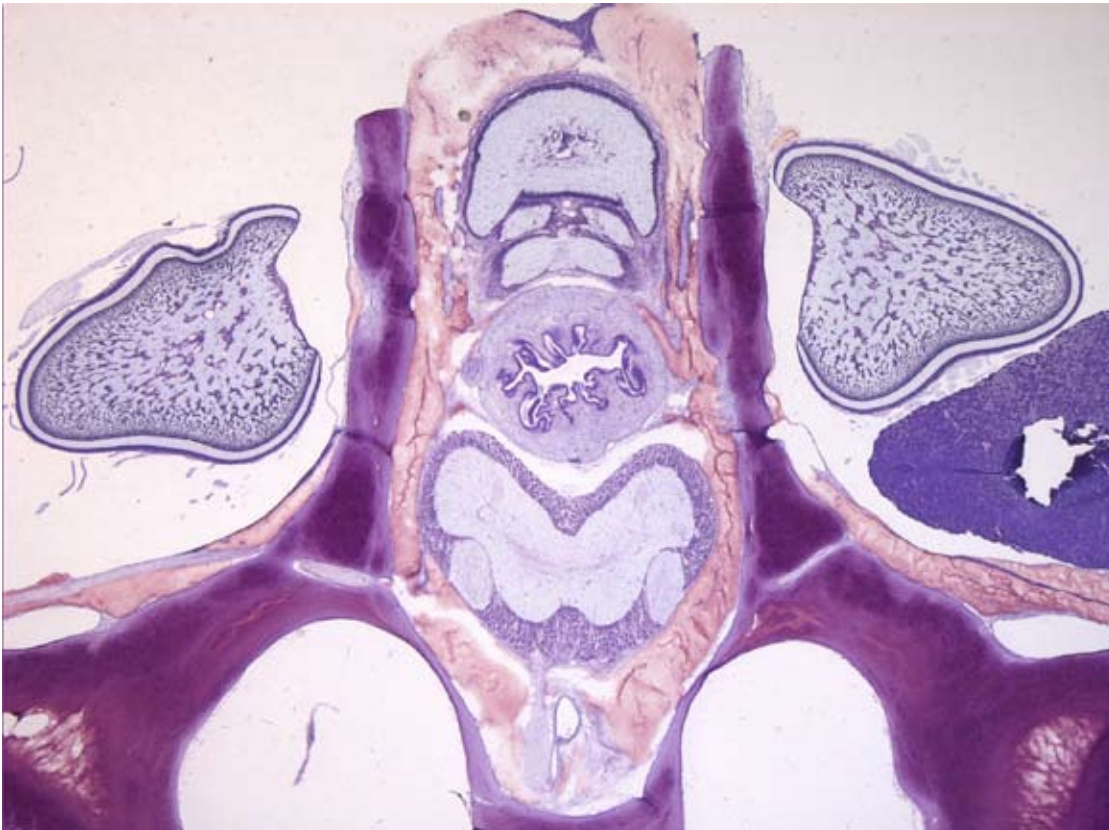
SEM

- SFL: Superior Frontal
- IFL: Inferior Frontal
- SUBFL: SubFrontal
- ABL: Anterior Basal
- OL: Optic

SUB

- APL: Anterior Pedal

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus



Legend

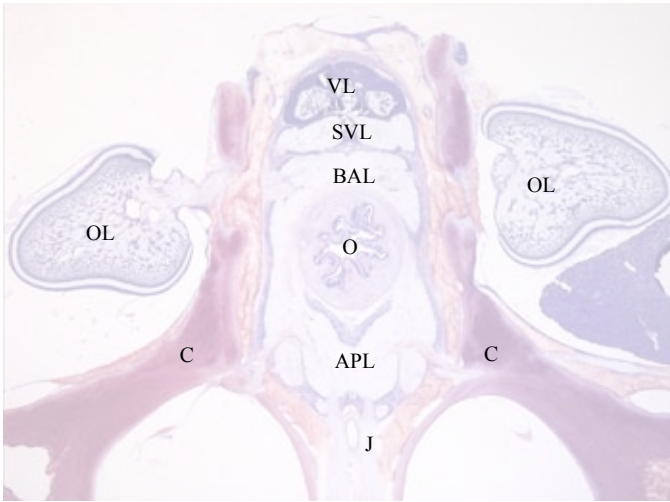
SEM

- SFL: Superior Frontal
- SLFL: Superior Lateral Frontal
- SUBFL: Sub Frontal
- BAL: Basal
- OL: Optic

SUB

- APL: Anterior Pedal

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus



Legend

SEM

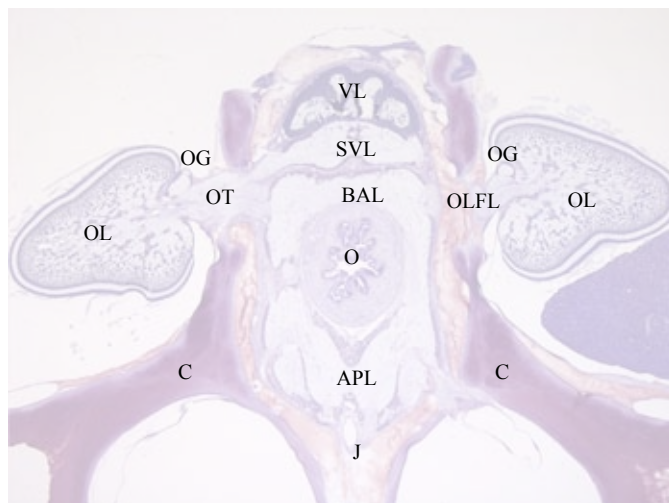
- VL: Vertical
- SVL: Sub Vertical
- BAL: Basal
- OL: Optic

SUB

- APL: Anterior Pedal

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus

Distance from the anterior margin: about 3000 μm



Legend

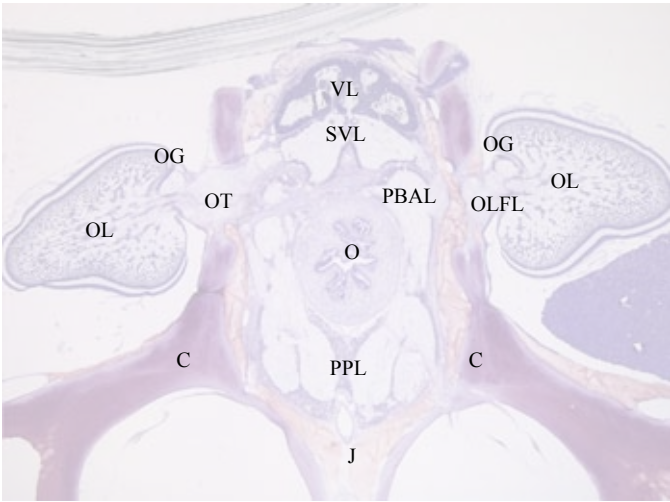
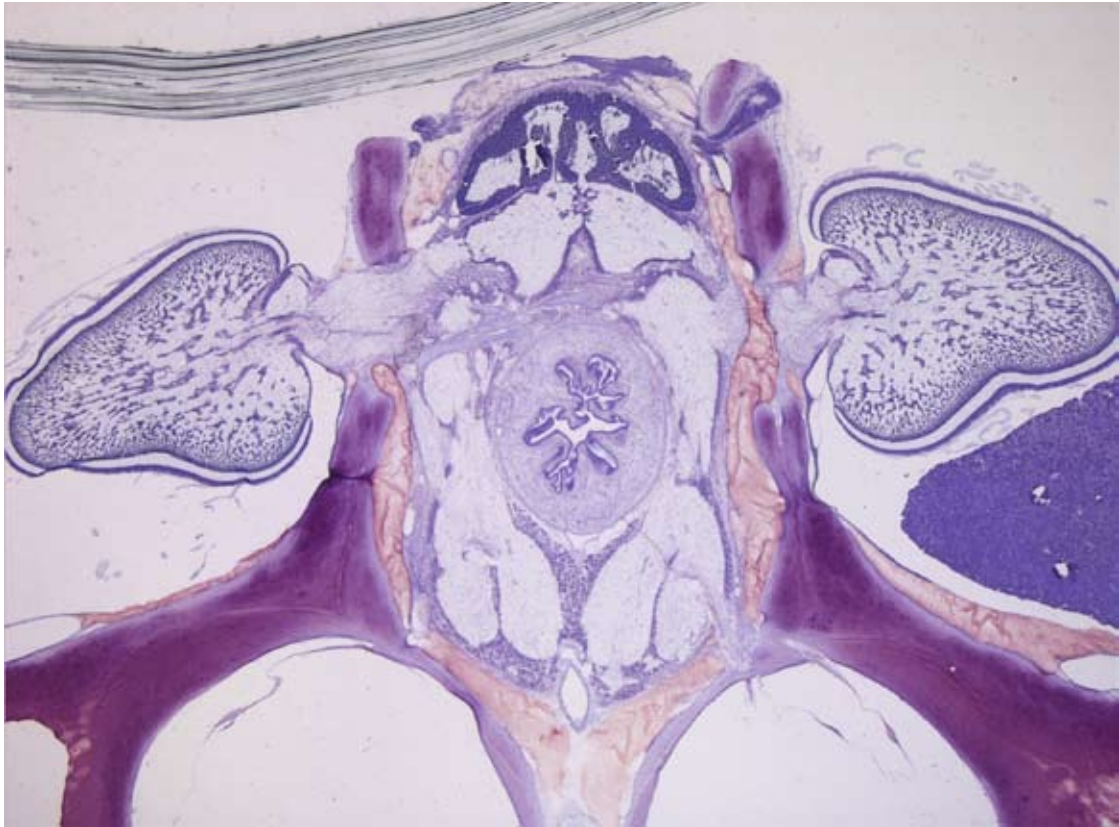
SEM

- VL: Vertical
- OG: Optic Gland
- OT: Optic Tract
- SVL: Sub Vertical
- BAL: Basal
- OL: Optic
- OLFL: Olfactory

SUB

- APL: Anterior Pedal

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus



Legend

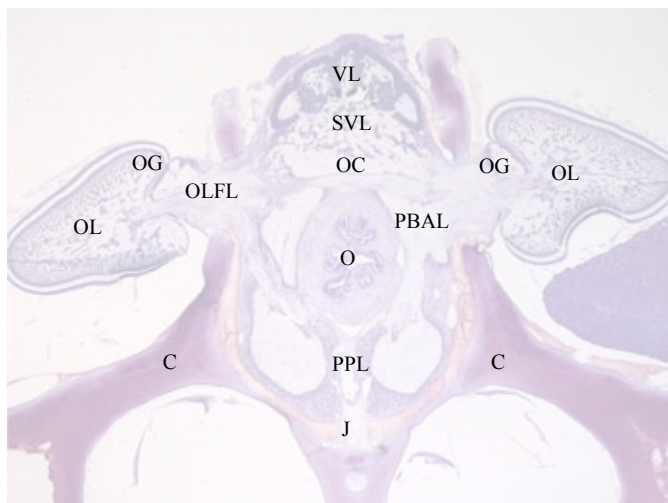
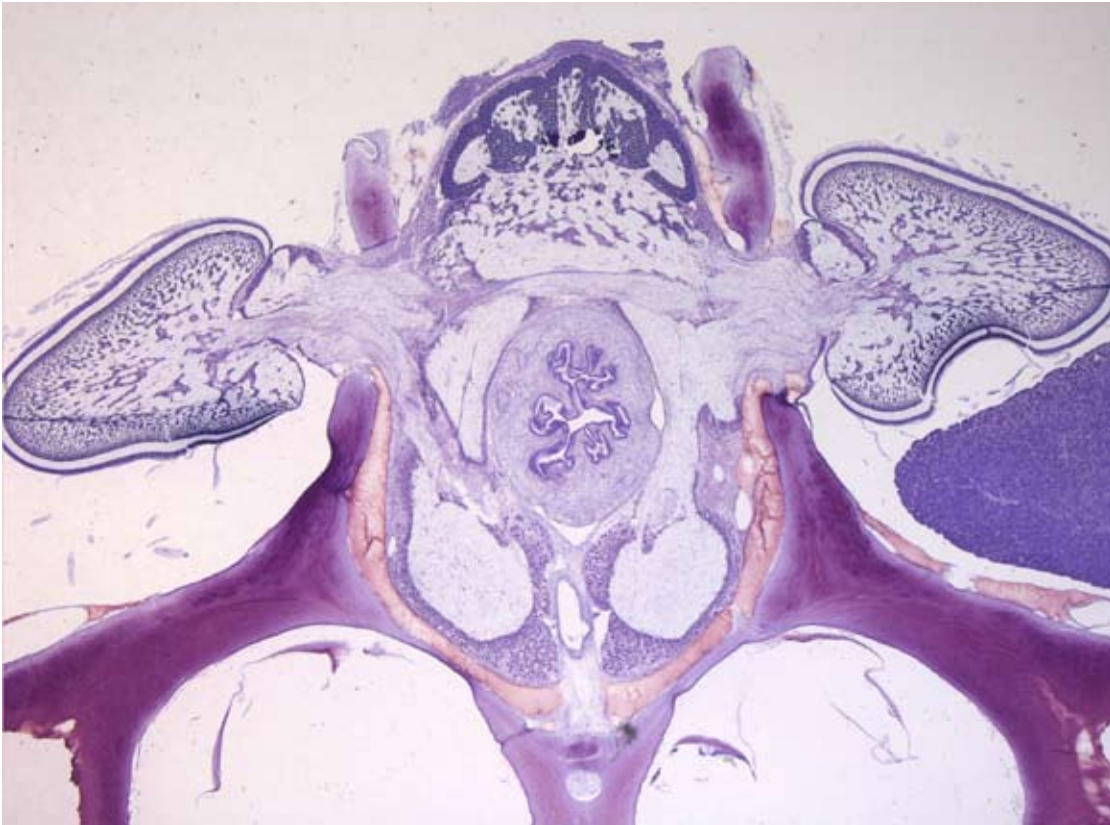
SEM

- VL: Vertical
- OG: Optic Gland
- OT: Optic Tract
- SVL: Sub Vertical
- PBAL: Posterior Basal
- OL: Optic
- OLFL: Olfactory

SUB

- PPL: Posterior Pedal
- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus

Distance from the anterior margin: about 3400 μm
(optic commissure)



Legend

SEM

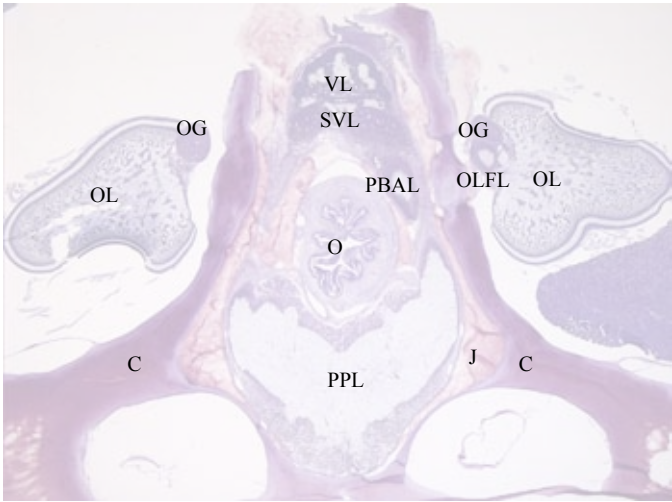
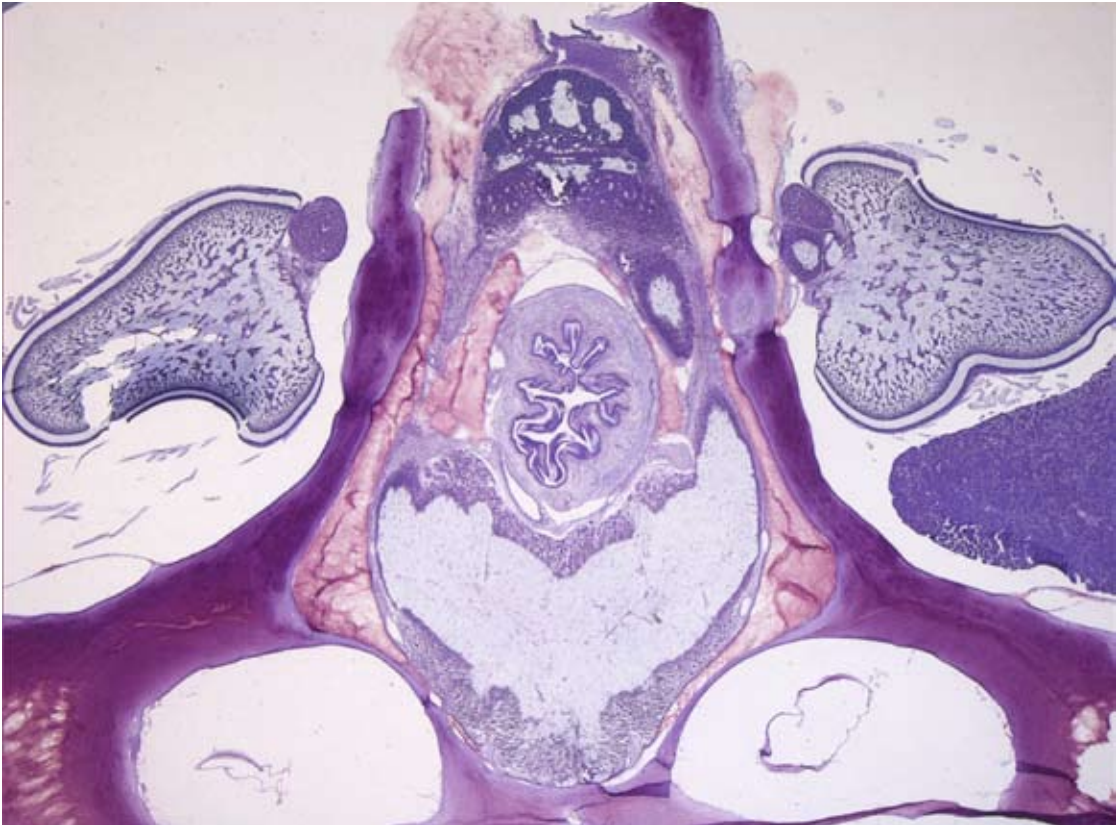
- VL: Vertical
- OG: Optic Gland
- OT: Optic Tract
- SVL: Sub Vertical
- OC: Optic Commissure
- PBAL: Posterior Basal
- OL: Optic
- OLFL: Olfactory

SUB

- PPL: Posterior Pedal

- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus

Distance from the anterior margin: about 4600 μm



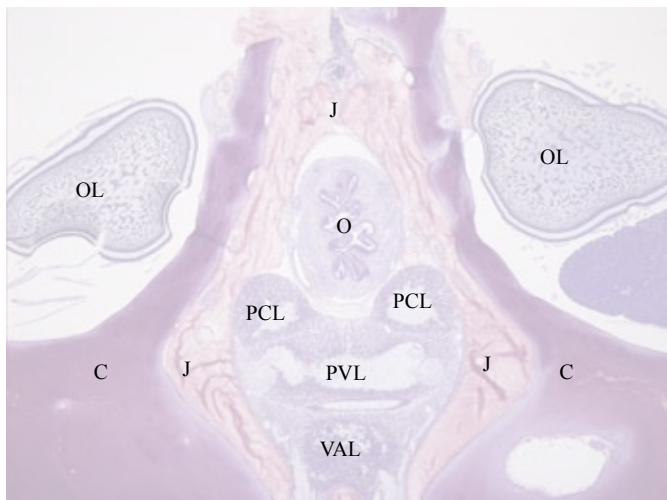
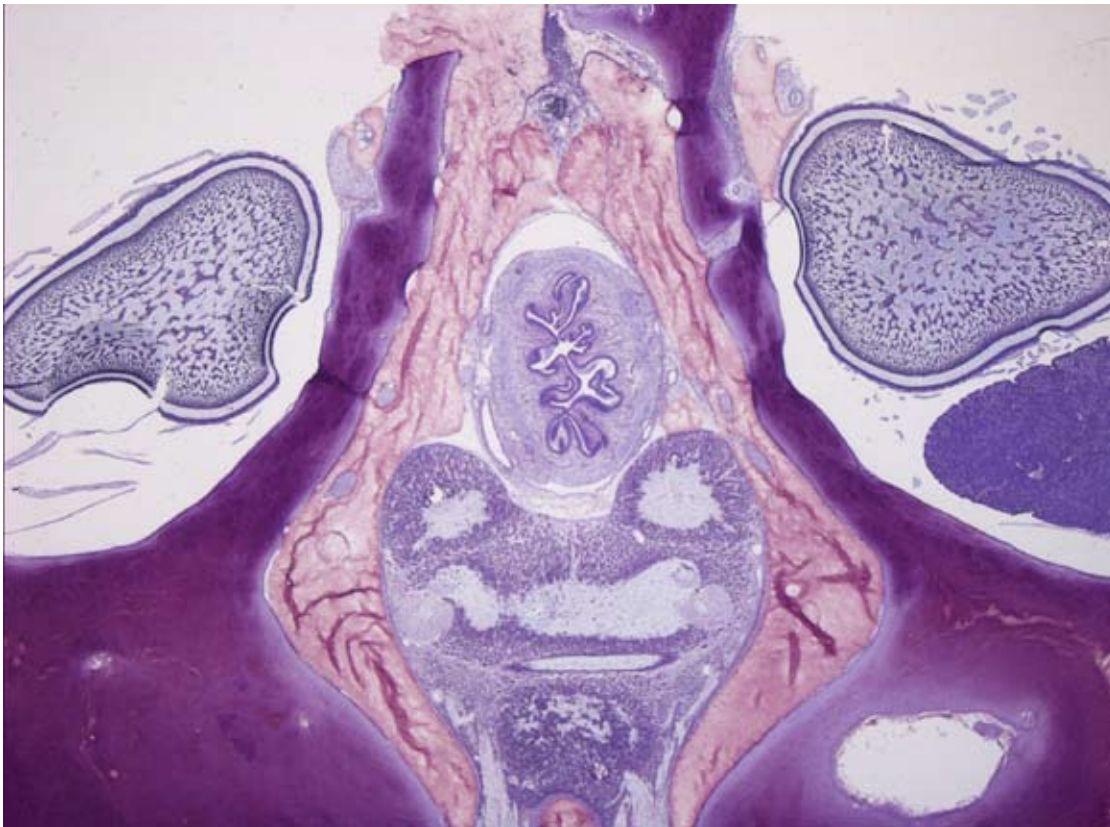
Legend

SEM

- VL: Vertical
- OG: Optic Gland
- SVL: Sub Vertical
- PBAL: Posterior Basal
- OL: Optic
- OLFL: Olfactory

SUB

- PPL: Posterior Pedal
- C: Cranium (skull)
- J: Jelly
- O: Esophagus



Legend

SEM

OL: Optic

SUB

PCL: Posterior Chromatophore

PVL: Palliovisceral

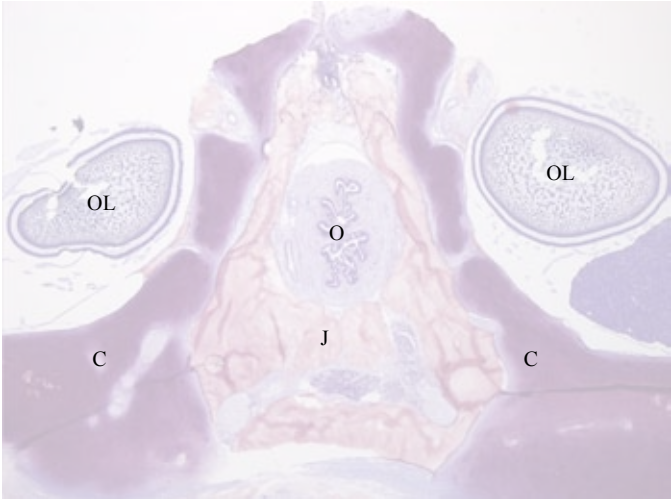
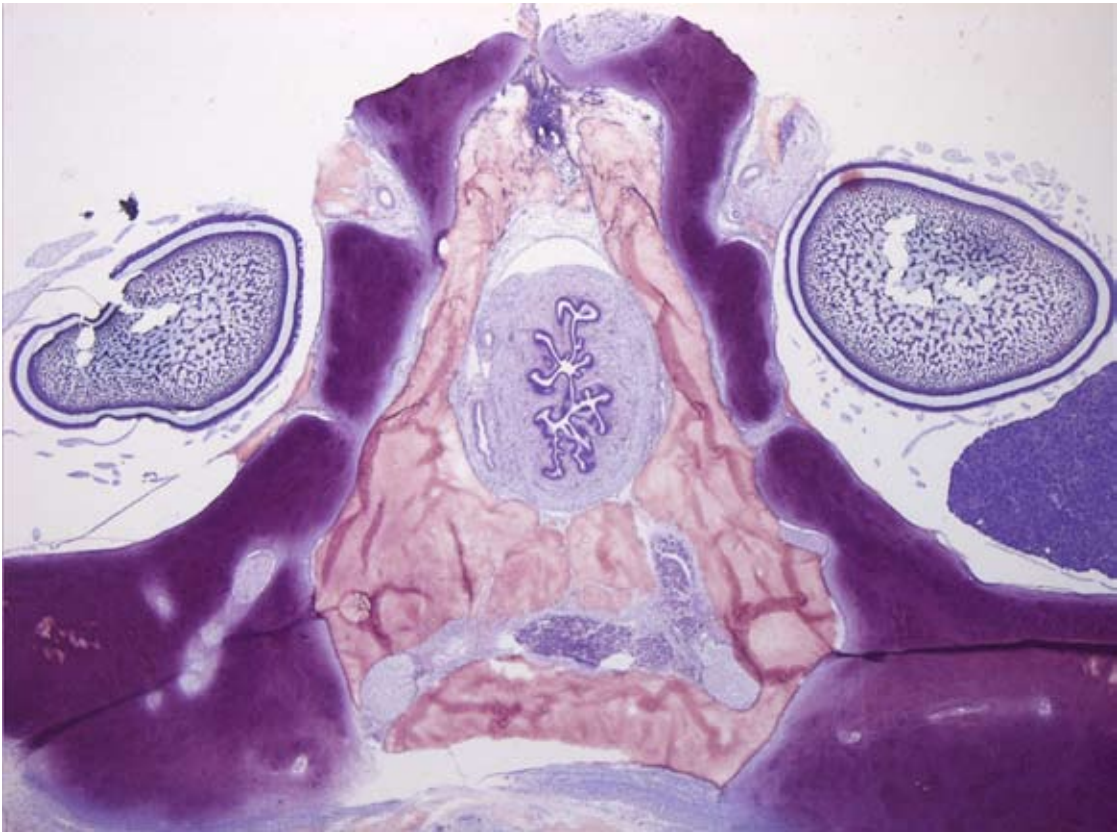
VAL: Vasomotor

C: Cranium (skull)

J: Jelly

O: Esophagus

Distance from the anterior margin: about 6000 μm



Legend

SEM

OL: Optic

SUB

C: Cranium (skull)
J: Jelly
O: Esophagus

Appendix 2

Sintesi dei probe per esperimenti di ibridazione in situ

Per uniformità e facilità descrittiva viene preferita la lingua inglese nella descrizione dei protocolli utilizzati per la sintesi delle sonde impiegate per esperimenti di ibridazione in situ.

Probe synthesis

Chemical transformation and bacterial electroporation

The circular plasmid DNA TOPO TA PCR II – OvTH and Express 1 – ObDRD1 and competent bacterial cells (Molecular Biology Service, Stazione Zoologica Anton Dohrn) were placed on ice for 15 minutes. For electroporation the cells were placed in a cold electrocuvette. The electrocuvette was subjected to an electric pulse at constant 1.7 V using a Bio-Rad Gene Pulser electroporation apparatus. Then the cells were added to 250 μ l of SOC (tryptone 20 g/l, yeast extract 5 g/l, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 100 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose) and shaken at 270 rpm at 37 °C for 1 hour. Then they were plated on LB solid medium (NaCl 10 g/l, bacteotryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, agar 15 g/l) in the presence of the specific antibiotic (ampicillin 50 μ g/ml) to which the plasmid is resistant, and then grown at 37°C overnight.

DNA maxi preparation

The positive clones were used for plasmid DNA. For preparation of up to 500 μ g of high-copy plasmid DNA, a single colony of transformed bacteria from a freshly streaked plate was inoculate into 500 ml of LB medium with 100 μ g/ml of ampicilin at 37°C in an incubator-shaker overnight. The QIAGEN plasmid-maxi kit was used to purify the plasmid DNA according to the manufacturer protocol. The bacterial cells were lysated in an alkaline lysis buffer. Then the plasmid DNA was separated by other molecules using an anion-exchange resin column under appropriate low-salt and pH conditions. RNA, protein and low-molecular weight impurities were removed by a medium-salt washes. The plasmid DNA was eluted in a high-salt buffer, then concentrated and desalted by isopropanol precipitation. The identity of inserts confirmed by sequencing.

DNA digestion with restriction endonuclease

Plasmid DNA TOPO TA PCR II – OvTH and Express 1 – ObDRD1 were digested with the suitable restriction endonuclease in a mixture containing 5 units enzyme/1 μ g DNA, in a final volume which was at least 20 times more than the enzyme volume, in the presence of 1/10 of a suitable buffer, and at specific temperature suggested by manufacturer's instructions.

Riboprobe synthesis

Both antisense- and sense-digoxigenin labelled OvTH and ObDRD1 RNA probes were generated using a Dig-RNA labelling kit (Roche, Indianapolis, IN), following the manufacturer's instructions using 1 µg of linearized plasmid. Reaction syntheses were conducted at 37 °C for 2 hours; the DNase I (RNase free) was added (1U/µl) to remove the DNA template. The mix was incubated for another 20 minutes at 37 °C and the reaction was stopped by adding EDTA pH 8 to a final concentration of 25 mM. To remove the unincorporated nucleotides the RNA probes were purified using the Mini Quick Spin RNA Columns G-50 Sephadex (Roche), following manufacturer's instructions. Aliquots of the probe were made and stored at -80 °C.

Riboprobe quantification

For each newly made Dig-labelled riboprobe, the concentration was evaluated by dot-blot immunostaining with anti-Dig antibody AP conjugated (Roche) against a known standard, a labelled RNA control (Roche). RNA dilutions were prepared using the dilution buffer [DEPC H₂O: 20X SSC: formaldehyde (5:3:2)]. Typically, dilutions of the riboprobes were blotted on Hybond N membrane (Amersham, Little Chalfont, Bucks) with serial dilutions of standard labelled RNA (Roche). The riboprobes were UV-crosslinked to the membrane with Stratalinker for 30 seconds. The filter was first incubated for 30 minutes in blocking solution (5% BSA in 0.1 M maleic acid pH 7.5) and then incubated, 1 hour at RT, in the same solution containing the anti-Dig alkaline phosphatase (AP) antibody (0.15 U/ml). To remove unbound antibodies, two washes in a solution containing 0.1 M maleic acid pH 7.5 and 0.15 M NaCl were done. The filter was equilibrated in the detection solution (100 mM Tris-HCl pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) and then incubated in the dark in the same solution in which 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (50 mg/ml) and nitroblue tetrazolium (NBT) (50 mg/ml) were added. The AP enzyme produces an insoluble blue precipitate in the presence of these two enzymatic substrates. The coloured compound starts to precipitate in few minutes. The reaction was blocked after 10 minutes by washing the filter with H₂O. The concentrations of experimental riboprobes were estimated by comparing spot intensities of the standard control to the spots of the experimental dilutions using ImageJ (Abramoff et al., 2004).

