



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

Scuola di Dottorato

Life Sciences

CICLO XXVIII

Nerve regeneration in the cephalopod mollusc *Octopus vulgaris*:
a journey into morphological, cellular and molecular changes
including epigenetic modifications

Settore Scientifico Disciplinare SSD 05/B

Direttore: Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Supervisore: Ch.mo Prof. Maria Carmela Cerra

Co-tutor: Dr. Graziano Fiorito

Dottorando: Dott.ssa Pamela Imperadore

Abstract

Regeneration is a process that restores the structure and function of tissues damaged by injury or disease. In mammals complete recovery is often incomplete or totally missing, while in the so-called "low" phyla of the animal kingdom, regeneration allows organizations regrowth of many parts of the body. Cephalopod Molluscs, and in particular *Octopus vulgaris*, are well known for their ability to regenerate arms and other parts of the body, including the central and peripheral nervous system.

To better understand the mechanisms underlying the post-lesion recovery in this species, during the course of my PhD project I studied the growth of axons and nerve regeneration after complete transection of the pallial nerves of the common octopus. This lesion induces the formation of scars and the proliferation of hemocytes which invade the scar. Hemocytes appear involved in the removal of debris and seem to produce factors that promote axon regrowth. The connective tissue is involved in driving the regenerating fibers in a single direction, outlining for them a well-defined path. The axons are able to quickly re-grow and re-innervate their target restoring structure and function.

The findings described in this thesis extend previous studies – that are dated back to 1930 - accounting for the effects of the lesion of the pallial nerve in the cephalopod mollusc *O. vulgaris*, an invertebrate. In an attempt to compare my study with these classic contributions, I found similar results in respect to all classic studies for the degeneration and regeneration of nerve fibers, I also found scar formation as originally described, and accurately described the role of hemocytes (i.e. infiltration among nerve fibers, proliferation, phagocytosis, contribution to scar) again similarly to the original description by Sereni and Young (1932). In addition, some of the most significant events occurring after lesion of the octopus pallial nerve (i.e., the involvement of the connective tissue in cell proliferation, and for finding of neuronal marker expression; the presence of neuronal cells and their proliferation in the nerve) are described for the first time in this study. Finally, I found first signs of functional recovery of body patterning as early as 7 days after injury, contrary to 30 days as other contributions.

In addition, even though preliminary, gene expression analysis highlighted the involvement of epigenetic markers and regeneration associated genes (RAGs). Strikingly, for some of the investigated genes, an upregulation appears to involve not only the regenerating axons, but also the contralateral control side and other parts of the central nervous system not directly connected to the nerve.

Sommario

La rigenerazione è un processo che ripristina la struttura e la funzione dei tessuti danneggiati a seguito di lesioni o malattie. Nei mammiferi la rigenerazione completa è spesso non completa o del tutto mancante, mentre nei cosiddetti "bassi" phyla del regno animale, la rigenerazione consente agli organismi la ricrescita di molte parti del corpo. I Molluschi Cefalopodi, e in particolare il polpo *Octopus vulgaris*, sono ben noti per la loro capacità di rigenerare le loro braccia e altre parti del corpo, compreso il sistema nervoso centrale e periferico. Per comprendere meglio i meccanismi che sottostanno al recupero post lesione in questa specie, durante il corso del mio progetto di dottorato ho studiato il processo di ricrescita degli assoni e la rigenerazione dei nervi dopo completa resezione dei nervi palliali del polpo comune. Questa lesione induce la formazione di cicatrici e attiva la proliferazione di emociti che invadono la cicatrice. Gli emociti appaiono coinvolti nella rimozione dei detriti e sembrano produrre i fattori che favoriscono la assone ricrescita. Il tessuto connettivo è coinvolto nella guida di fibre in rigenerazione in una sola direzione, delineando per loro un percorso ben definito. Gli assoni sono in grado di ri-crescere rapidamente e re-innervare i tessuti target, ripristinando struttura e funzione.

Nel corso di questo PhD ho riesaminato studi classici sulla rigenerazione del nervo palliale nel polpo comune, rivisitando molte delle osservazioni classiche. Tuttavia molti fenomeni sono stati descritti con maggiore accuratezza, anche grazie alle innovazioni tecnologiche e scientifiche oggi disponibili, ma mi hanno anche permesso di evidenziare per la prima volta il coinvolgimento del tessuto connettivo nella proliferazione (e riprogrammazione) cellulare, nonché di evidenziare che il recupero funzionale può avvenire in tempi rapidi, probabilmente grazie alla concomitante orchestrazione di circuiti periferici e centrali controlaterali che supplementano la mancanza di controllo neurale a causa della lesione.

Inoltre, anche se preliminari, l'analisi dell'espressione genica ha evidenziato il coinvolgimento di marcatori epigenetici e geni associati alla rigenerazione (RAGs). Sorprendentemente, per alcuni dei geni investigati, una upregulation sembra coinvolgere non solo gli assoni in rigenerazione, ma anche il tessuto controllo e altri distretti del sistema nervoso.