UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia

ELABORATO DI LAUREA

Possibile ruolo del sistema del complemento sul ciclo blastogenetico dell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri.*

Tutor: Prof. Loriano Ballarin
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Laura Drago
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Asia De Zorzi

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

ABSTRACT *1*

1. INTRODUZIONE *2*

1.1 Tunicati **2**

1.2 Classe *Ascidiacea* **2**

1.3 *Botryllus schlosseri* **3**

1.3.1 Il ciclo blastogenetico coloniale 4

1.4 Il sistema del complemento **5**

1.4.1 Il complemento in *B. schlosseri* 6

1.4.2 La proteina BsC3 6

2. SCOPO DELLA TESI *8*

3. MATERIALI E METODI *9*

3.1 Campionamento degli animali e allevamento in laboratorio **9**

3.2 Stadiazione delle colonie e preparazione per la sperimentazione **9**

3.3 Immunoistochimica per la rivelazione della proteina C3 ..... **10**

3.4 Microiniezioni di compstatina nel corso del ciclo blastogenetico **11**

3.4.1 Valutazione degli effetti della compstatina sul ciclo 12

3.4.2 Analisi statistica dei dati 12

4. RISULTATI *13*

4.1 Espressione di C3 durante il ciclo blastogenetico **13**

4.2 Cambiamenti morfologici e fisiologici indotti dall'inibizione di C3 ..... **13**

5. DISCUSSIONE *15*

6. BIBLIOGRAFIA *19*

7. APPENDICE *23*

ABSTRACT

Negli ultimi anni, numerose ricerche suggeriscono che il sistema del complemento svolga anche ruoli non necessariamente legati alla risposta immunitaria. Nei vertebrati, ad esempio, sta emergendo un suo coinvolgimento nel *synaptic pruning*, ossia nell'eliminazione delle sinapsi in eccesso durante lo sviluppo del sistema nervoso. Negli invertebrati, invece, gli studi sui ruoli non canonici del complemento sono ancora limitati.

La presente tesi si propone di valutare il possibile coinvolgimento del complemento nello sviluppo dell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri.*

Un inibitore della proteina del complemento C3 (compstatina) è stato microiniettato giornalmente per dieci giorni nella circolazione di *B. schlosseri*, con l'obiettivo di valutare eventuali cambiamenti morfologici e fisiologici nel suo ciclo blastogenetico. Un anticorpo commerciale anti-C3 è stato inoltre impiegato in esperimenti di immunoistochimica, per analizzare l'espressione della proteina C3 durante il ciclo di *Botryllus*.

1. INTRODUZIONE

1.1 Tunicati

Il subphylum *Tunicata* (o *Urochordata*), *sister group* del subphylum *Vertebrata*, raggruppa organismi cordati invertebrati, deuterostomi e a simmetria bilaterale. Il taxon comprende le classi *Ascidiacea*, *Thaliacea* e *Larvacea* (Delsuc et al., 2006).
I tunicati presentano, allo stadio larvale, tutte e cinque le sinapomorfie tipiche dei cordati: una notocorda dorsale limitata alla sola coda (da qui il nome *Urochordata*, dal greco *ourá*, "coda", e *chordḗ*, "corda"), un tubo nervoso dorsale alla notocorda, una coda post-anale, un endostilo (ghiandola esocrina omologa alla tiroide dei vertebrati) e una faringe fessurata. Di queste sinapomorfie, notocorda, tubo nervoso e coda vengono in gran parte riassorbite durante la metamorfosi dalla larva all'adulto nella maggior parte dei tunicati. Solo nella classe *Larvacea* tutte queste caratteristiche vengono mantenute anche nell'adulto, per neotenia (Burighel & Cloney, 1997). I Tunicati sono animali marini filtratori, alcuni sessili o bentonici, altri pelagici, diffusi in tutto il mondo soprattutto in acque poco profonde, e possono condurre vita solitaria o coloniale. Il loro corpo è avvolto da una tunica composta da cellulosa (tunicina), da cui deriva il nome del subphylum (Hirose et al., 2009).

1.2 Classe *Ascidiacea*

La classe *Ascidiacea* è la più numerosa tra le classi dei *Tunicata*; si tratta di un taxon parafiletico comprendente circa 2300 specie, sia solitarie sia coloniali (Delsuc et al. 2018). Le ascidie adulte sono animali sessili e filtratori dotati di due sifoni: uno orale inalante, collegato alla faringe fessurata (presenta stigmi ciliati), a livello del quale avviene la selezione dei nutrienti dall'acqua in entrata, e uno atriale esalante, da cui l'acqua viene espulsa assieme alle feci e ai gameti e, nelle ascidie coloniali, alle larve. La faringe fessurata occupa gran parte del volume corporeo; la sua parete interna è ricoperta da una rete mucosa prodotta dall'endostilo, che seleziona e intrappola il particellato in sospensione del quale l'animale si nutre. Il sistema nervoso centrale dell'adulto è costituito da un ganglio cerebroviscerale situato tra i due sifoni, dal quale si diramano i nervi che raggiungono i vari organi (Osugi et al., 2017). Il sistema circolatorio è prevalentemente aperto, per cui

l'emolinfa circola liberamente in seni e lacune tra i tessuti o anche, in parte delle ascidie coloniali, all'interno dei vasi periferici nella tunica, spinta da un cuore tubolare in grado di invertire il verso di spinta ogni 1-2 min circa (Burighel & Cloney, 1997). Le ascidie sono animali ermafroditi a riproduzione prevalentemente sessuale ma la riproduzione asessuale caratterizza le specie coloniali. La fecondazione è esterna per le ascidie solitarie, interna per quelle coloniali. Il loro ciclo vitale prevede una fase larvale natante di breve durata, che si ancora ad un substrato solido e poi metamorfosa in adulto (Hotta et al., 2020).

1.3 *Botryllus schlosseri*

B. schlosseri è un'ascidia coloniale appartenente alla famiglia *Styelidae.* È una specie diffusa in acque temperate poco profonde, dove cresce adesa a substrati solidi naturali o artificiali. Ciascuna colonia è costituita dall'insieme di individui adulti chiamati zoidi, lunghi pochi millimetri, raggruppati in sistemi a forma di stella. La colonia deriva dalla metamorfosi di una singola larva, per cui gli zoidi, derivanti da riproduzione asessuale, risultano geneticamente identici tra loro. Gli zoidi adulti di un sistema rappresentano la componente filtrante della colonia. Il sifone orale (inalante) di ogni zoide è rivolto verso l'esterno del sistema mentre quello atriale (esalante) è orientato verso il centro del sistema, dove confluisce in una camera cloacale comune che si apre all'esterno con un sifone cloacale (Figura 1) (Manni et al., 2014).

B. schlosseri è considerato un ottimo organismo modello per gli studi sulla riproduzione sessuale e asessuale, sull'immunità innata e sui processi di rigenerazione. Si tratta di una specie facilmente reperibile in natura lungo tutto l'arco dell'anno e facile da allevare in condizioni di laboratorio. La possibilità di ottenere repliche geneticamente identiche (subcloni) dalla frammentazione di una colonia rappresenta un importante vantaggio sperimentale, consentendo l'esposizione a condizioni differenti in individui geneticamente identici. La tunica traslucida permette inoltre un'agevole osservazione al microscopio della colonia *in toto* (Manni et al., 2019).

B. schlosseri si riproduce sia per via sessuale, con fecondazione interna, sia per via asessuale. Si tratta di una specie ovovivipara, per cui l'embrione si sviluppa all'interno delle camere peribranchiali degli zoidi fino alla schiusa delle larve

giriniformi, che verranno infine rilasciate all'esterno attraverso il sifone cloacale. Quando trovano un substrato adatto, le larve si fissano e metamorfosano in un oozoide, l'organismo fondatore della nuova colonia, che accrescendosi per riproduzione asessuale, formerà altri blastozoidi. Dagli zoidi si formano, per gemmazione palleale, le gemme primarie, e da queste, sempre per gemmazione palleale, le gemma secondarie o gemmine (Figura 2). Queste tre generazioni simultanee progrediscono in maniera sincrona grazie al sistema circolatorio che mette in comunicazione tutte le parti della colonia. In *B. schlosseri*, il sistema circolatorio aperto all'interno degli zoidi continua in un vaso marginale chiuso che va a circondare l'intera colonia, dal quale dipartono altri vasi chiusi, radiali, che collegano gli zoidi tra loro. Dai vasi radiali originano terminazioni contrattili a fondo cieco chiamate ampolle (Manni et al., 2007).

1.3.1 Il ciclo blastogenetico coloniale

Come precedentemente accennato, in ogni colonia di *B. schlosseri* convivono tre generazioni: gli zoidi adulti, le gemme primarie e le gemme secondarie. A intervalli di circa 1 settimana, a 19 °C in condizioni controllate di laboratorio, le colonie partecipano ad un cambio generazionale altrimenti noto come *take-over* (TO). L'intervallo di tempo tra due TO successivi definisce un ciclo blastogenetico completo. Durante il TO, i tessuti degli zoidi adulti vanno incontro ad apoptosi e gli zoidi vengono progressivamente riassorbiti e sostituiti dalle gemme primarie in accrescimento. Questo riassorbimento è reso possibile dall'attività degli immunociti circolanti (fagociti e cellule morulari citotossiche) (Ballarin et al., 2010).

Secondo il metodo di stadiazione proposto da Sabbadin (Sabbadin, 1958), le fasi del ciclo blastogenetico delle colonie di *B. schlosseri* vengono descritte mediante una combinazione di tre numeri, che riflettono lo stadio di sviluppo rispettivamente dello zoide, della gemma primaria e della gemma secondaria. Il primo valore (9-11) si riferisce allo zoide: lo stadio 9 indica sifoni aperti, mentre lo stadio 11 corrisponde al TO, in cui i sifoni si chiudono e gli zoidi adulti vanno incontro a regressione. Il secondo valore (7-8) descrive la gemma primaria: lo stadio 8 indica la presenza di un cuore funzionale, mentre lo stadio 7 corrisponde all'inizio del ciclo blastogenetico, con assenza di attività cardiaca. Il terzo valore (1-6) si riferisce

alla gemma secondaria e ne descrive la progressione morfogenetica. Durante lo sviluppo della gemma secondaria, lo stadio 2 corrisponde alla sua prima visibilità esterna rispetto alla gemma primaria; allo stadio 3 assume una morfologia semisferica con doppia vescicola; tra gli stadi 4 e 6 si formano progressivamente gli abbozzi dei principali organi e sistemi, inclusi apparato digerente, sistema nervoso, camera atriale ed endostilo, fino alla completa integrazione del sistema circolatorio periferico. Al termine dello sviluppo, la gemma secondaria (stadio 6) diventa gemma primaria (stadio 7), mentre la precedente gemma primaria matura in zoide funzionale (stadio 8–9), caratterizzato da sifoni aperti. Gli individui sessualmente maturi, con gonadi sviluppate e produzione di gameti, sono indicati come stadio 10. Lo stadio 11 corrisponde infine al TO, durante il quale lo zoide chiude i sifoni e va incontro ad apoptosi con cessazione dell'attività cardiaca. In base alla fase del ciclo blastogenetico, le colonie possono trovarsi in *early cycle* (EC) un giorno dopo il TO, in *mid cycle* (MC) se lontane più di un giorno dal TO precedente o successivo, e in *late cycle* (LC) nel giorno immediatamente precedente al TO (Figura 3) (Manni et al., 2007).

1.4 Il sistema del complemento

L'insieme di molecole, cellule, tessuti e organi che cooperano nella difesa dell'organismo contro i patogeni costituisce il sistema immunitario. La componente più antica è rappresentata dall'immunità innata, una risposta aspecifica basata su barriere anatomiche, difese chimiche e cellulari. I patogeni vengono riconosciuti come "*non-self*", attivando processi di fagocitosi, infiammazione e il sistema del complemento. Nei vertebrati è presente anche l'immunità adattativa, mediata dai linfociti B e T e responsabile della memoria immunologica (Abbas et al., 2022).

Il sistema del complemento fu descritto per la prima volta nei Vertebrati nel 1898 (Volanakis, 1989) ed è stato successivamente identificato in diversi gruppi di metazoi. Nei vertebrati è costituito da oltre 50 proteine plasmatiche e di membrana che interagiscono per generare una risposta microbicida (Ricklin et al., 2010). L'attivazione del complemento può avvenire attraverso tre vie principali: classica, lectinica e alternativa. Queste convergono nella formazione di C3 convertasi (C4b2a nelle vie classica e lectinica; C3bBb nella via alternativa), che scinde la proteina C3 nei frammenti C3a e C3b, dando avvio all'amplificazione della risposta

immunitaria (Figura 4) (Müller-Eberhard, 1986; Le Friec & Kemper, 2009; Ricklin et al., 2010).

1.4.1 Il complemento in *B. schlosseri*

In *B. schlosseri* sono stati identificati numerosi componenti del sistema del complemento omologhi a quelli dei vertebrati, tra cui il fattore B (BsBf), la proteina C3 (BsC3), la *mannose-binding lectin* (BsMBL), una ficolina (BsFicolina) e una serin-proteasi associata alle lectine (BsMASP) (Franchi & Ballarin, 2014; Peronato et al., 2020a). La presenza di tali molecole suggerisce l'esistenza delle vie lectinica e alternativa del complemento.

Successivamente è stata identificata anche una proteina contenente domini globulari C1q, denominata BsC1qDC, strutturalmente affine alla CTRP4 umana (Peronato et al., 2021). Sebbene non sia stato dimostrato un suo coinvolgimento diretto nell'attivazione del complemento, BsC1qDC è in grado di agire come opsonina e di modulare l'attività delle cellule citotossiche, suggerendo un ruolo nel riconoscimento del *non-self* e nella coordinazione della risposta immunitaria.

I geni del complemento finora caratterizzati sono espressi principalmente dalle cellule morulari, gli emociti più abbondanti dell'emolinfa e tra i principali effettori dell'immunità innata in questa specie. Le evidenze disponibili indicano che il complemento contribuisce ai processi di opsonizzazione e fagocitosi e che l'espressione di alcune sue componenti varia durante il ciclo blastogenetico, suggerendo un coinvolgimento non solo nella difesa immunitaria ma anche nei processi di rimodellamento tissutale associati al ciclo vitale della colonia (Franchi & Ballarin, 2017; Peronato et al., 2020a, 2020b; Peronato et al., 2021).

1.4.2 La proteina BsC3

Tra le componenti del complemento identificate in *B. schlosseri*, la proteina C3 occupa una posizione centrale. L'omologo di C3 dei vertebrati, denominato BsC3, presenta le principali caratteristiche strutturali conservate della famiglia delle proteine C3/C4/C5 e, in seguito all'attivazione del complemento, viene scisso nei frammenti C3a e C3b (Franchi & Ballarin, 2014). Analogamente a quanto osservato nei vertebrati, C3a svolge funzioni pro-infiammatorie e chemiotattiche, mentre C3b

agisce come opsonina, favorendo il riconoscimento e la fagocitosi di microrganismi, particelle estranee e cellule apoptotiche (Peronato et al., 2020a).

L'importanza funzionale di BsC3 è stata dimostrata mediante diversi approcci sperimentali. L'inibizione della proteina tramite compstatina, anticorpi anti-C3 o RNA *interference* nei confronti del gene *bsc3* determina una significativa riduzione dell'attività fagocitaria degli emociti, evidenziando il ruolo cruciale di questa molecola nei processi di eliminazione del *non-self* (Franchi & Ballarin, 2014; Peronato et al., 2020a).

Sono stati inoltre identificati un recettore omologo ai recettori vertebrati C3aR/C5aR, espresso nelle cellule morulari, e un omologo del recettore CR1, localizzato principalmente nei fagociti e negli emoblasti (Peronato et al., 2020b). Questi risultati suggeriscono l'esistenza di una complessa rete di comunicazione tra differenti popolazioni emocitarie mediata dai prodotti di attivazione di C3.

L'espressione di *bsc3* è modulata durante il ciclo blastogenetico e raggiunge i livelli più elevati durante il TO. Tale aumento è coerente con il ruolo di BsC3 nella promozione della fagocitosi e nella rimozione dei tessuti degenerati, indicando un coinvolgimento della proteina non solo nella difesa immunitaria ma anche nei processi fisiologici di *turnover* tissutale che caratterizzano il ciclo vitale della colonia (Peronato et al., 2020a).

2. SCOPO DELLA TESI

La proteina BsC3 rappresenta una componente centrale del sistema del complemento di *B. schlosseri* ed è nota per il suo ruolo nella regolazione della risposta immunitaria e dei processi fagocitari. Tuttavia, recenti evidenze suggeriscono che le proteine del complemento possano svolgere anche funzioni non canoniche, indipendenti dalla difesa contro i patogeni e coinvolte in processi di sviluppo e rimodellamento tissutale.

Alla luce di queste osservazioni, la presente tesi si propone di indagare il possibile coinvolgimento di BsC3 nella regolazione del ciclo blastogenetico di *B. schlosseri*. In particolare, è stato valutato l'effetto dell'inibizione della proteina C3 mediante compstatina, un inibitore specifico del complemento, microiniettata quotidianamente nella circolazione delle colonie per dieci giorni consecutivi. L'obiettivo è stato quello di verificare l'eventuale comparsa di alterazioni morfologiche e fisiologiche durante il ciclo blastogenetico.

In aggiunta, sono stati condotti esperimenti di immunoistochimica utilizzando un anticorpo commerciale anti-C3 al fine di analizzare la distribuzione della proteina BsC3 nelle colonie durante differenti fasi del ciclo blastogenetico (EC, MC e TO). L'analisi dell'espressione spaziale e temporale di BsC3 ha permesso di valutare un suo possibile coinvolgimento nei processi di sviluppo, differenziamento e *turnover* tissutale che caratterizzano il ciclo vitale della colonia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento degli animali e allevamento in laboratorio

Le colonie utilizzate per la sperimentazione sono state raccolte tra marzo e aprile 2026 a Chioggia (VE), dove crescono aderenti a pontili e piante acquatiche del genere *Zostera*. Dopo il campionamento, le colonie sono state trasferite presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova e lasciate aderire a vetrini delle dimensioni di 5 cm x 5 cm. Gli organismi sono stati mantenuti in vasche areate contenenti acqua di mare naturale, all'interno di stanze termostatate a 16 °C e sottoposte a fotoperiodo di 12 ore di luce alternate a 12 ore di buio. L'acqua delle vasche veniva sostituita 1 o 2 volte la settimana; durante tale operazione gli animali venivano puliti con rimozione della tunica vecchia più esterna e di eventuali organismi epibionti. Gli animali venivano alimentati a giorni alterni mediante una miscela costituita dall'alga verde *Tetraselmis chuii* e dal mangime commerciale *Coral Food P* (*Oceanlife*).

3.2 Stadiazione delle colonie e preparazione per la sperimentazione

La stadiazione delle colonie è stata effettuata secondo il metodo descritto da Sabbadin (1958), precedentemente illustrato. Per la sperimentazione sono state selezionate tre colonie geneticamente distinte e in buono stato di salute, caratterizzate da tunica trasparente e assenza di epibionti, successivamente suddivise in subcloni.

Dopo un periodo di acclimatazione di cinque giorni, necessario per consentire ai subcloni di recuperare dal taglio e di aderire completamente ai vetrini, e una volta raggiunte le fasi 9/7/1 (EC), 9/8/3 (MC) e 11/8/6 (TO), gli animali sono stati anestetizzati con tricaina metansolfonato (MS-222) fino al completo rilassamento dei tessuti, verificato dall'assenza di reattività dei sifoni agli stimoli meccanici. Successivamente, i campioni sono stati fissati *overnight* a 4 °C in paraformaldeide (PFA) al 4% preparata in PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 6,5

mM Na_2HPO_4, pH 7,2). Il giorno successivo, i campioni sono stati disidratati mediante passaggi sequenziali in metanolo (MeOH) a concentrazione crescente dal 30% al 100%, per poi essere inclusi in Paraplast X-TRA (Tyco Kendall) in preparazione alle analisi immunoistochimiche. A tal fine, le colonie completamente disidratate sono state trattate con xilene per 30 min, al fine di favorire la sostituzione dell'acqua residua e l'irrigidimento dei tessuti. Successivamente, i campioni sono stati incubati a 60 °C in una soluzione di xilene e Paraplast (1:1) per ulteriori 30 min e infine trasferiti in Paraplast per 2-4 ore all'interno di apposite formine di ceramica. I blocchetti ottenuti sono stati conservati a 4 °C fino al momento dell'utilizzo.

Per gli esperimenti di microiniezione, i subcloni destinati al controllo e quelli destinati al trattamento con compstatina, formati da 3-5 sistemi, sono stati mantenuti in condizioni di acclimatazione fino al raggiungimento dello stadio 9/7/1. Tale stadio è stato selezionato al fine di valutare gli effetti del trattamento *in vivo* lungo l'intero ciclo blastogenetico.

3.3 Immunoistochimica per la rivelazione della proteina C3

Sezioni istologiche dello spessore di 5 μm sono state ottenute a partire dalle colonie precedentemente incluse in Paraplast mediante microtomo Leica Reichert-Jung 2040 Autocut. Le sezioni sono state raccolte su vetrini SuperFrost Plus (Menzel-Gläser) e lasciate aderire su piastra riscaldante a 30 °C per 2–4 ore, fino a completa disidratazione. Per la rimozione della paraffina, i vetrini sono stati trattati in xilene per 20 min e successivamente reidratati mediante passaggi sequenziali in metanolo a concentrazione decrescente (dal 100% al 30%). I tessuti sono stati quindi lavati in PBS e permeabilizzati con Triton X-100 allo 0,05% in PBS per 10 min. Dopo un rapido lavaggio in PBS, le sezioni sono state nuovamente fissate in PFA al 4% in PBS per 10 min, al fine di stabilizzare i tessuti e preservarne la morfologia dopo la permeabilizzazione. Dopo ulteriori lavaggi in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4), è stato effettuato il blocco della perossidasi endogena mediante incubazione in H_2O_2 al 3% in TBS per 30 min al buio. Successivamente, dopo lavaggi in TBST (TBS contenente Tween-20 allo 0,1%), è stato eseguito il blocco del *background* (dei siti di legame aspecifici) mediante incubazione per 2 ore in una soluzione contenente siero di capra (*normal goat serum*; NGS) al 3% e albumina

da siero bovino (*bovine serum albumin*; BSA) al 2% in TBST. L'anticorpo primario policlonale anti-C3 di capra *goat* è stato applicato alle sezioni, ad eccezione dei controlli negativi, alla diluizione di 1:500 in una soluzione contenente NGS al 2% e BSA all'1% in TBST, con incubazione *overnight* a 4 °C.

Il giorno successivo, dopo lavaggi in TBST per rimuovere l'anticorpo primario non legato, è stato aggiunto l'anticorpo secondario perossidato anti-IgG di capra, diluito 1:1000 nella medesima soluzione di incubazione (NGS 2% e BSA 1% in TBST), per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione sono stati eseguiti dei lavaggi in TBST per rimuovere l'anticorpo secondario non legato. Le sezioni sono state incubate per 10 min al buio con una soluzione di 3,3'-diaminobenzidina (DAB) preparata sciogliendo 0,01 g di DAB in 40 mL di TBS e aggiungendo 5 µL di H_2O_2.

Infine, i vetrini sono stati lavati brevemente in acqua Milli-Q, disidratati mediante passaggi sequenziali in metanolo, trattati con xilene per 20 min e montati con Eukitt (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico.

3.4 Microiniezioni di compstatina nel corso del ciclo blastogenetico

Le microiniezioni sono state eseguite a partire dalle ampolle marginali alla colonia, utilizzando un microiniettore PLI-100 pico-injector (Medical Systems Corp, Greenvale, NY) fornito di capillari di vetro preparati con tiracapillari (Narishige). In ciascun subclone sono stati somministrati 1 µl di soluzione ogni 6 zoidi; nel subclone di controllo è stata microiniettata acqua di mare filtrata (0,22 µm) contenente 0,0025% di rosso fenolo, utilizzato come indicatore visivo per monitorare, allo stereomicroscopio, l'efficacia della microiniezione; nel subclone trattato è stata microiniettata la stessa soluzione del controllo con l'aggiunta di compstatina (inibitore di C3).

La concentrazione di compstatina è stata scelta sulla base degli studi di Franchi & Ballarin (2014), nei quali lo stesso inibitore è stato utilizzato *in vitro* a concentrazioni superiori (50 µM e 100 µM) in incubazioni acute di emolinfa della durata di 1 ora. Nel presente studio, le microiniezioni sono state eseguite *in vivo*

ogni 24 ore per 10 giorni consecutivi, a partire da colonie allo stadio 9/7/1 fino al raggiungimento del medesimo stadio finale. Considerando la differenza tra esposizione acuta *in vitro* e trattamento cronico e ripetuto *in vivo*, concentrazioni pari a 50 μM o 100 μM sono state ritenute non compatibili con una somministrazione prolungata. È stata quindi adottata una concentrazione inferiore (10 μM) per garantire un'esposizione continua più sostenibile.

3.4.1 Valutazione degli effetti della compstatina sul ciclo

Prima di ciascuna microiniezione, le colonie sono state stadiate e sono stati contati i battiti cardiaci di tre zoidi per subclone. La frequenza cardiaca è stata misurata per un intervallo di 20 secondi, iniziando 5 secondi dopo l'inversione del flusso circolatorio, al fine di consentire il raggiungimento di un ritmo cardiaco stabile. Successivamente, sono state acquisite immagini dei subcloni in visione dorsale, con i sifoni il più possibile rilassati, e ventrale mediante stereomicroscopio Leica MZ16, impostando una scala di riferimento per le successive analisi morfometriche. Le immagini sono state analizzate utilizzando il software ImageJ (Fiji *distribution*), attraverso il quale sono stati quantificati i seguenti parametri morfometrici per tutti gli zoidi formanti i subcloni: lunghezza e larghezza degli zoidi, perimetro e area.

3.4.2 Analisi statistica dei dati

Le medie di lunghezza, larghezza, perimetro e area degli zoidi (n = 34-54) ± deviazione standard sono state rappresentate mediante grafici a linee. Il confronto tra subcloni trattati e controlli è stato effettuato mediante test *t* di *Student*.

La frequenza dei battiti cardiaci (n = 3), espressa come media ± deviazione standard, è stata riportata in una tabella. Anche in questo caso, il confronto tra trattati e controlli è stato eseguito mediante test t di *Student*.

4. RISULTATI

4.1 Espressione di C3 durante il ciclo blastogenetico

A seguito dell'immunoistochimica, i vetrini sono stati analizzati al microscopio ottico per l'identificazione del segnale positivo, evidenziato da una colorazione marrone. Tale segnale deriva dalla precipitazione insolubile della DAB, ossidata in presenza di perossido di idrogeno dall'enzima perossidasi coniugato all'anticorpo secondario, e indica la presenza della proteina C3.

La specificità del segnale è stata valutata mediante confronto con i controlli negativi, al fine di escludere la presenza di colorazioni aspecifiche di *background*. Nei campioni trattati è stata osservata una colorazione positiva a livello delle gemme primarie, in particolare nelle regioni dell'endostilo, stomaco, intestino e cellule germinali femminili allo stadio 9/7/1, nonché nelle gemme secondarie allo stadio 9/8/3. Sono inoltre marcati gli involucri ovulari (cellule follicolari interne ed esterne e cellule testacee, mentre i controlli negativi non hanno mostrato segnale nelle medesime strutture. Tali risultati indicano la presenza del segnale associato alla proteina C3 nei campioni trattati (Figura 5).

4.2 Cambiamenti morfologici e fisiologici indotti dall'inibizione di C3

L'analisi morfometrica ha evidenziato un diverso andamento dell'area media degli zoidi tra le colonie trattate con compstatina e quelle di controllo nel corso del ciclo blastogenetico. I grafici relativi a lunghezza, larghezza e perimetro degli zoidi adulti seguono l'andamento delle aree e non sono stati riportati. Nei primi giorni di esposizione non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi. A partire dal giorno 4, invece, le colonie trattate hanno mostrato una progressiva riduzione dell'area media degli zoidi rispetto ai controlli, con differenze altamente significative ($p < 0{,}001$) che si sono mantenute fino al TO, osservato al giorno 6 (Figura 6). L'analisi degli stadi blastogenetici ha inoltre evidenziato un'anticipazione del TO nelle colonie trattate rispetto ai controlli: il cambio generazionale si è verificato al giorno 7 nelle colonie sottoposte a trattamento con compstatina, mentre nelle colonie di controllo è stato osservato al giorno 8 (Figura

6; Tabella 1). Successivamente al TO, durante gli ultimi due giorni di microiniezione, l'area media degli zoidi in regressione nelle colonie trattate è risultata significativamente maggiore rispetto a quella delle colonie di controllo ($p < 0,001$).

Per quanto riguarda i parametri fisiologici, l'analisi della frequenza cardiaca ha mostrato differenze significative tra i due gruppi in corrispondenza del TO. In tale fase, gli zoidi di entrambe le condizioni sperimentali hanno presentato l'arresto del battito cardiaco, fenomeno associato al processo di sostituzione generazionale; tuttavia, la diversa tempistica del TO tra trattati e controlli ha determinato differenze significative nella frequenza cardiaca registrata nei due gruppi ($p < 0,001$) (Tabella 1).

Nel gruppo trattato, uno dei sistemi sembra entrare in TO precoce già al quarto giorno, mentre il resto della colonia si trova ancora nello stadio 9/8/4 (Figura 7B). All'ottavo giorno, quando la colonia raggiunge lo stadio 9/7/1, questo sistema presenta lo stesso numero di zoidi osservato all'inizio dell'esperimento (Figura 7D). Successivamente, tra il nono e il decimo giorno, il sistema va incontro a un completo riassorbimento (Figura 7F). A partire dall'ottavo giorno e fino al termine dell'osservazione, le immagini evidenziano inoltre la regressione di un secondo sistema appartenente al gruppo trattato (Figura 7D-F). Tale regressione interessa alcuni dei suoi zoidi e determina, all'ultimo giorno di monitoraggio, una riduzione del loro numero da 8 a 7 rispetto alla condizione iniziale (Figura 7F). Alcune immagini rappresentative del gruppo di controllo sono riportate in Figura 8.

5. DISCUSSIONE

Il presente studio ha investigato il ruolo della proteina C3 del complemento di *B. schlosseri* (BsC3) durante il ciclo blastogenetico, con l'obiettivo di verificare se questa molecola svolga funzioni ulteriori rispetto a quelle canoniche legate all'immunità innata.

Le analisi immunoistochimiche hanno evidenziato la presenza di BsC3 in strutture non direttamente riconducibili alla risposta immunitaria, tra cui le gemme primarie e secondarie e le cellule germinali femminili. Tale distribuzione è coerente con la crescente evidenza secondo cui il sistema del complemento svolge numerose funzioni fisiologiche oltre alla difesa contro i patogeni. Nei vertebrati, infatti, C3 non viene prodotto esclusivamente a livello epatico, ma può essere sintetizzato localmente da diversi tessuti, dove contribuisce alla regolazione dell'omeostasi cellulare e tissutale. Inoltre, è stato dimostrato che componenti intracellulari del complemento influenzano processi metabolici fondamentali, inclusi la glicolisi, la funzionalità mitocondriale e la sopravvivenza cellulare (Kolev & Kemper, 2017; Kunz & Kemper, 2021).

L'espressione di BsC3 nelle gemme appare di particolare rilevanza considerando il ruolo di queste strutture nel rinnovo ciclico della colonia. Le gemme primarie sono destinate a sostituire gli zoidi adulti durante il TO, mentre le gemme secondarie rappresentano la generazione successiva. La presenza di C3 in tali strutture suggerisce quindi un possibile coinvolgimento nei processi di crescita, differenziamento e organizzazione dei tessuti. Questa ipotesi trova riscontro nella letteratura sui vertebrati, dove il complemento è stato associato a numerosi processi dello sviluppo. In particolare, la via C3a/C3aR è coinvolta nella migrazione cellulare durante lo sviluppo embrionale (Rutkowski et al., 2010) e nella regolazione della migrazione neuronale corticale (Gorelik et al., 2017). Quest'ultimo studio ha dimostrato che l'inibizione di C3 compromette la corretta migrazione dei neuroni durante lo sviluppo cerebrale murino, evidenziando un ruolo diretto del complemento nella morfogenesi tissutale.

Un ulteriore aspetto interessante riguarda l'espressione di BsC3 nelle cellule germinali femminili. Sebbene manchino studi specifici nei tunicati, diversi lavori hanno documentato la presenza di componenti del complemento durante lo

sviluppo embrionale dei vertebrati e nei processi di organogenesi. Ad esempio, McLin et al. (2008) hanno osservato l'espressione di geni del complemento durante le prime fasi dello sviluppo di *Xenopus laevis*, suggerendo un possibile coinvolgimento in meccanismi di differenziamento cellulare e sviluppo degli organi. Pertanto, l'espressione di BsC3 nelle cellule germinali potrebbe riflettere un ruolo nella regolazione della maturazione cellulare o nella protezione delle cellule riproduttive.

Gli esperimenti di microiniezione con compstatina hanno fornito ulteriori indicazioni sul possibile coinvolgimento di BsC3 in processi non immunitari. Le colonie trattate hanno mostrato una riduzione significativa dell'area degli zoidi e un'anticipazione del TO rispetto ai controlli. Tali risultati indicano che l'inibizione di C3 interferisce con la normale progressione del ciclo blastogenetico e con i processi di accrescimento degli zoidi. Particolarmente rilevante è l'anticipazione del TO osservata nelle colonie trattate. In precedenza, era stato dimostrato che il sistema del complemento di *B. schlosseri* partecipa ai meccanismi di fagocitosi e alla rimozione delle cellule apoptotiche durante il rimodellamento tissutale (Peronato et al., 2020a). Tuttavia, se l'unico ruolo di C3 fosse quello di favorire la *clearance* delle cellule apoptotiche, la sua inibizione dovrebbe teoricamente rallentare il processo di riassorbimento. L'effetto opposto osservato in questo studio suggerisce invece che BsC3 possa contribuire alla regolazione dei segnali che controllano il *timing* del TO, influenzando direttamente l'equilibrio tra degenerazione degli zoidi adulti e sviluppo delle nuove generazioni. Un'ulteriore osservazione significativa riguarda il comportamento di uno dei sistemi trattati, che ha manifestato segni precoci di TO, pur trovandosi ancora il resto della colonia in MC. Sebbene sia stata osservata una temporanea ripresa dello sviluppo, il sistema è successivamente andato incontro a completo riassorbimento. Questo fenomeno potrebbe indicare che l'inibizione prolungata di C3 altera irreversibilmente i meccanismi che garantiscono il corretto coordinamento tra crescita e degenerazione dei tessuti coloniali.

I risultati ottenuti si inseriscono in un contesto scientifico che attribuisce al sistema del complemento funzioni molto più ampie rispetto alla sola immunità innata. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno evidenziato il coinvolgimento di C3 e di altre componenti del complemento in processi di sviluppo, rigenerazione e omeostasi dei

tessuti. Uno degli esempi più noti è rappresentato dal fenomeno del *synaptic pruning* nel sistema nervoso centrale. Durante lo sviluppo post-natale, componenti della cascata classica del complemento marcano le sinapsi destinate all'eliminazione, consentendone il riconoscimento e la fagocitosi da parte della microglia (Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012). Questo meccanismo dimostra come molecole originariamente associate all'immunità possano essere state cooptate nel corso dell'evoluzione per svolgere funzioni fondamentali nella maturazione dei tessuti. Anche nei processi rigenerativi il complemento riveste un ruolo importante. Haynes et al. (2013) hanno dimostrato che il frammento C3a è in grado di promuovere la rigenerazione completa della retina embrionale di pollo attraverso l'attivazione di vie molecolari coinvolte nella proliferazione e differenziamento cellulare. Gli stessi autori riportano inoltre evidenze di espressione di C3 in tessuti rigenerativi di altri vertebrati, suggerendo una funzione conservata del complemento nella rigenerazione e nel rimodellamento tissutale.

Nel caso di *B. schlosseri*, il TO rappresenta un processo biologico unico, caratterizzato dalla morte programmata di un'intera generazione di zoidi e dalla sua sostituzione da parte di nuovi individui sviluppati per blastogenesi. Considerando che l'espressione di *bsc3* aumenta durante il TO e che la sua inibizione altera significativamente la dinamica del processo (Peronato et al., 2020a), come anche da noi dimostrato mediante l'inibizione della proteina, è plausibile ipotizzare che BsC3 contribuisca al coordinamento tra apoptosi, fagocitosi e rigenerazione tissutale. In quest'ottica, il complemento potrebbe rappresentare un elemento chiave nell'integrazione tra meccanismi immunitari e processi di sviluppo.

Nonostante i risultati ottenuti siano coerenti con l'ipotesi di un ruolo non canonico di BsC3, alcuni limiti sperimentali devono essere considerati. Innanzitutto, il numero di colonie sottoposte a trattamento con compstatina è stato limitato, riducendo la robustezza statistica delle osservazioni. Sarà pertanto necessario ampliare il numero di repliche biologiche per confermare gli effetti osservati. Occorrerà anche essere certi di non essere in presenza di un effetto tossico della compstatina. Sarà inoltre necessario verificare l'avvenuta inibizione di BsC3 *in vivo* mediante immunoblot con l'anticorpo specifico per la proteina di *Botryllus*. Tra le prospettive future, sarebbe particolarmente interessante approfondire la localizzazione di BsC3 mediante tecniche di immunofluorescenza e analizzare la

sua espressione nel sistema nervoso durante il ciclo blastogenetico, utilizzando l'anticorpo specifico validato. Inoltre, approcci di silenziamento genico, quali RNA *interference*, potrebbero consentire una caratterizzazione più specifica delle funzioni di BsC3 e del suo recettore rispetto all'utilizzo di inibitori farmacologici.
In conclusione, i risultati di questo studio forniscono nuove evidenze a sostegno dell'esistenza di funzioni non canoniche della proteina C3 in *B. schlosseri*. Oltre al suo ruolo nell'immunità innata, BsC3 sembra contribuire alla regolazione dello sviluppo, del rimodellamento tissutale e della fisiologia coloniale. Tali osservazioni rafforzano l'idea che il sistema del complemento rappresenti un insieme di molecole multifunzionali, evolutivamente conservate e coinvolte in numerosi processi fondamentali della biologia degli organismi.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2022. Cellular and molecular immunology. 10th ed. Elsevier, Chapter 1.

Ballarin L, Burighel P, Cima F. 2008. A tale of death and life: natural apoptosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* (Urochordata, Ascidiacea). Curr Pharm Des. 14: 138-47. doi: 10.2174/138161208783378798.

Ballarin L, Schiavon F, Manni L. 2010. Natural apoptosis during the blastogenetic cycle of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*: a morphological analysis. Zoolog Sci. 27: 96-102. doi: 10.2108/zsj.27.96.

Burighel P, Cloney RA. 1997. Urochordata: Ascidiacea. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 15, pp. 221-347. Wiley-Liss.

Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. Nature. 439: 965-8. doi: 10.1038/nature04336.

Delsuc F, Philippe H, Tsagkogeorga G, Simion P, Tilak MK, Turon X, López-Legentil S, Piette J, Lemaire P, Douzery EJP. 2018. A phylogenomic framework and timescale for comparative studies of tunicates. BMC Biol. 16: 39. doi: 10.1186/s12915-018-0499-2.

Franchi N, Ballarin L. 2014. Preliminary characterization of complement in a colonial tunicate: C3, Bf and inhibition of C3 opsonic activity by compstatin. Dev Comp Immunol. 46: 430-8. doi: 10.1016/j.dci.2014.05.014.

Gorelik A, Sapir T, Haffner-Krausz R, Olender T, Woodruff TM, Reiner O. 2017. Developmental activities of the complement pathway in migrating neurons. Nat Commun. 8: 15096. doi: 10.1038/ncomms15096.

Kolev M, Kemper C. 2017. Keeping it all going-complement meets metabolism. Front Immunol. 18: 8-1. doi: 10.3389/fimmu.2017.00001.

Kunz N, Kemper C. 2021. Complement has brains-do intracellular complement and immunometabolism cooperate in tissue homeostasis and behavior? Front Immunol. 12: 629986. doi: 10.3389/fimmu.2021.629986.

McLin VA, Hu CH, Shah R, Jamrich M. 2008. Expression of complement components coincides with early patterning and organogenesis in *Xenopus laevis*. Int J Dev Biol. 52: 1123-33. doi: 10.1387/ijdb.072465v.

Franchi N, Ballarin L. 2017. Morula cells as key hemocytes of the lectin pathway of complement activation in the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. Fish Shellfish Immunol. 63: 157-164. doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.003.

Haynes T, Luz-Madrigal A, Reis ES, Echeverri Ruiz NP, Grajales-Esquivel E, Tzekou A, Tsonis PA, Lambris JD, Del Rio-Tsonis K. 2013. Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration. Nat Commun. 4: 2312. doi: 10.1038/ncomms3312.

Hirose E, Ohtake SI, Azumi K. 2009. Morphological characterization of the tunic in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), with remarks on 'soft tunic syndrome' in aquaculture. J Fish Dis. 32: 433-45. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01034.x.

Hotta K, Dauga D, Manni L. 2020. The ontology of the anatomy and development of the solitary ascidian *Ciona*: the swimming larva and its metamorphosis. Sci Rep. 10: 17916. doi: 10.1038/s41598-020-73544-9.

Le Friec G, Kemper C. Complement: coming full circle. 2009. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 57(6):393-407. doi: 10.1007/s00005-009-0047-4. Erratum in: Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2010 Jun;58: 253. Friec, Gaëlle Le [corrected to Le Friec, Gaëlle].

Manni L, Zaniolo G, Cima F, Burighel P, Ballarin L. 2007. *Botryllus schlosseri*: a model ascidian for the study of asexual reproduction. Dev Dyn. 236: 335-52. doi: 10.1002/dvdy.21037.

Manni L, Gasparini F, Hotta K, Ishizuka KJ, Ricci L, Tiozzo S, Voskoboynik A, Dauga D. 2014. Ontology for the asexual development and anatomy of the colonial chordate *Botryllus schlosseri*. PLoS One. 9: e96434. doi: 10.1371/journal.pone.0096434.

Manni L, Anselmi C, Cima F, Gasparini F, Voskoboynik A, Martini M, Peronato A, Burighel P, Zaniolo G, Ballarin L. 2019. Sixty years of experimental studies on the blastogenesis of the colonial tunicate Botryllus *schlosseri*. Dev Biol. 448: 293-308. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.09.009.

Müller-Eberhard HJ. 1986. The membrane attack complex of complement. Annu Rev Immunol. 4: 503-28. doi: 10.1146/annurev.iy.04.040186.002443.

Osugi T, Sasakura Y, Satake H. 2017. The nervous system of the adult ascidian *Ciona intestinalis* Type A (*Ciona robusta*): Insights from transgenic animal models. PLoS One. 12: e0180227. doi: 10.1371/journal.pone.0180227.

Peronato A, Drago L, Rothbächer U, Macor P, Ballarin L, Franchi N. 2020a. Complement system and phagocytosis in a colonial protochordate. Dev Comp Immunol. 103:103530. doi: 10.1016/j.dci.2019.103530.

Peronato A, Franchi N, Ballarin L. 2020b. Insights into the complement system of Tunicates: C3a/C5aR of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. Biology (Basel). 9: 263. doi: 10.3390/biology9090263.

Peronato A, Minervini G, Tabarelli M, Ballarin L, Franchi N. 2021. Characterisation and functional role of a novel C1qDC protein from a colonial ascidian. Dev Comp Immunol. 122: 104077. doi: 10.1016/j.dci.2021.104077.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol. 11: 785-97. doi: 10.1038/ni.1923.

Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT. 2010. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. Inflamm Res. 59: 897-905. doi: 10.1007/s00011-010-0220-6.

Sabbadin A. 1958. Analisi sperimentale dello sviluppo delle colonie di *Botryllus schlosseri* (Pallas) [Ascidiacea]. Arch It Anat Emb-riol 63: 178–221.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron. 74: 691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell. 131: 1164-78. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036.

7. APPENDICE

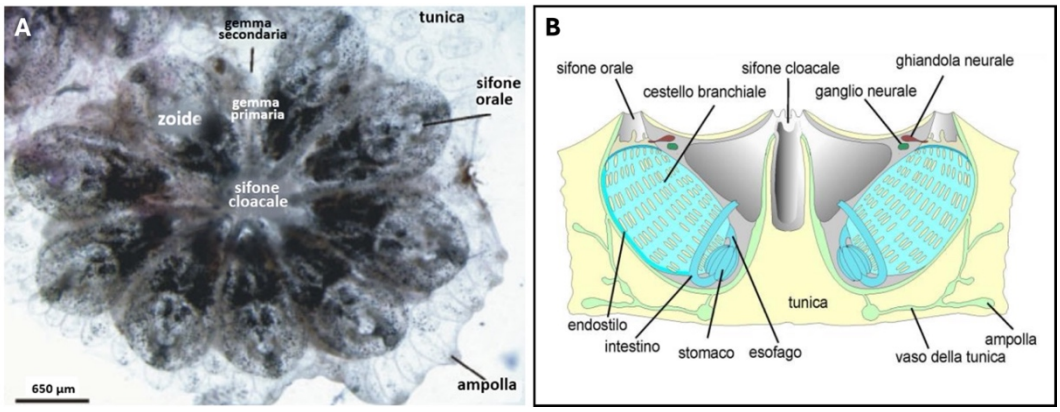

Figura 1. A: visione dorsale di un sistema appartenente a una colonia di *B. schlosseri* (modificata da Manni et al., 2007). B: schema di due blastozoidi costituenti un sistema, con visione interna dei principali organi (modificata da Burighel & Cloney, 1997).

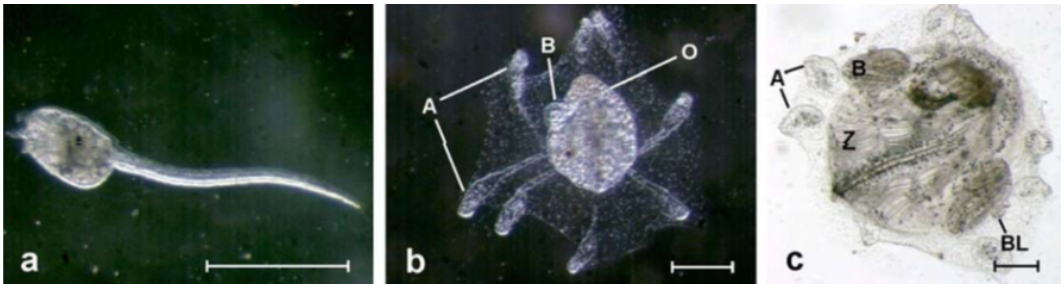

Figura 2. Larva natante di *B. schlosseri* (a). Oozoide fondatore della nuova colonia derivante dalla metamorfosi della larva (b). Primo blastozoide della nuova colonia, originato dall'oozoide per riproduzione asessuata (c). A: ampolle; B: gemma primaria; O: oozoide; BL: gemma secondaria; Z: blastozoide. Scala: 0,5 mm (Ballarin et al., 2008).

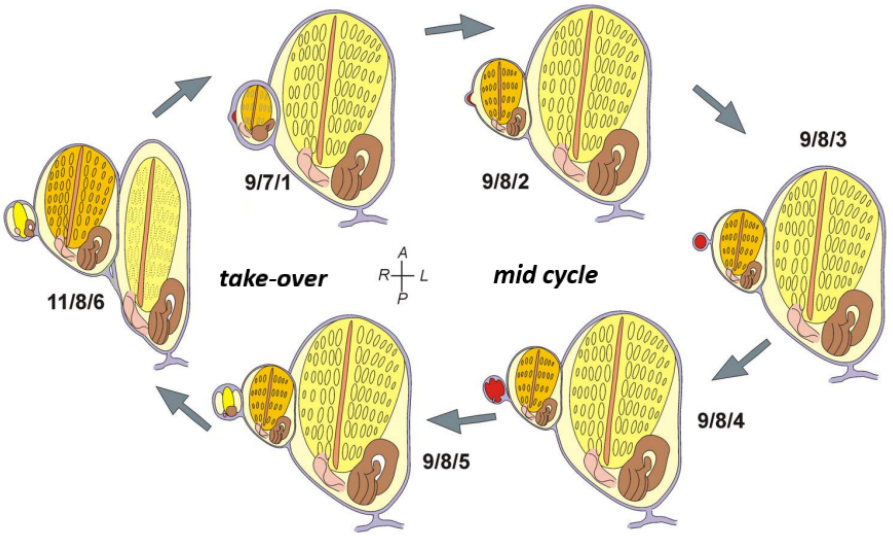

Figura 3. Rappresentazione schematica delle fasi del ciclo blastogenetico di *B. schlosseri* (immagine modificata da Manni et al., 2014).

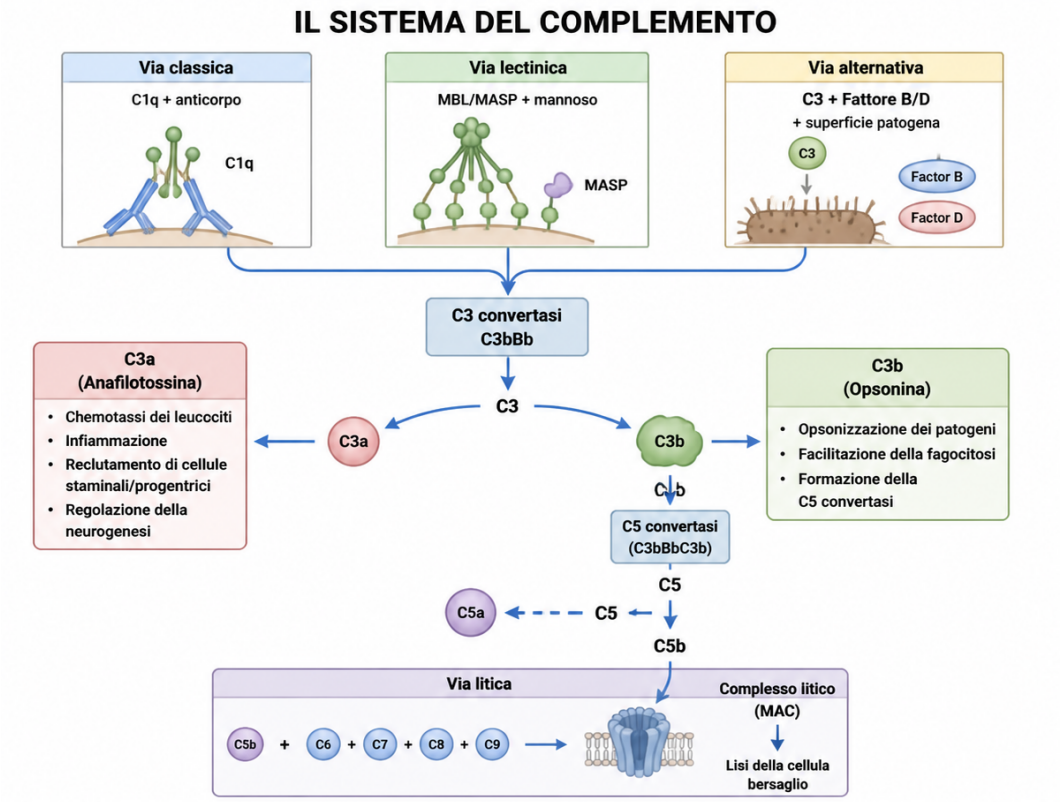

Figura 4. Rappresentazione schematica della cascata del complemento e delle sue principali vie di attivazione. Le vie classica, lectinica e alternativa convergono nell'attivazione di C3, che rappresenta il nodo centrale della cascata. La scissione di C3 genera i frammenti C3a, coinvolto nella risposta infiammatoria e nel

reclutamento delle cellule immunitarie, e C3b, responsabile dell'opsonizzazione dei patogeni e della formazione delle convertasi che amplificano la risposta del complemento. L'attivazione a valle di C5 porta alla formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC), responsabile della lisi della cellula bersaglio (immagine elaborata con l'ausilio di strumenti di intelligenza artificiale).

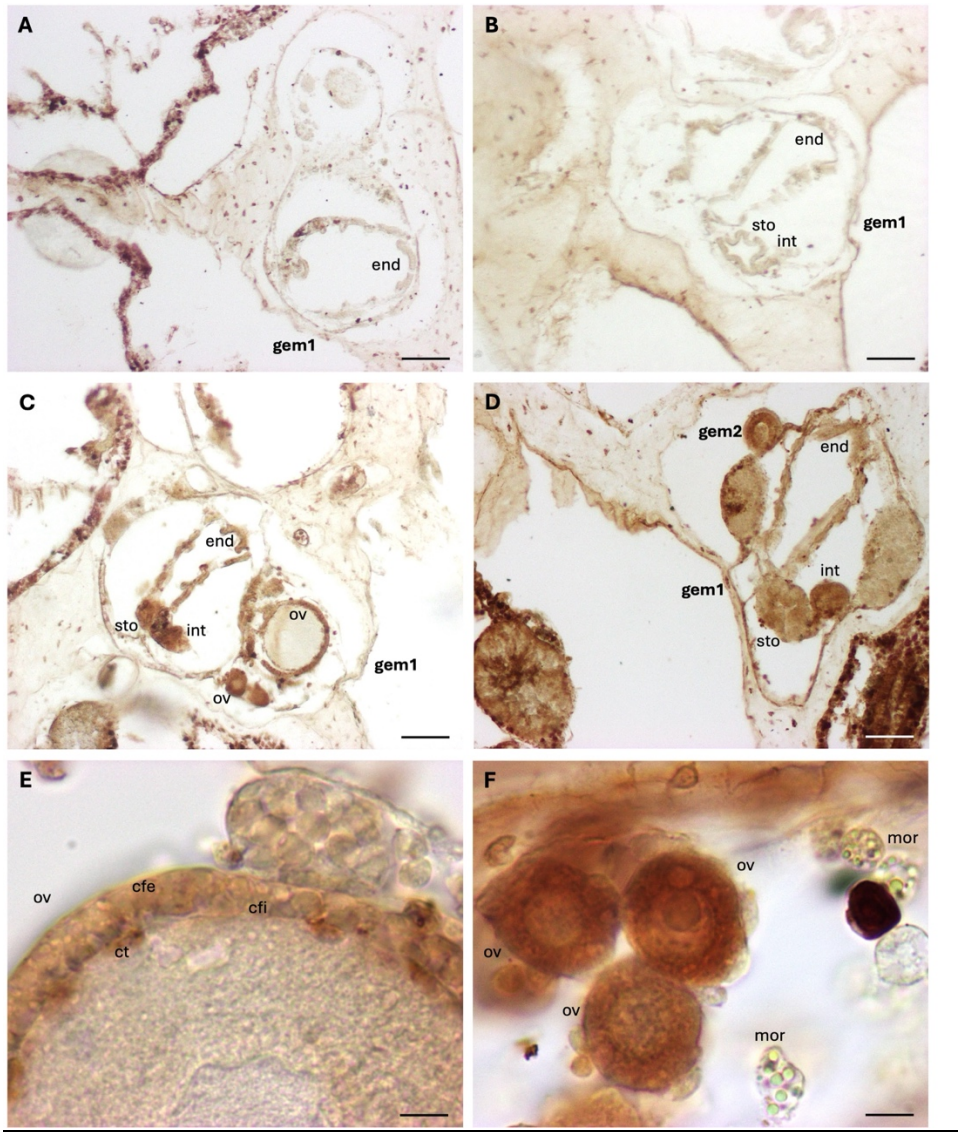

Figura 5. Saggio immunoistochimico con anticorpo anti-C3 commerciale su colonie di *B. schlosseri*, al primo giorno (A-C, E-F) e al terzo-quarto giorno del ciclo blastogenetico coloniale (D). La presenza di C3 è evidenziata dal segnale marrone (C-F). Il controllo negativo (A-B) mostra segnale marrone di *background* a livello della tunica (A). cfi: cellule follicolari interne; cfe: cellule follicolari esterne; ct:

cellule testacee; end: endostilo; gem1: gemma primaria; gem2: gemma secondaria int: intestino; mor: cellula morulare; ov: cellula germinale femminile; sto: stomaco. Scala: 100 µm (A-D) e 10 µm (E-F).

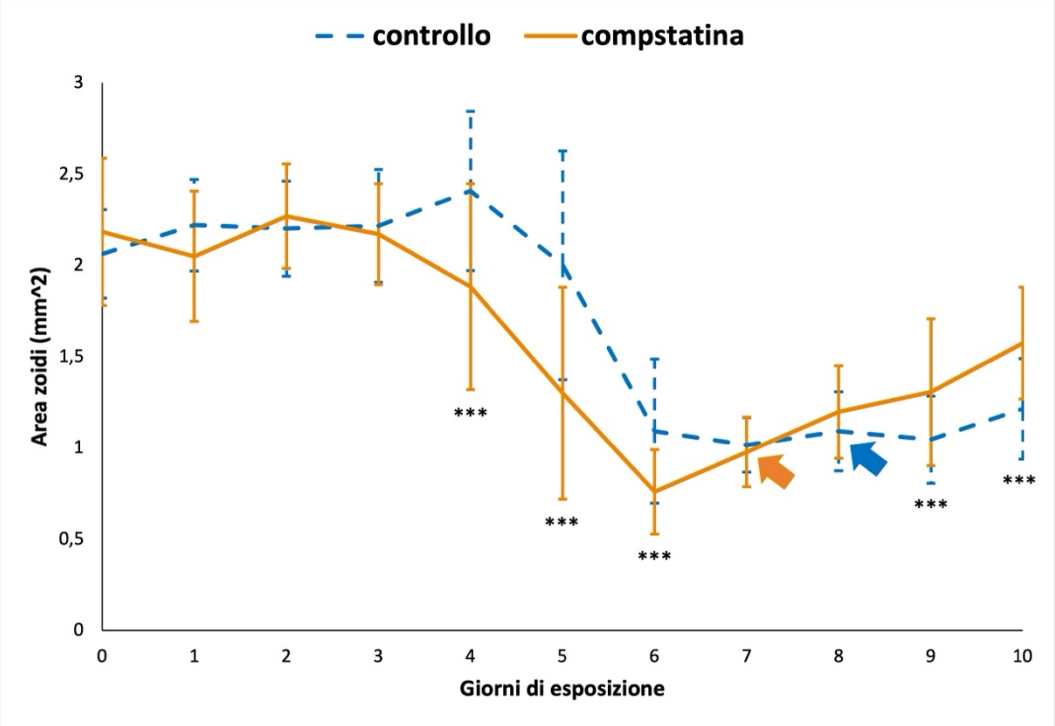

Figura 6. Variazione delle aree medie degli zoidi nella colonia trattata con compstatina (linea continua) e nella colonia non trattata (linea tratteggiata). Le frecce indicano quando è avvenuto il cambio di generazione per la colonia trattata (freccia arancione) e la colonia non trattata (freccia blu). Gli asterischi indicano la significatività statistica dei dati secondo il t-test: ***, $p < 0,001$.

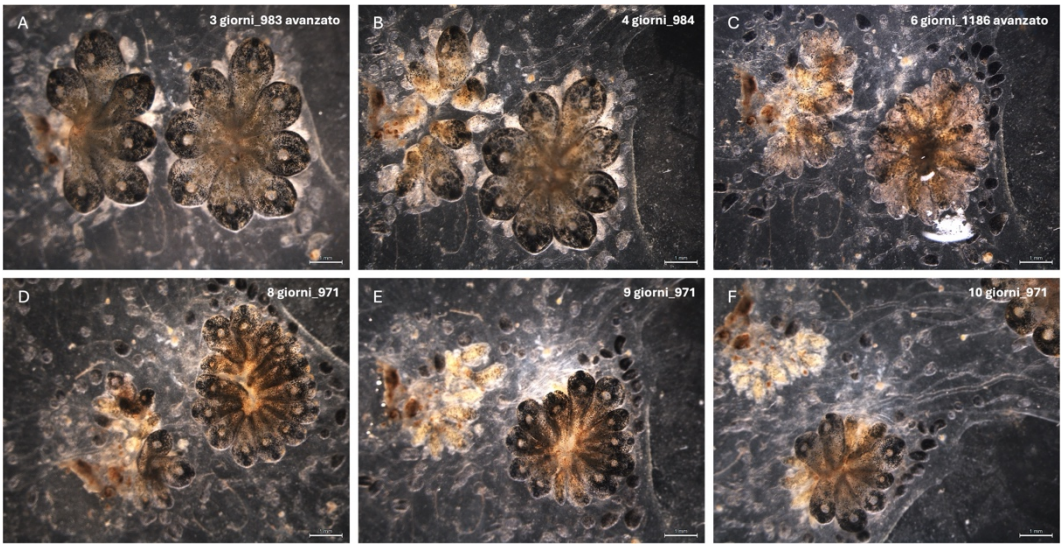

Figura 7. Colonia di *B. schlosseri* trattata con compstatina (visione dorsale) immediatamente prima della microiniezione (A-F). Nelle foto sono riportati i giorni di esposizione e lo stadio. Scala: 1 mm.

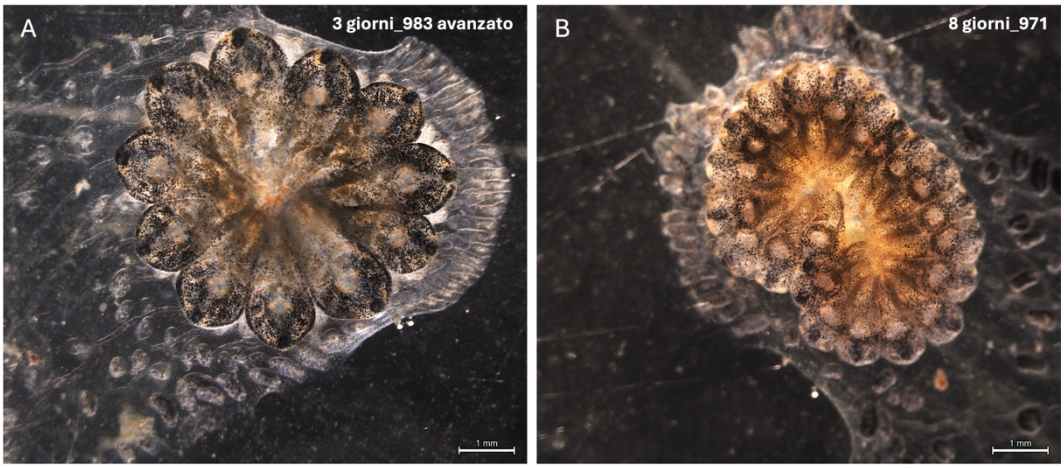

Figura 8. Colonia di *B. schlosseri* non trattata (visione dorsale) immediatamente prima della microiniezione con acqua di mare (A-B). Nelle foto sono riportati i giorni di esposizione e lo stadio. Scala: 1 mm.

Tabella 1. Fasi del ciclo blastogenetico osservati per le colonie di *B. schlosseri* durante il trattamento con o senza compstatina. Evidenziati, rispettivamente in blu per il controllo e arancione per il trattato, sono riportati i cambi di generazione delle colonie. I battiti cardiaci, presentati come medie ± deviazione standard, sono stati valutati assieme agli stadi immediatamente prima delle microiniezioni. La

significatività statistica dei battiti (controllo vs compstatina) è stata valutata con il t-test (***, p ± 0,001).

	Stadio del ciclo blastogenetico		**Media dei battiti cardiaci (20 sec, n = 3)**	
Giorni di esposizione	Controllo	Compstatina	Controllo	Compstatina
0	971	971	32 ± 1	**34,7 ± 1 (*)**
1	982	982	31,3 ± 1,5	31,3 ± 0,6
2	982	982	27,7 ± 1	28 ± 1
3	983 avanzato	983 avanzato	22,7 ± 1	19,7 ± 2
4	984	984	20 ± 2	21,7 ± 2
5	985	985 avanzato	14,3 ± 3	13,7 ± 3
6	1186	1186 avanzato	14,3 ± 3	**0 (***)**
7	1186 avanzato	971	0	**32,7 ± 2,5 (***)**
8	971	971	32 ± 3	28,7 ± 1
9	971	971	31,3 ± 3	30,3 ± 2
10	971	971	29,3 ± 1	**26 ± 0 (**)**