

Nuovi dati sulle abitudini trofiche dei Simuliidi italiani

LEO RIVOSECCHI

Laboratori di Parassitologia

Riassunto. — Sono stati fatti tentativi per nutrire in laboratorio Ditteri della famiglia *Simuliidae*, utilizzando: uccelli (*Turdus merula*), roditori (cavia) e mammiferi (uomo), secondo il metodo illustrato nella Fig. 1 A-B-C.

Su 15 specie sperimentate (Tab. 1), le seguenti 4 hanno assunto un pasto di sangue: *Boophthora erythrocephala* (solo su uomo); *Odagmia pontina* (solo su cavia); *Eusimulium latizonum* f. *paludicola* (solo su *T. merula*); *Eusimulium latigonium* (indifferentemente su *T. merula*, su cavia e su uomo).

Sono stati fatti parecchi tentativi di catturare specie ornitofile sospendendo su alberi gabbie contenenti uccelli (Fig. 1-D). Questo metodo ha avuto successo solo in una località, ove è stato possibile catturare *Eusimulium latizonum paludicola* (gruppo *aureum*).

In seguito alla revisione tassonomica delle femmine dei gruppi *aureum* e *angustitarse* (Fig. 2), si ritiene che 1 femmina raccolta nell'atto di suggere sangue sull'uomo e a suo tempo (RIVOSECCHI & COLUZZI, 1962) citata come *Eusimulium aureum* (s.l.), debba invece essere classificata: *Eusimulium latigonium* (Fig. 4) (gruppo *angustitarse*).

L'esame di femmine collezionate in località alpine, su bovini e su uomo, ha portato alla identificazione di: *Simulium argenteostriatum* (su bovini); *Odagmia ornata* ssp. (su uomo); *Prosimulium conistylum* (Fig. 5) su bovini; *Prosimulium rufipes* su uomo (Fig. 5). (Tab. 2).

Summary (*New data on trophic behaviour of Italian Simuliidae*). — Several attempts were made in laboratory to feed adult *Simuliidae* on birds (*Turdus merula*) and rodents (guinea-pig), as well as on man, following the method illustrated in Fig. 1 A-B-C. Of fifteen species experimented (Table 1), only the four mentioned below took a blood meal:

Boophthora erythrocephala De Geer (man only); *Odagmia pontina* Riv. (guinea-pig only); *Eusimulium latizonum* f. *paludicola* Riv. (*T. merula*

only); *Eusimulium latigonium* Rubz. (*T. merula*, guinea-pug, and man indifferently).

Cages containing chickens or ducks were suspended on trees (Fig. 1-D) throughout the night, leading to the capture of species only, of the *aureum* group.

Figs. 2 and 3 show the methods employed to identify respectively the females of the Italian species of the *aureum* and *angustitarse* groups and those of the genus *Prosimulium*. Specimens of the latter two groups, which took a blood meal in laboratory or were collected on animals, are compared in Fig. 4. Such a comparison allowed to find that one specimen, collected while feeding on man, was erroneously classified *Eusimulium aureum* (s.l.) (RIVOSECCHI & COLUZZI, 1962), while it actually is: *Eusimulium latigonium* (of the *angustitarse* group).

Females of *Simuliidae* collected in Alps on cattle and man were so identified: *Simulium argenteostriatum* (on man); *Odagmia* ssp. (on man); *Prosimulium conistylum* (on cattle, Fig. 5); *Prosimulium rufipes* (on man, Fig. 5). (Tab. 2).

INTRODUZIONE

L'ecologia dei Ditteri della famiglia *Simuliidae* è generalmente meglio conosciuta negli stadi preimmaginali che in quelli immaginali. In particolare, si ignorano le abitudini trofiche della maggior parte delle specie italiane di questa famiglia. I dati sinora pubblicati al riguardo, e attualmente da me ritenuti validi, si riferiscono alle seguenti 11 specie: *Urosimulium juccii* (specie autogena della Sardegna; cfr. CONTINI, 1966); *Prosimulium goidanichi* (su bovini, in Piemonte; cfr. RUBZOV, 1964); *Wilhelmia lineata* e *Titanopteryx maculata* (su bovini nei pressi di Pavia; cfr. CORTI, 1916); *Boophthora erythrocephala* (su uomo, in Piemonte; cfr. RIVOSECCHI & COLUZZI, 1962); *Cnephia blanci*, *Odagmia variegata*, *Odagmia monticola*, *Wilhelmia mediterranea*, *Tetisimulium bezzii*, *Simulium* (?) *voilense* (su uomo, e bovini, in varie località appenniniche; cfr. RIVOSECCHI, 1967).

I nuovi dati si riferiscono a 9 specie, di cui alcune (*Prosimulium conistylum*, *Prosimulium rufipes*, *Odagmia ornata* ssp., *Simulium argenteostriatum*) sono state catturate in località alpine su uomo e bovini. Altre invece (*Eusimulium latigonium*, *Eusimulium latizonum paludicola*, *B. erythrocephala* e *Odagmia pontina*) sono state indotte ad assumere un pasto di sangue in laboratorio.

Gli ostacoli che si incontrano nello studio delle abitudini trofiche dei Simulidi riguardano sia la difficoltà di raccogliere direttamente in natura le femmine nell'atto di succhiare sangue, sia il fatto che la tassonomia dei Simulidi è basata essenzialmente sulla correlazione tra caratteri preimmagi-

nali e immaginali. Ne segue che anche i pochi dati, relativi a femmine catturate in natura nell'atto di nutrirsi, sono spesso tassonomicamente poco validi e vanno intesi *sensu lato*.

Se si riesce ad ottenere in laboratorio un pasto di sangue con femmine sfarfallate da pupe messe in allevamento, la difficoltà diagnostica è facilmente superata, in quanto si conosce la correlazione tra adulti femmine e loro stadi preimmaginali.

Quanto alla cattura in natura di femmine di *Simuliidae*, essa è relativamente facile per le specie che si nutrono con il sangue di bovini, equini e uomo, mentre per quelle che pungono i piccoli roditori e uccelli sono necessarie tecniche particolari.

Per quanto la maggior parte dei tentativi diretti sia ad ottenere in laboratorio un pasto di sangue, sia alla cattura di specie ornitofile, abbia dato esito negativo, i risultati ottenuti con qualche specie dei gruppi *aureum* e *angustitarse* meritano di essere riferiti.

MATERIALI E METODI

Il materiale oggetto del presente studio si riferisce a :

- 1) Simulidi (♀♀) collezionati dal Dott. Osella nelle Alpi occidentali su bovini al pascolo e su uomo.
- 2) Catture sull'uomo nel massiccio dell'Adamello.
- 3) Femmine sfarfallate in laboratorio da pupe raccolte in varie località dell'Italia centrale, con cui si è tentato di ottenere un pasto di sangue in laboratorio.
- 4) Tentativi di catturare Simulidi ornitofili.

I metodi riguardano : a) il metodo di ottenere in laboratorio un pasto di sangue ; b) il metodo per catturare in natura le specie ornitofile ; c) il metodo usato per la classificazione delle femmine delle specie italiane dei gruppi *aureum* e *angustitarse* ; d) il metodo usato per identificare femmine del genere *Prosimulium*, catturate su uomo e su bovini.

a) Metodi per ottenere in laboratorio un pasto di sangue.

La realizzazione di un metodo che permettesse di ottenere in laboratorio un pasto di sangue con femmine di Simulidi è stato sempre considerato come un ostacolo difficilmente superabile.

DAVIES (1936) ha illustrato un metodo per mantenere i Simulidi in laboratorio, usando tubi di vetro (alti 20 cm con diametro di 3 cm) aventi alle due estremità rispettivamente una zolletta di saccarosio avvolta in garza, e uno stoppino umido che, passando attraverso una piccola canna di vetro,

pesca in una vaschetta d'acqua. Questi tubi sono noti nella letteratura come «tubi di mantenimento di Davies» e sono stati utilizzati, nelle presenti osservazioni, sia per mantenere vivi i Simulidi in laboratorio, sia per far succhiare il sangue ai Simulidi, appoggiandone una estremità, coperta o no di garza, sull'animale da pungere.

Recentemente MC MAHON & NELSON (1967) hanno brevemente illustrato 2 diversi metodi per ottenere un pasto di sangue in laboratorio con *Simulium ornatum*. Il primo metodo è il più semplice, e consiste nel porre in tubi di vetro dei ratti neonati con dei simulidi anestetizzati mediante CO₂, affamati per 24 h, alla temperatura di 21°C e con illuminazione a raggi ultravioletti. Il secondo metodo, più complesso, è basato sull'impiego di sangue di bue eparinizzato, fornito ai simulidi attraverso membrane ricavate dalla pelle di pulcini. Quest'ultimo metodo viene descritto con più particolari in una seconda pubblicazione (MC MAHON, 1968), apparsa mentre il presente lavoro era in corso.

Delle raccomandazioni di questo autore si sono perciò potute adottare soltanto quelle riguardanti la temperatura, l'illuminazione ed il ritmo biologico: i simulidi sono stati affamati mantenendoli in tubi di Davies per 1-2 giorni con sola acqua e senza saccarosio; essi sono stati costantemente tenuti al buio ed a temperatura compresa fra i 15° e i 20°C, gli animali da pungere sono stati forniti due volte al giorno (al mattino ed alla sera) non appena i simulidi vedevano la luce.

Per ciascuna delle 15 specie di Simulidi la puntura è stata tentata su un roditore (cavia), su un uccello (*Turdus merula* e *Athena noctua*) e su uomo. Gli uccelli venivano depennati sul torace e immobilizzati, legandoli con della garza a un supporto metallico, al quale veniva appoggiato il tubo contenente i simulidi (Fig. 1-A). La cavia veniva narcotizzata e depilata sul ventre (Fig. 1-B); sull'uomo, il tubo contenente i simulidi era poggiato semplicemente sull'avambraccio e sostenuto con l'altra mano per circa mezz'ora (Fig. 1-C). Per illuminazione, come consiglia MC MAHON (1968), è stata usata una lampada a luce blu da 60 Watt; talora anche la luce del giorno, ma facendone filtrare una quantità molto limitata, in modo da simulare la luce crepuscolare ed evitare comunque quell'affannosa corsa verso la luce, che rappresenta l'ostacolo più grave per la realizzazione di un pasto di sangue in laboratorio.

b) Metodi per la cattura di *Simulidi ornitofili*.

Il metodo generalmente usato per la cattura di simulidi ornitofili è quello a suo tempo impiegato con eccellenti risultati nelle zone forestali del Canada (cfr. BENNET, 1960). Esso consiste nel sospendere una gabbia contenente un uccello ad un albero, abbassandola ad intervalli regolari (15 min) e

coprendola rapidamente con una scatola non appena giunta a terra, in modo da intrappolare i simuliidi eventualmente attratti dall'uccello ingabbiato.

Questo metodo si usa per tutti i Ditteri ornitofili che pungono durante il giorno. Per quelli che pungono di notte, si usano delle gabbie speciali fornite di nasse, che permettono l'ingresso dei Ditteri, attratti dall'odore dell'uccello, ma non ne consentono una altrettanto facile fuoriuscita (Fig. 1-D).

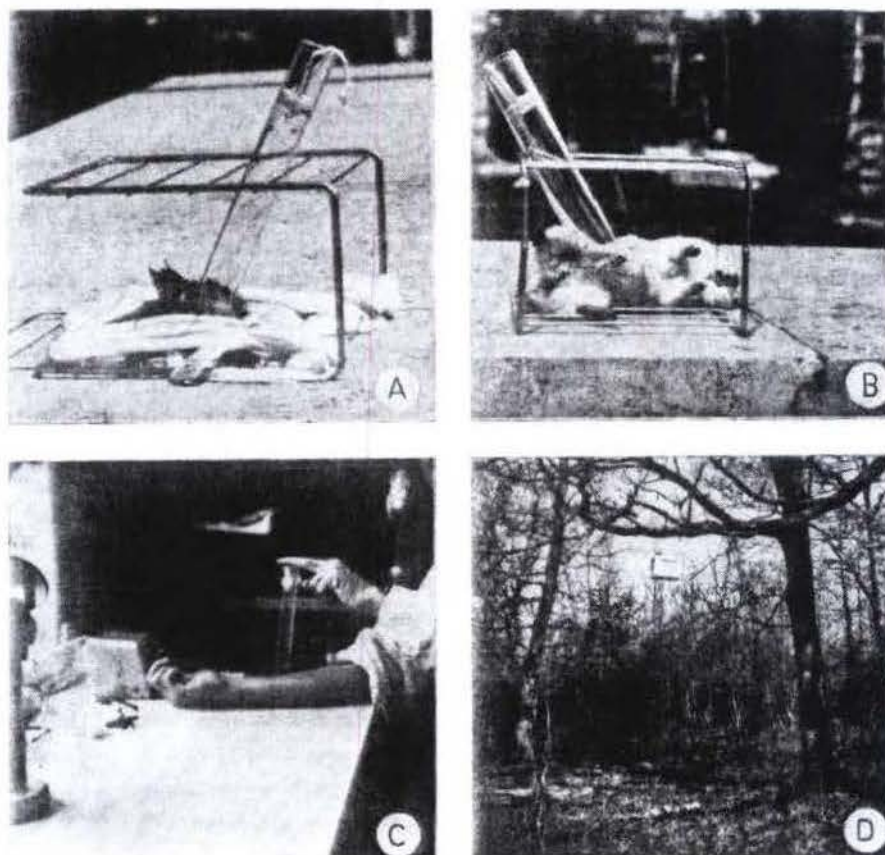


Fig. 1. — Metodi usati per ottenere un pasto di sangue in laboratorio o per catturare in natura *Simuliidae*.

- A) *Turdus merula* immobilizzato con fasce di garza, con un tubo di vetro contenente *Simuliidae* poggiato sul torace depennato.
 B) *Cavia* narcotizzata, con un tubo contenente *Simuliidae* poggiato sul ventre depilato.
 C) puntura su uomo.
 D) Gabbia contenente un'anitra, sospesa (per una notte) ad un albero del bosco del Circeo (Prov. Latina).

Come in A si è ottenuto un pasto di sangue con *E. latigonium* ed *E. latizonum* f. *paludicola*. Come in B si è ottenuto un pasto di sangue con *E. latigonium* ed *O. pontina*. Come in C con *E. latigonium* e *B. erythrocephala*. Come in D è stato catturato *E. latizonum* f. *paludicola*.

Per attrarre i simulidi sono stati utilizzati merli, pulcini e anitre. Le gabbie sono state collocate vicino a focolai larvali di specie presumibilmente ornitofile dei gruppi *latipes*, *aureum* e *angustitarse*, in periodi dell'anno in cui, secondo la nostra esperienza, avviene lo sfarfallamento massivo delle specie di tali gruppi.

c) *Metodo per la classificazione delle femmine dei gruppi aureum e angustitarse.*

In precedenti lavori, utilizzando i caratteri relativi ai terminali maschili e alle larve, era stato possibile distinguere almeno 4 specie nel gruppo *aureum* e 3 nel gruppo *angustitarse* (RIVISECCHI, 1962 : 1963 : 1966).

Il modo di distinguere le femmine delle medesime specie viene illustrato dalla Fig. 2. Si osserva anzitutto in questa figura che le femmine dei due gruppi si possono separare con sicurezza a seconda che nei bracci laterali della furca genitale sia presente o assente un piccolo dentello (d.b.f. nella Fig. 2).

Le due più comuni specie del gruppo *angustitarse* si distinguono in base alla forma della piastra centrale dell'VIII sternite.

Tra le femmine del gruppo *aureum* la distinzione è più difficile; tuttavia, seguendo il criterio usato da KNOZ (1965), è generalmente possibile distinguerle osservando la forma dei cerci e la curvatura del margine posteriore delle gonoapofisi. In *Eusimulium latinum* (= ? *Eusimulium rubzovianum*) questo margine è quasi diritto, mentre in *Eusimulium latizonum* è nettamente più flessuoso. Le due forme di *E. latizonum* (*E. latizonum* f. *petricola* ed *E. latizonum* f. *paludicola*), almeno per ciò che risulta da focolai larvali dei dintorni di Roma, sembrano ben distinguibili nel modo illustrato nella figura. Quanto a *Eusimulium silvaticum* (= *Eusimulium aureum*, sensu Serban), le femmine non sono distinguibili da *E. latinum*, ma trattandosi di una specie con netta localizzazione, sia geografica (Alpi e Appennino settentrionale), sia ecologica (piccole paludi o torbiere in montagna), è da escludere che potessero trovarsi nella zona da me studiata.

d) *Metodo usato per la identificazione delle femmine del genere Prosimulium catturate su bovini e sull'uomo.*

La identificazione delle femmine del genere *Prosimulium* si basa essenzialmente sull'esame di alcuni dettagli dei terminali, nel modo illustrato nella Fig. 3.

Risulta da questa figura che esistono due gruppi nettamente distinti: uno con gonoapofisi molto grandi (gruppo *albense-conistylum*), uno con gonoapofisi nettamente più piccole (gruppo *hirtipes-rufipes*), mentre *Prosimulium arvernense* occupa una posizione intermedia. La distinzione tra

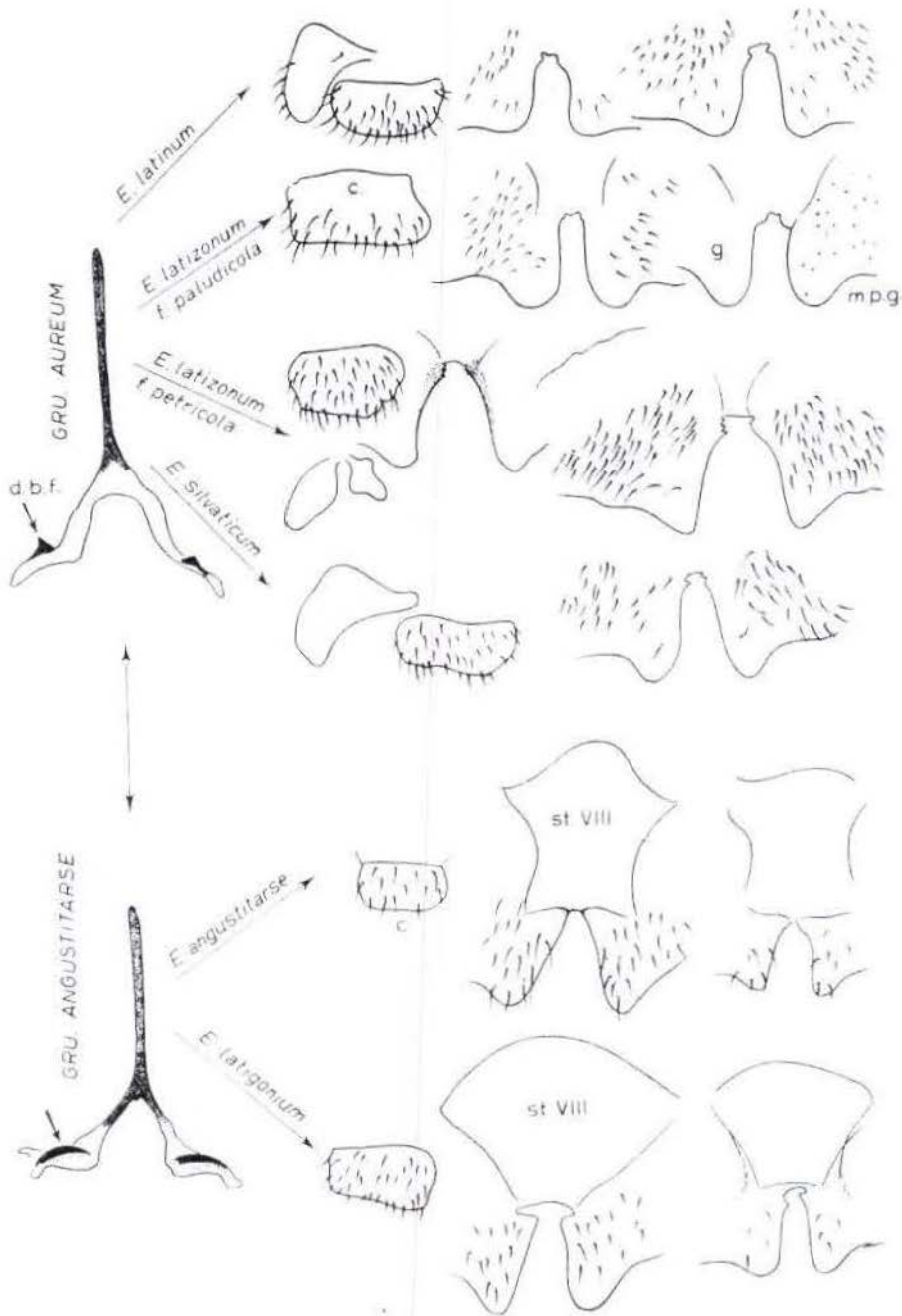


Fig. 2. — Chiave grafica per l'identificazione delle femmine delle specie italiane dei gruppi *aureum* e *angustitarse* (d.b.f. = dente della furca genitale; c. = cerci; st. VIII = ottavo sternite; m.p.g. = margine posteriore delle gonoapofisi).

le specie del II gruppo non è così facile come può sembrare nella figura, ed il gruppo *rufipes* comprende almeno due forme la cui classificazione è indecisa. Non ci possono però essere dubbi tra i due estremi della serie, cioè tra *P. conistylum* e *P. rufipes*.

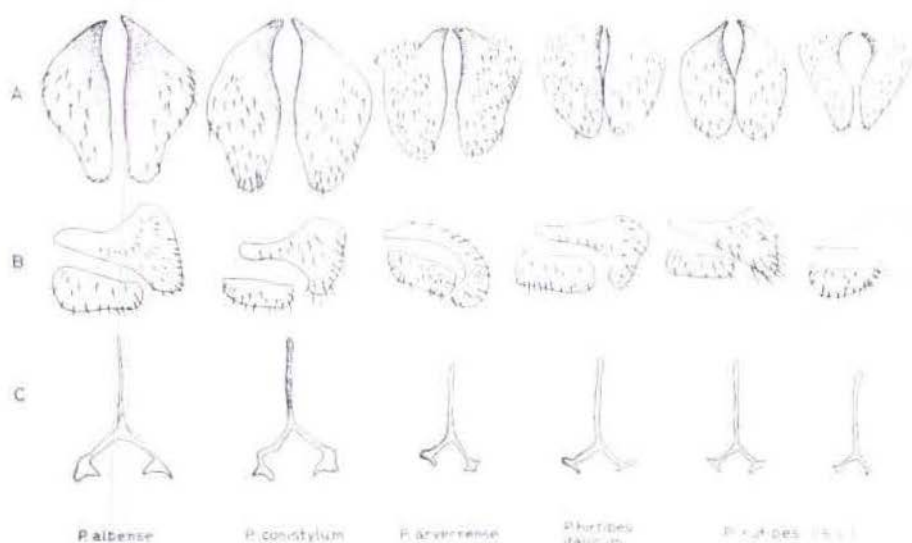


Fig. 3. — Tavola comparativa dei terminali femminili delle specie italiane del genere *Prosimulium*.

A = comparazione delle gonoapofisi: B = comparazione dei cerci: C = comparazione della furca genitale.

Da questa serie è stata esclusa *P. goidanichi*, sia perchè la nostra collezione ne è sprovvista, sia perchè le differenze di questa specie rispetto a *P. albense*, cui è strettamente affine, sono già state illustrate (RIVISECCHI, 1967).

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riassunti nelle Tabelle 1 e 2. Dalla prima delle due tabelle risulta che soltanto con 4 specie sono riuscito ad ottenere un pasto di sangue in laboratorio. Di queste, una (*E. latizonium*) ha succhiato sangue indifferentemente dal ventre di una cavia, dal torace di un merlo e dal braccio dell'uomo. Le altre 3 hanno mostrato 3 differenti comportamenti:

E. latizonum paludicola si è nutrito esclusivamente con sangue di uccello (*Turdus merula*); *B. erythrocephala* esclusivamente con sangue umano e *O. pontina* ha succhiato sangue solo dalle cavie.

TABELLA I.

Tentativi per ottenere in laboratorio un pasto di sangue con femmine di Simulidi sfarfallate in laboratorio da pupe raccolte in natura.

Specie di Simulide	Località e data di raccolta delle pupe	Animali su cui si è tentato di ottenere un pasto di sangue					
		Cavia		Turdus merula		Uomo	
		Sperti- mentate	Risul- tati positivi	Q. sperti- mentate	Risul- tati positivi	Sperti- mentate	Risul- tati positivi
<i>Prosimulium hirtipes italicum</i>	M. della Laga (VI '68)	15	—	10	—	13	—
<i>Gniera fabri</i>	P. N. del Circeo (IV '68)	4	—	5	—	—	—
<i>Eusimulium latipes meridionale</i>	Roma (Doganella) (IV '68)	11	—	12	—	15	—
<i>Eusimulium fucense</i>	Norcia (IV '68)	8	—	7	—	5	—
<i>Eusimulium eryophilum</i>	Roma (Gallicano) (III '68)	6	—	5	—	3	—
<i>Eusimulium angustitarse ibleum</i>	Roma (I-II '68)	10	—	12	—	9	—
<i>Eusimulium latigonium</i>	Latina (I-II-III '68)	14	8	15	10	9	2
<i>Eusimulium latinum</i>	Viterbo (XI '68)	—	—	8	—	—	—
<i>Eusimulium latizonum paladicola</i>	Maccarese (III '68)	7	—	6	5	4	—
<i>Boophthora enythrocephala</i>	Trasimeno (V '68)	12	—	14	—	9	4
<i>Odagnia variegata</i>	M. della Laga (IV '68)	14	—	11	—	10	—
<i>Odagnia opennirica</i>	Ninfa (V '68)	10	—	9	—	7	—
<i>Odagnia pontina</i>	Sermoneta (I '68)	20	15	25	—	22	—
<i>Simulium hispaniola</i>	M. della Laga (IV '68)	6	—	3	—	—	—
<i>Simulium pictum</i>	M. della Tolfa (V '68)	8	—	4	—	9	—

Catture di femmine di Simulidi in natura effettuate direttamente in volo su animali o mediante trappole.

Specie di Simulide	Località e data di raccolta	Nome del raccogliatore	Metodo di raccolta		
			A volo su bovini	Su uomo	Con trappole contenenti nocelli
<i>Prosimulium costylum</i>	Alpi occidentali (IX-X '63)	Osella	40	1	—
<i>Prosimulium rufipes</i>	Massiccio Adamello (VII '65)	Rivosecchi	—	22	—
<i>Eusimulium latigonium</i>	Torre Berretti (VI '61)	Colazzi	—	1	—
<i>Eusimulium latizonum paludicola</i>	P. N. del Circeo (VI '67; III '68)	Rivosecchi	—	—	3
<i>Boophthora erythrocephala</i>	Trasimeno (IV '68)	Giannotti	—	3	—
<i>Odagmia ornata</i> ssp.	Leini (Torino) (IX '63)	Osella	—	1	—
<i>Simulium argenteostriatum</i>	Alpi occidentali (IX-X '63)	Osella	35	1	—

Le specie che non hanno effettuato alcun pasto di sangue non si sono però comportate in modo del tutto identico. Talune (*E. fucense*, *E. latipes meridionale*, *S. pictum*) hanno mostrato un certo interesse per l'animale offerto, assumendo l'atteggiamento dei Ditteri pungenti (capo affondato in basso e addome in alto), ma senza succhiare sangue.

Una specie (*E. fucense*) ha morso ripetutamente e in modo doloroso la pelle del braccio, ma anche questa non ha succhiato sangue. Le rimanenti altre non hanno mostrato alcun interesse per gli animali offerti ed hanno fatto continui, affannosi tentativi di fuga verso la luce.

C'è anche da notare il differente effetto sulla pelle dell'uomo delle punture di *E. latigonium* e di *B. erythrocephala*. Nel primo caso la puntura non è dolorosa e ne scompare ogni traccia dopo 1-2 giorni, nel secondo è molto dolorosa e l'irritazione continua per circa 15 giorni. Ciò in accordo con quanto è noto circa le dermatiti causate da *B. erythrocephala* (cfr. KIRSTICH & ZIVKOVITCH, 1967).

Circa i tentativi fatti per la cattura di specie ornitofile, dopo vari tentativi negativi effettuati nel Parco Nazionale d'Abruzzo presso focolai larvali di specie del gruppo *latipes*, un buon successo è stato conseguito nel Parco Nazionale del Circeo, catturando una specie del gruppo *aureum*. Tale cattura è avvenuta con gabbie « a nasse » lasciate tutta la notte appese ad un albero; con un metodo quindi completamente diverso da quello ordinariamente impiegato dagli specialisti Canadesi e Americani (cfr. ANDERSON & DE FOLIART, 1961).

È stata questa cattura di una specie del gruppo *aureum* su uccelli, che ha posto il problema di una diagnosi dettagliata delle femmine delle specie dei gruppi *aureum* e *angustitarse*, raccolte direttamente in natura. Tanto più che, in un precedente lavoro di RIVOSECCHI & COLUZZI (1962), *Eusimulium aureum* (s.l.) veniva invece segnalato come specie che punge l'uomo. I risultati di tale diagnosi sono esposti nella Fig. 4.

Nella prima colonna a sinistra di questa figura sono disegnati taluni dettagli morfologici, relativi ad un simulide (♀) raccolto nell'atto di succhiare sangue « su uomo » da M. Coluzzi ed a suo tempo citato (RIVOSECCHI & COLUZZI, 1962) sotto il nome di *Eusimulium aureum* (s.l.). Nella seconda colonna sono riportati i medesimi dettagli per uno dei numerosi esemplari di *E. latigonium*, raccolti allo stadio pupale a Borgo Montello (Latina); essi, dopo sfarfallati, hanno mostrato una sorprendente propensione a succhiare sangue da qualsiasi animale messo a disposizione. In base a questa comparazione appare evidente che i due esemplari appartengono alla medesima specie, per cui debbono essere entrambi classificati *E. latigonium* Rubz.

Nella terza colonna della figura sono illustrati dettagli morfologici relativi ad un esemplare (♀) catturato con una gabbia contenente un'anitra, sospesa ad un albero nel bosco del Circeo. Nella quarta colonna è mostrata

una delle femmine di *E. latizonum paludicola* sfarfallate da pupe raccolte in un ruscello di Maccarese, che in laboratorio hanno punto su *T. merula*. Da questa seconda comparazione, ed in base anche a quanto esposto nella Fig. 2, è da ritenersi che entrambi gli esemplari appartengano senza dubbio al gruppo *aureum*, e si possano classificare *E. latizonum paludicola*.

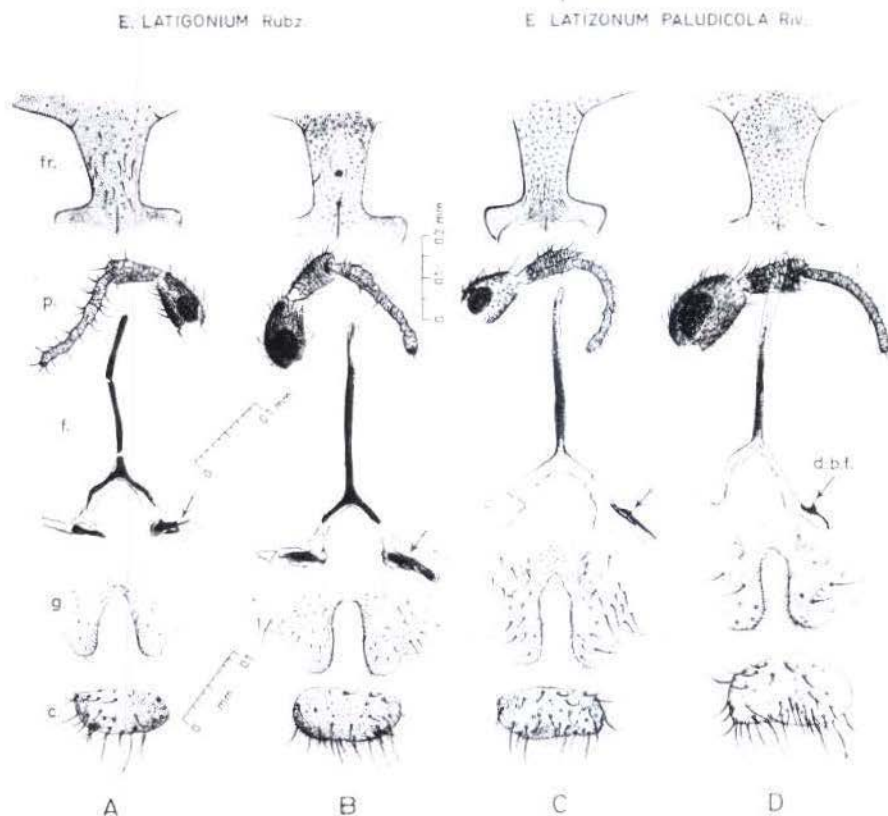


Fig. 4. — Dettagli morfologici di 4 esemplari (♀♀) appartenenti a due specie (*E. latigonium* ed *E. latizonum*) che hanno succhiato sangue in laboratorio o in natura.

- A) Esemplare raccolto nell'atto di pungere l'uomo in natura (Coluzzi *leg.*).
 B) Esemplare che in laboratorio ha punto su uomo (come in Fig. 1-C).
 C) Esemplare raccolto in natura con una gabbia sospesa ad un albero (come in Fig. 1-D).
 D) Esemplare che in laboratorio ha punto su *T. merula* (come in Fig. 1-A) (fr. = fronte; p. = palpo; f. = furca genitale; c. = cerci; g. = gonoapofisi; d.b.f. = dente del braccio laterale della furca genitale).

Per ciò che si riferisce al materiale raccolto nelle Alpi su bovini e uomo risulta, in base all'esame dei numerosi esemplari ivi collezionati, che nel periodo compreso tra settembre e novembre, a quote varianti tra i 600-2000 m.,

grandi sciami di simulidi attaccano i bovini al pascolo. Questi sciami sono composti (in differente percentuale, secondo le località, di due specie: *S. argenteostriatum* e *P. consistylum*. Occasionalmente queste specie possono anche succhiare sangue dall'uomo; tuttavia l'attacco sull'uomo è principalmente opera di *Prosimulium rufipes* (Mg.). Non è chiaro però se la specie così sorprendentemente antropofila, osservata sull'Adamello, sia il tipico *P. rufipes* (= ? *P. fuscipes sensu* Knoz) o *Prosimulium galli* Edw. (cfr. RUNZOV, 1967, p. 135). In base ai dettagli morfologici riportati nella Fig. 5,

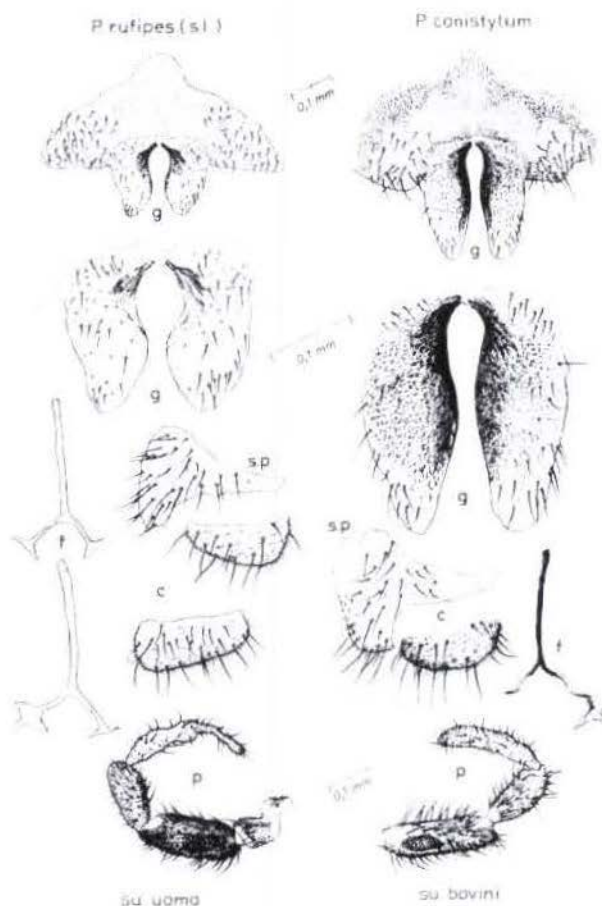


Fig. 5. — Dettagli morfologici di 2 esemplari del genere *Prosimulium* catturati nelle Alpi su bovini e uomo (g = gottaapofisi; c = cerci; f = furca genitale; p = palpo; sp. = sclerite proctodeale).

entrambe le specie sembrerebbero presenti nel materiale raccolto su uomo nell'Adamello. In ogni caso, la distinzione rispetto alla specie dello stesso genere (*P. consistylum*) che attacca i bovini, non può dare luogo a dubbi

(Fig. 5). L'uomo può anche essere occasionalmente attaccato da femmine del gruppo *ornata*, ma non è assolutamente possibile stabilire quale delle numerose sottospecie, recentemente distinte da RUBZOV (1967), abbia un simile comportamento.

CONCLUSIONE E DISCUSSIONE

Se i dati oggetto del presente lavoro si aggiungono a quelli già noti per la fauna italiana, si arriva a circa 20 specie di *Simuliidae* ad abitudini trofiche più o meno conosciute. Anche se questo numero è ancora esiguo rispetto a quello delle specie segnalate per la fauna italiana, c'è da notare che i dati sono distribuiti in modo tale che, in ogni genere o gruppi di specie (escluso il genere *Obuchovia* e il gruppo *latipes*), esiste almeno una specie sulle cui preferenze alimentari si abbiano notizie. È opportuno perciò nella discussione tenere un certo ordine tassonomico.

Nel corso della discussione si è tenuto solo limitatamente conto anche dei dati negativi, essi sono stati riportati soltanto nella Tab. 1 (tentativi in laboratorio) e non nella tabella 2 (catture in natura) dato che le catture in natura hanno avuto carattere occasionale.

1) genere *Prosimulium*.

Su 5-6 specie segnalate in Italia, almeno 3 sono sicuramente ematofaghe: *P. goidanichi* (su bovini cfr. RUBZOV, 1964); *P. conistylum* (su bovini e occasionalmente su uomo); *P. rufipes* (su uomo).

Il tentativo non riuscito di nutrire in laboratorio *P. hirtipes italicum*, non è sufficiente per concludere che questa specie non è ematofaga. Tuttavia sinora nessun esemplare del genere *Prosimulium*, nell'area appenninica, è stato raccolto nell'atto di nutrirsi di sangue. Numerosi sono invece gli esemplari (♀♀) raccolti in queste condizioni nell'area alpina, su bovini e uomo. Nelle Alpi, l'attacco all'uomo può assumere proporzioni massive e se ciò avviene in zone di interesse turistico, la molestia alle persone è tale che i *Prosimulium* possono, sia pure localmente, rivestire un notevole interesse pratico (*P. rufipes* nella zona di Madonna di Campiglio, sull'Adamello).

2) generi *Cnephia* e *Greniera* e gruppo *latipes*.

Sono circa 12-13 specie, sulle quali si ha un solo reperto relativo a 1 ♀ di *Cnephia blanci*, occasionalmente raccolta sull'uomo in Sicilia (RIVOSECCHI, 1967). Tutti i tentativi di cattura in natura o di nutrizione in laboratorio con altre specie di questi gruppi (Tab. 1) hanno avuto esito negativo. È da ritenersi che l'insuccesso con queste specie, probabilmente ornitofile, sia dovuto alla estrema peculiarità delle loro abitudini trofiche, per cui sarà necessario ripetere i tentativi con tecniche più perfezionate.

3) gruppo *angustitarse*.

Una specie, *Eusimulium latigonium*, ha mostrato una straordinaria propensione a nutrirsi in laboratorio con il sangue di qualsiasi animale gli venisse offerto.

Un esemplare (♀), raccolto in natura nell'atto di succhiare sangue su uomo e a suo tempo (RIVOSECCHI & COLUZZI, 1962) citato sotto il nome di *Eusimulium aureum* (s.l.), viene ora invece classificato *E. latigonium*.

C'è motivo quindi di ritenere che questa specie in natura si comporti in modo analogo a quanto osservato in laboratorio, non abbia cioè nessuna preferenza alimentare, nutrendosi indifferentemente con sangue di mammiferi e uccelli, e occasionalmente anche di uomo.

È importante anche notare quanto sia diverso in laboratorio il comportamento di *Eusimulium angustitarse ibleum*, specie dello stesso gruppo per lungo tempo confusa con *Eusimulium latigonium*. Numerosi esemplari di *E. angustitarse ibleum*, in ripetuti tentativi e nelle stesse condizioni di *E. latigonium*, non hanno mai effettuato un pasto di sangue. Ciò dimostra che l'attitudine dei Simulidi a nutrirsi in laboratorio, non dipende solo dai metodi impiegati, ma dall'esistenza di specie criptiche con differenti abitudini trofiche.

4) gruppo *aureum*.

Una specie, *Eusimulium latizonum* f. *paludicola*, mostra sia in natura sia in laboratorio un comportamento nettamente ornitofilo. Gli uccelli su cui questa specie è stata nutrita in laboratorio (merli e civette) non sono però gli stessi (pulcini e anitre) che ne hanno determinata la cattura in natura. Sicchè è probabile che non abbia preferenze alimentari verso un determinato uccello. Ciò in accordo con quanto è noto per altre specie ornitofile della famiglia *Simuliidae* (cfr. BENNET, 1960; ANDERSON & DE FOLIART, 1961). È importante anche notare che una specie ad essa strettamente affine, *Eusimulium latinum*, non ha assunto alcun pasto di sangue su uccelli. I dati sono ancora troppo scarsi per poter concludere che, oltre alle differenze morfologiche a suo tempo messe in evidenza, ci siano tra le due specie anche differenti abitudini trofiche (RIVOSECCHI, 1962; 1963).

5) genere *Boophthora*.

Una specie, *B. erythrocephala*, mostra sia in natura sia in laboratorio una netta preferenza alimentare per l'uomo. L'attacco sull'uomo fu segnalato per tale specie da CORTI (1916) (sub nomine *S. reptans* var. *glabra*) e da RIVOSECCHI & COLUZZI (1962) in varie località della pianura padana, cui ora si aggiunge la Val di Chiana e il lago Trasimeno. Ancora però non ci sono se-

gnalazioni in Italia di attacchi massivi, tali da causare gravi dermatiti (cfr. SZABO, 1964).

Gli esemplari del Trasimeno che mi hanno punto in laboratorio, hanno prodotto reazioni allergiche dolorose e prolungate, per cui è facile prevedere che anche in Italia si avrebbero effetti consimili se un gran numero di esemplari di questa specie pungesse una persona. Dal punto di vista pratico è questa certamente la specie più importante, perchè non è semplicemente molesta come i *Prosimulium*, ma capace di produrre malattie all'uomo (cfr. KIRSTICH & ZIVKOVITCH, 1967).

6) generi *Obuchovia*, *Wilhelmia* e *Titanopteryx*.

Sul genere *Obuchovia* manca qualsiasi dato. Specie degli altri due generi si raccolgono facilmente nelle orecchie degli equini. Purtroppo però, eccettuata *T. maculata*, che si distingue molto facilmente, la diagnosi diretta delle femmine del genere *Wilhelmia* costituisce una difficoltà tassonomica da me non ancora superata. In base all'areale geografico si può però, con buona probabilità, ritenere che le catture di Corti nella pianura padana fossero costituite in prevalenza da *W. lineata* e *W. equina* e quelle fatte da me nel Sud Italia da *W. mediterranea*.

7) genere *Odagmia*.

Due specie, *O. variegata* e *O. apenninica*, a suo tempo (RIVOSECCHI, 1967) collezionate in natura su equini e bovini, non hanno assunto un pasto di sangue in laboratorio; è evidente quindi che il metodo usato va modificato ed il tentativo ripetuto con sangue di bue eparinizzato, fornito attraverso membrane (metodo Mc Mahon).

Per un'altra specie, *O. pontina*, la situazione è esattamente inversa: si nutre facilmente in laboratorio su cavia, mentre in natura non si è mai riuscito di catturarla nell'atto di succhiare sangue.

RIVOSECCHI & LIPPARONI (1964), trovando del tutto privi di simuliidi, numerosi bovini al pascolo in prossimità dei focolai larvali di questa specie, erano giunti all'erronea conclusione che *O. pontina* non fosse ematofaga.

Dopo la scoperta che in laboratorio era facile nutrire delle femmine su cavia, ho fatto nuovi tentativi di cattura collocando, in vicinanza dei focolai, gabbiette « a nassa » contenenti roditori selvatici (*Apodemus*), ma senza registrare alcun successo.

È noto dalla letteratura (MC MAHON & NELSON, 1967) che *Odgamia ornata* s.l., ordinariamente ematofaga su bovini in natura, si può anche nutrire in laboratorio su ratti neonati, mentre altri AA. hanno occasionalmente catturato in natura specie del gruppo *ornata* su roditori. Sarebbe molto importante dal punto di vista epidemiologico stabilire se una stessa specie punge contemporaneamente roditori e altri mammiferi, oppure se si ha a

che fare con diverse specie, con preferenze alimentari diverse. Potrebbe darsi che *O. apenninica* si nutrisse solo su bovini e *O. pontina* solo su roditori. Purtroppo la diagnosi diretta delle femmine del gruppo *ornata* costituisce un ostacolo insormontabile. Il reperto relativo a *O. apenninica* su bovini è stato dato solo in base al fatto che nei dintorni del luogo di cattura i focolai larvali di questa specie erano prevalenti; si tratta quindi di un reperto su cui c'è da fare qualche riserva. Anche l'interessante reparto relativo ad una femmina del gruppo *ornata*, che ha succhiato sangue dall'uomo (Tab. 1), non permette una diagnosi più precisa di *Odagmia ornata* ssp. Nessuno può infatti stabilire a quale delle varie sottospecie distinte recentemente da RUBZOV (1967) appartenga l'esemplare in questione.

8) genere *Tetisimulium* e *Simulium s. stricta*.

Grazie ad una cattura occasionale di *T. bezzi* su equini (RIVOSECCHI, 1967) sappiamo che questa specie è ematofaga. Sono anche probabilmente ematofaghe quasi tutte le specie italiane del genere *Simulium*, ma i dati sono molto scarsi e riguardano soltanto i gruppi *argenteostriatum* e *reptans*. Sul gruppo *reptans* non ci sono nuovi dati, all'infuori di un'unica località italiana (Alta Val Tiberina) dove una prima volta fu catturato un esemplare su uomo e classificato *S. reptans* s.l. e una seconda volta un secondo, sempre su uomo, e classificato *S. (?) voilense*. Naturalmente si tratta di una diagnosi indiretta in quanto in quella località e in quel periodo dell'anno la specie prevalente è *S. voilense* Serban. I tentativi di far pungere *S. pictum* in laboratorio non hanno avuto successo, ma ciò non permette di trarre alcuna conclusione sulle abitudini trofiche di tali specie.

Quanto a *S. argenteostriatum* risulta che è ematofago e che attacca in gran numero i bovini nelle Alpi, mentre la specie appenninica ad essa affine (*Simulium hispaniola*) non si è nutrita di sangue in laboratorio e non è stata catturata su animali in natura.

Occorrono naturalmente dati più numerosi per concludere che ci si trova di fronte a due diversi comportamenti; è importante tuttavia osservare che, ancora una volta, due specie strettamente affini, sembrano avere diverse abitudini trofiche e, come di regola, quella ematofaga ha una distribuzione più settentrionale.

3 aprile 1969.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, J. R. & C. R. DE FOLIART, 1961. Feeding behaviour and host preference of some black-flies (Diptera, Simuliidae) in Wisconsin. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **54**, 716-729.
BENNET, G., 1960. On some ornithophilic blood-sucking Diptera in Algonquin Park, Ontario, Canada. *Can. J. Zool.*, **38**, 377-389.

- CONTINI, C., 1966. *Urosimulium juccii* n. sp. (Diptera, Simuliidae), nuova specie di Simulidi della Sardegna. *Riv. Parassitol.*, **27**, 263-291.
- CORTI, E., 1916. Le simulie italiane II. *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Milano*, **54**, 223-236.
- DAVIES, D., 1936. Longevity of black-flies in captivity. *Can. J. Zool.*, **31**, 304-312.
- KIRSTICH, A. & V. ZIVKOVITCH, 1967. Dermatitis, Verursacht durch das Insekt *Simulium erythrocephalum*. XIII Congr. Intern. Dermatol., Munchen 1967.
- KNOZ, Y., 1965. To identification of Czechoslovakian black-flies (Diptera, Simuliidae). *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Purck Br.*, **6**, 1-31.
- MC MAHON, J. P., 1968. Artificial feeding of *Simulium* vectors of human and bovine onchocerciasis. *Bull. Org. Mond. Santè*, **38**, 957-966.
- MC MAHON, J. P. & G. S. NELSON, 1967. Feeding adult *Simulium ornatum* in laboratory. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **61**, 21-22.
- RIVOSECCHI, L., 1962. Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani. III. Su qualche specie dei gruppi *E. latipes* ed *E. aureum*. *Riv. Parassitol.*, **23**, 135-190.
- RIVOSECCHI, L., 1963. Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani-VII. Su due forme del gruppo *latizonum*. *Riv. Parassitol.*, **24**, 19-30.
- RIVOSECCHI, L., 1966. Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani-XIV. Sul gruppo *angustitarse*. *Riv. Parassitol.*, **27**, 187-202.
- RIVOSECCHI, L., 1967. I Simulidi degli Appennini. *Parassitologia*, **9**, 129-304.
- RIVOSECCHI, L. & M. COLUZZI, 1962. Tre simulidi (*S. aureum*, *S. erythrocephalum*, *S. reptans*) che in Italia pungono l'uomo. *Parassitologia*, **4**, 181-190.
- RIVOSECCHI, L. & L. LIPPARONI, 1964. Contributo alla conoscenza dei Simulidi italiani. X. Comparazione tra *O. pontina*, *O. ornata* e *O. ornata nitidifrons*. *Riv. Parassitol.*, **25**, 249-268.
- RUBZOV, J. A., 1964. Simuliidae d'Italia. Memoria I. *Mem. Soc. Entomol. Ital.*, **43**, 1-123.
- RUBZOV, J. A., 1967. Simuliidae d'Italia. Memoria II. *Mem. Soc. Entomol. Ital.*, **46**, 127-180.
- SZABO, J. B., 1964. Mass impairment of health caused by an invasion of black-flies (Diptera-Simuliidae) in Tatra, Hungary. *Opuscula Zool., Budapest*, **1**, 113-117.

Destino della radioiodioinsulina nella incubazione di alcuni tessuti

ONOFRIO LOSTIA, CESARE ROSSI e RAFFAELLA CATANZARO
Laboratori di Chimica e Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Vengono misurate, impiegando radioiodioinsulina, la parte di insulina che si trova fissata sulle frazioni mitocondriale e nucleare di fettine di tessuto adiposo bruno di ratto incubate, e quella fissata sulle corrispondenti frazioni incubate direttamente.

Confrontando tali risultati si discute la loro interpretazione in relazione al problema della localizzazione dell'insulina nei tessuti *in vitro*.

Si studia anche la parziale degradazione dell'insulina che avviene durante l'incubazione di alcuni tessuti, misurandone l'entità e determinandone le caratteristiche.

Summary (*Fate of I^{131} -iodinated insulin in incubated tissues*). — The binding of I^{131} -iodinated insulin to mitochondrial and nuclear fractions obtained from incubated slices of rat brown adipose tissue is compared to the binding to the same fractions incubated directly.

By comparing these results it can be seen that the amount of I^{131} -iodinated insulin found in the mitochondrial fraction is approximately the same as that which can be bound by this fraction during the homogenization of incubated slices.

From these and other data it can be concluded that the amount of insulin entering the cells, if any, is much smaller than that bound to the tissue.

The partial breakdown of insulin in incubated rat brown adipose tissue and liver slices was also investigated. This breakdown was confirmed to be due to the action of highly active enzymes.

È noto che incubando vari tessuti con radioiodioinsulina, una parte della radioattività si ritrova fissata sui tessuti e sulle varie frazioni cellulari di questi, ed una parte viene ritrovata come prodotto di degradazione dell'insulina nel mezzo di incubazione.

La fissazione dell'insulina sui tessuti durante l'incubazione è stata dimostrata per la prima volta da STADIE, HAUGAARD & VAUGHAN (1952) che l'hanno considerata, come poi anche GARRAT, CAMERON & MENZINGER (1966), dovuta ad un vero legame chimico. Altri invece (NEWERLY & BERSON, 1967; KONO & COLOWICH, 1961; MALAISSE & FRANCKSON, 1965) in base ad esperienze di cinetica chimica e misurando l'attività fissata sull'intero tessuto hanno ritenuto trattarsi di un fenomeno di adsorbimento non specifico. LEE & WILLIAMS (1954), invece, dal confronto delle radioattività che si ritrovano fissate, con esperienze *in vivo* e *in vitro* (incubazione di omogenati), sulle frazioni nucleare, mitocondriale e microsomica del fegato, hanno dedotto che la penetrazione dell'insulina nei tessuti e la sua fissazione sulle frazioni cellulari è un fenomeno biochimico.

Per quanto riguarda il destino di quella insulina che viene degradata durante l'incubazione, MIRSKY, PERISSUTI & DIXON (1955), e successivamente PIAZZA *et al.* (1959) hanno trovato che si trattava di degradazione proteolitica e che questa dipendeva dal rapporto tra le quantità di tessuto e di insulina.

Nel presente lavoro gli AA. hanno studiato quantitativamente la fissazione della radioiodioinsulina nelle frazioni nucleari e mitocondriali sia incubate direttamente, sia ottenute da fettine incubate di tessuto adiposo bruno di ratto.

Gli AA. hanno anche valutato quantitativamente la radioattività delle macchie che compaiono nella cromatografia del mezzo di incubazione dopo la degradazione della radioiodioinsulina operata da fettine di tessuto adiposo bruno e di fegato di ratto.

PARTE SPERIMENTALE

Caratteristiche della radioiodioinsulina.

La radioiodioinsulina usata è stata fornita sia dalla Abbot Laboratories che dalla Philips.

Le caratteristiche erano le seguenti:

Attività biologica: Il controllo effettuato mediante misura del tempo di convulsione a morte su topini, ha dato per entrambi valori vicini a quelli degli standards.

Purezza radiochimica: Il controllo effettuato mediante cromatografia discendente con i solventi A e B appresso descritti ha dato un valore di purezza di oltre il 99%.

Attività specifica: La radioiodioinsulina Abbot aveva un'attività specifica di 4,6-6,6 mc/mg e quella Philips di 0,6-0,9 mc/mg.

Modalità sperimentali nelle esperienze di fissazione dell'insulina nei tessuti.

a) *Incubazione del tessuto*: Due fettine di tessuto adiposo bruno di ratto Wistar Glaxo, del peso complessivo di mg 200, sono incubate in una vaschetta di Warburg per 30 min a 37°C, dopo che questa è stata gassata con ossigeno per 5 minuti. Il mezzo di incubazione contiene: 0,8 ml di Krebs Ringer Fosfato (KRP) più glucosio (31 mg/25 ml di tampone), 0,1 ml di acqua, 0,1 ml di radioiodioinsulina di concentrazione 1 unità/ml.

Finita l'incubazione il tessuto viene asciugato con carta da filtro, lavato 6 volte e trasferito in una vaschetta di Warburg contenente 25 ml di KRP più glucosio (0,1 %); si gassa con ossigeno per 5 minuti e si pone in incubazione per 20 min. Rimosso poi il tessuto, lo si asciuga e si reincuba per altre due volte. Finite le incubazioni, le fettine, asciugate su carta, sono omogeneizzate in 1,5 ml di saccarosio 0,25 molare con omogeneizzatore di Potter; si porta poi il volume a 2 ml e si preleva un campione di 0,2 ml di sospensione che viene posto su scodellino e misurato per la radioattività con un contatore Geiger. L'omogenato viene centrifugato in centrifuga refrigerata (a 450 G) per 10 minuti. Si decanta il sopranatante, si sospende il precipitato (contenente i nuclei e le pareti cellulari) in 1 ml di saccarosio, si ricentrifuga ed il secondo sopranatante (dopo aver raccolto una frazione che posta su scodellino viene misurata per la radioattività) si riunisce al primo. Si lava per altre quattro volte il precipitato, sospendendolo in 1 ml di saccarosio 0,25 M, ed una frazione dei successivi liquidi di lavaggio viene posta su scodellino e misurata per la radioattività. Il sopranatante, contenente la frazione mitocondriale, ha in superficie una pellicola di sostanza grassa che viene separata meccanicamente, posta in uno scodellino e misurata. Il sopranatante con i mitocondri viene centrifugato a 4.500 G per 10 minuti. Il precipitato viene lavato sospendendolo in 1 ml di saccarosio 0,25 M e ricentrifugato, per 5 volte. Una frazione di ciascun liquido di lavaggio viene posta su scodellino e misurata per la radioattività.

b) *Incubazione della frazione nucleare e della frazione mitocondriale*: Circa 200 mg di tessuto adiposo bruno di ratto sono omogeneizzati con 1,5 ml di saccarosio 0,25 M e da questo si separano poi le frazioni nucleare e mitocondriale come sopra descritto. Le suddette frazioni sono sospese in 1 ml di KRP più glucosio e insulina I¹³¹ come già descritto. Si gassano con ossigeno per 5 min e si incubano poi per 20 min. Subito dopo l'incubazione le frazioni si centrifugano (alle condizioni precedentemente indicate) per 10 min in modo che il tempo totale di contatto (incubazione e centrifugazione) con l'insulina marcata sia di 30 min; i precipitati sono lavati sospendendoli in 1 ml di saccarosio 0,25 M e centrifugandoli, per 8 volte. Frazioni dei liquidi di lavaggio sono poste su scodellini e misurate.

Modalità sperimentali nelle esperienze di degradazione dell'insulina.

L'incubazione è stata effettuata ponendo circa 200 mg di fettine di tessuto adiposo bruno o di fegato di ratto Wistar Glaxo in una vaschetta di Warburg per 30 min a 37° C, dopo che questa era stata gassata con ossigeno per 5 minuti. Si sono anche incubate le frazioni nucleare e mitocondriale.

Il mezzo di incubazione conteneva: 0,8 ml di KRP più glucosio (31 mg/25 ml tampone), 0,1 ml di acqua, 0,1 ml di soluzione di radioiodioinsulina a concentrazione di 1 unità/ml. I mezzi di incubazione, dopo centrifugazione, sono stati cromatografati su carta Whatman n. 1 con:

Solvente A: Butanolo secondario - alcool etilico a 95° - ammoniacca 5 % 100 : 25 : 35 (con il quale l'insulina ha $R_f = 0$) (MIRKYS *et al.*, 1955).

Solvente B: Butanolo secondario-acido acetico-acqua, 4 : 1 : 5 (con il quale l'insulina in queste esperienze ha $R_f = 0,87$) (LIGHT & SIMPSON, 1956).

Come reattivo dell'insulina non marcata è stata usata una soluzione contenente 0,05 % di bleu di bromofenolo, 1 % di cloruro mercurico e 2 % di acido acetico (GRODSTRY & TARVER, 1956). La radioattività dei cromatogrammi è stata misurata con un chromatoscanner (POCCHIARI & ROSSI, 1961).

Per controllare se l'insulina non marcata a contatto del tessuto durante l'incubazione, desse luogo a prodotti di demolizione, fettine di tessuto adiposo bruno sono state incubate in mezzi contenenti 5 mg/ml di insulina. Tale elevata quantità è stata usata per poter rivelare chimicamente eventuali frammenti della molecola dell'insulina. Il mezzo dopo incubazione è stato perciò centrifugato, poi messo a banda su carta e sviluppato nel solvente A. Si sono ritagliate delle strisce nella direzione dello sviluppo che sono state poi rivelate con bleu di bromofenolo, con ninidrina e per fluorescenza all'ultravioletto. Sulla base di tali rivelazioni si è ritagliato il cromatogramma in zone parallele alla banda, che sono state eluite con circa 8 ml di acqua ciascuna e gli eluati sono stati per 1/4 cromatografati direttamente e per il resto concentrati in essiccatore, idrolizzati in tubo chiuso con HCl 6 N (finale), tre volte portati a secco in essiccatore su potassa, ripresi con acqua e infine cromatografati bidimensionalmente in butanolo secondario — acido formico — acqua 75 : 15,5 : 14,5 ed in fenolo — acqua — ammoniacca 80 : 20 : 1. I cromatogrammi sono stati rivelati con ninidrina.

Per confermare l'origine enzimatica della degradazione dell'insulina sono state effettuate incubazione di tessuto adiposo bruno e di fegato sia con 5 μ g di radioiodioinsulina per 100 mg di tessuto, sia con aggiunta di 2 mg di insulina non marcata ai 5 μ g di radioiodioinsulina. I mezzi di incubazione sono stati cromatografati bidimensionalmente e dei cromatogrammi è stata eseguita sia l'autoradiografia sia la misura con un radiochromatoscanner.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Fissazione della radioiodioinsulina.

Nelle Tab. 1 e 2 è riportato un esempio delle serie di misure di radioattività relative ad una esperienza nella quale l'incubazione viene effettuata nelle stesse condizioni, sia su fettine di tessuto adiposo bruno di ratto che direttamente sulle frazioni nucleari e mitocondriale.

TABELLA 1.

Distribuzione della radioattività dopo incubazione di fettine di tessuto adiposo bruno di ratto in mezzo contenente radioiodioinsulina

	% rispetto alla attività totale ritrovata	% rispetto alla attività dell'omogenato
Mezzo dopo incubazione	90,41	
Liquido dei 6 lavaggi	6,11	
Mezzi delle 3 incubazioni di lavaggio	2,87	
TOTALE PARZIALE . . .	99,30	
1/10 omogenato totale	0,125	Tot. om. 100
Liquidi dei 5 lavaggi della frazione nucleare . .	0,105	9,32
Frazione nucleare	0,281	25,00
Liquidi dei 5 lavaggi della frazione mitocondriale	0,004	0,34
Frazione mitocondriale	0,029	2,56
Grasso e sopranatante della frazione mitocondriale	0,069	6,11
TOTALE PARZIALE . . .	0,613	
TOTALE DELLE ATTIVITÀ RITROVATE . . .	100 %	43,33 %

Si osserva che la somma delle radioattività delle frazioni cellulari ottenute da fettine incubate e dei loro liquidi di lavaggio è solo il 50 % circa della radioattività dell'omogenato. Poichè dalla letteratura (WISEMAN & BALTZ, 1961) risulta che la radioiodioinsulina in soluzione viene adsorbita per il 20 % sulle pareti di vetro dei contenitori, e che tale perdita può essere

molto ridotta aggiungendo alla soluzione siero-albumina umana nella concentrazione di 0,5 mg/ml, in alcune esperienze si è effettuata tale aggiunta ai mezzi di incubazione. In tali casi si è però notata una variazione nei valori

TABELLA 2.

Distribuzione della radioattività dopo incubazione delle frazioni nucleari e mitocondriale di tessuto adiposo bruno di ratto in mezzo contenente radioiodioinsulina.

(I dati sono espressi in percentuali delle radioattività totali ritrovate)

Frazione nucleare	1,44
Liquido di lavaggio	3,16
Mezzo dopo incubazione	95,40
	100,00
<hr/>	
Frazione mitocondriale	4,22
Liquido di lavaggio	3,25
Mezzo di incubazione	92,53
	100,00

percentuali delle radioattività nelle singole frazioni, sia ottenute da fettine incubate che incubate direttamente, rispetto a quelli ottenuti senza l'aggiunta di sieroalbumina (vedi Tab. 3).

L'aver ritrovato fissata stabilmente sulle frazioni cellulari dei tessuti incubati con radioiodioinsulina una parte di questa (vedi anche LOSTIA & ROSSI, 1968), pone la questione se ciò può essere interpretato come una prova che l'insulina entra all'interno delle cellule durante l'incubazione del tessuto.

Tale prova sarebbe importante perchè un gran numero di ricerche sull'effetto dell'insulina sono state effettuate *in vitro*, mentre i lavori più noti sulla localizzazione dell'insulina basati sulla rivelazione della radioiodioinsulina fissatasi a frazioni cellulari (LEE & WILLIAMS, 1954; LEE & WISEMAN 1959; GRIMMINGER, SASIVIMOLKUL & KELLE, 1964) sono stati compiuti solo *in vivo*.

Va tenuto presente che per ridurre il pericolo di artefatti durante l'omogeneizzazione del tessuto, nel presente lavoro si sono appunto effettuate incubazioni di lavaggio in un mezzo non contenente radioiodioinsulina, in modo da allontanare il più possibile la parte di questa contenuta negli spazi intercellulari.

TABELLA 3.

Influenza delle condizioni di incubazione sulla distribuzione della radioattività tra la frazione nucleare e la frazione mitocondriale

(I dati sono espressi in percentuali delle radioattività totali ritrovate)

Numero della esperienza (senza sieralbumina)	A Incubazione del tessuto e successivo frazionamento				B Incubazione diretta delle singole frazioni					
		I	II	III	IV		I	II	III	IV
Frazione nucleare . . .	N _F	0,268	0,183	0,077	0,480	N _S	2,55	2,66	0,386	1,44
Frazione mitocondriale .	M _F	0,204	0,036	0,036	0,203	M _S	6,94	7,10	0,622	4,22
Rapporto	$\frac{N_F}{M_F}$	1,31	5,08	2,14	2,36	$\frac{N_S}{M_S}$	0,367	0,375	0,620	0,343
Numero della esperienza (con sieralbumina)		I	II	III		I	II			
Frazione nucleare . . .	N _{Fa}	0,085	0,301	0,281		N _{sa}	4,24		6,55	
Frazione mitocondriale .	M _{Fa}	0,011	0,030	0,029		M _{sa}	3,53		7,56	
Rapporto	$\frac{N_{Fa}}{M_{Fa}}$	7,37	10,0	9,69		$\frac{N_{sa}}{M_{sa}}$	1,20		0,866	

Media dei valori delle varie esperienze e loro rapporti

Esperienze senza sieralbumina	N _F = 0,252	N _S = 1,76	$\frac{N_S}{N_F} = 7,00$
	M _F = 0,120	M _S = 4,72	$\frac{M_S}{M_F} = 39,3$
	$\frac{N_F}{M_F} = 2,10$	$\frac{N_S}{M_S} = 0,374$	
Esperienze con sieralbumina	N _{Fa} = 0,222	N _{sa} = 5,40	$\frac{N_{sa}}{N_{Fa}} = 24,3$
	M _{Fa} = 0,023	M _{sa} = 5,55	$\frac{M_{sa}}{M_{Fa}} = 24,0$
	$\frac{N_{Fa}}{M_{Fa}} = 9,65$	$\frac{N_{sa}}{M_{sa}} = 0,973$	

Gli indici F o S indicano che sono state incubate rispettivamente le fettine di tessuto o le singole frazioni cellulari.

Dai dati ottenuti incubando direttamente le frazioni (vedi Tab. 3, valori medi) si calcola che la percentuale di radioattività fissata dalla frazione mitocondriale è maggiore rispetto al caso della incubazione delle fettine, di circa 39 volte, mentre quella della frazione nucleare è maggiore di circa 7 volte; quando invece si usa sieroalbumina umana, gli aumenti sono, rispettivamente di 240 e 24 volte. Se però si considerano le radioattività fissate dalla frazione mitocondriale ottenuta da fettine incubate (esprese in per cento della radioattività disponibile in soluzione durante la omogeneizzazione, cioè la radioattività totale dell'omogenato diminuita di quella fissata sulla frazione nucleare) e le si confrontano con le radioattività fissate durante l'incubazione diretta (esprese in per cento rispetto al totale ritrovato, compresa la radioattività dei mezzi di incubazione), si ottengono i valori riportati in Tab. 4. Da questa risulta che per esperienze effettuate, nelle due condizioni, nello stesso giorno e con la stessa partita di radioiodioinsulina, si ottengono coppie di valori ragionevolmente vicini, se si tien conto dei diversi fattori di variabilità che possono entrare in gioco in queste esperienze. Ciò quindi conferma la fondatezza del sospetto che la fissazione della radioattività sulla frazione mitocondriale avvenga durante l'omogeneizzazione. Pertanto l'aver ritrovato fissata sulla frazione mitocondriale ottenuta da fettine incubate, una radioattività riferibile a insulina, non è una prova che l'insulina entri nelle cellule del tessuto; anzi l'aver trovato (Tab. 4) che nelle condizioni sperimentali adottate si è ancora lontani dalla saturazione della fissazione, indica, che, se anche entra, l'insulina penetra nelle cellule in quantità piccola rispetto a quella che si fissa al tessuto.

Gli analoghi risultati relativi alla frazione nucleare non presentano coincidenze significative tra i valori di ciascuna coppia; ciò può però spiegarsi con il fatto che in tale frazione nucleare, preparata nel modo precedentemente indicato, sono contenute anche le pareti cellulari; queste e evidentemente, durante l'incubazione delle fettine, vengono a contatto, attraverso gli spazi interstiziale, con il mezzo di incubazione, di concentrazione in radioattività (cpm/ml) assai più elevata che il mezzo di omogeneizzazione, per cui è comprensibile che la radioattività fissatasi su di esse sia notevole, e non sia quindi apprezzabile il successivo aumento dovuto ad ulteriore fissazione sul lato interno delle pareti e sui nuclei durante la omogeneizzazione.

Prove in presenza di sieroalbumina.

Nelle esperienze in cui per limitare le perdite di radioiodioinsulina per adsorbimento su vetro è stata aggiunta la sieroalbumina umana, si è trovato (vedi i valori medi della Tab. 3) che la radioattività fissata sulla frazione nucleare incubata direttamente (espressa in percentuale del totale delle radioattività ritrovate: N_{su}) è maggiore (circa 4 volte) di quella ottenuta senza aggiunta di sieroalbumina (N_s). Viceversa, nel caso di incubazione di

fettine di tessuto, la radioattività della frazione mitocondriale (M_{Fa}) diminuisce rispetto al caso senza aggiunta di sieralbumina (M_F). Nelle altre coppie corrispondenti, M_S e M_{Sa} , N_F e N_{Fa} la radioattività non differisce apprezzabilmente.

TABELLA 4.

Percentuali di radioattività ritrovate nelle frazioni mitocondriali e nucleari ottenute da fettine incubate (A) o incubate direttamente (B).

(Le percentuali sono state calcolate: nel primo caso rispetto all'attività dell'omogenato totale diminuita della attività fissata dalla frazione nucleare, o rispettivamente mitocondriale, nel secondo caso rispetto al totale ritrovato, compresi i mezzi. Ciascuna coppia di dati (A e B) si riferisce ad esperienze effettuate lo stesso giorno e con la stessa partita di radioiodioinsulina).

Frazioni mitocondriali

Esperienza	A da tessuto incubato	B incubate direttamente	
1°	3,46	3,53	/ con aggiunta di sieralbumina umana
2°	3,42	7,56	
3°	6,31	7,09	/ senza aggiunta di sieralbumina
4°	4,22	4,22	

Frazioni nucleari

Esperienza	A da tessuto incubato	B incubate direttamente	
1°	26,5	4,24	/ con aggiunta di sieralbumina
2°	25,6	6,55	
3°	25,4	2,66	/ senza aggiunta di sieralbumina
4°	8,17	1,45	

La prima delle variazioni suddette (caso della incubazione diretta della frazione nucleare) può essere spiegata con il fatto che la sieralbumina aggiunta forma con la radioinsulina un complesso (BERSON *et al.*, 1956) che si fissa sulle varie frazioni in quantità differenti da quelle della radioiodioinsulina. La seconda variazione (caso delle fettine incubate) potrebbe essere spiegata, nell'ipotesi che la membrana cellulare sia permeabile all'insulina, con una minore permeabilità di quella nei confronti del suddetto complesso radioiodioinsulina-sieralbumina.

Prove di fissazione di radioiodiosieroalbumina.

In relazione ai risultati avuti con la radioiodioinsulina si è ritenuto utile provare se anche altre proteine si comportassero analogamente. Si sono perciò eseguite, con la solita tecnica, incubazioni di fettine e di frazioni cellulari di tessuto adiposo bruno in mezzi contenenti radioiodiosieroalbumina, e si è misurata la radioattività fissata nelle varie frazioni. Dal confronto della Tab. 5 con la Tab. 3, risulta che le radioattività che si fissano sulle frazioni mitocondriale e nucleare nel caso della sieroalbumina- I^{131} sono però assai inferiori a quelle che si hanno con radioiodioinsulina.

TABELLA 5.

Distribuzione della radioattività fra la frazione nucleare e la frazione mitocondriale dopo incubazione in mezzo contenente radiiodiosieroalbumina, sia di fettine di tessuto adiposo bruno di ratto, sia delle frazioni nucleare e mitocondriale.

(I dati sono espressi in percentuale delle attività totali ritrovate)

FRAZIONE	Incubazione del tessuto e successivo frazionamento	Incubazione diretta delle singole frazioni
Frazione nucleare	0,02	0,60
Frazione mitocondriale	0,02	0,28
Rapporto N/M	1,0	2,1

Osservazioni.

In conclusione i risultati delle esperienze sulla fissazione della radioiodioinsulina mostrano che, nel caso di fettine incubate, la quota di radioiodioinsulina presente nella frazione mitocondriale, può essere costituita (oltre che da quella fissata in frammenti di pareti cellulari presenti nella frazione mitocondriale) sia da insulina eventualmente entrata nelle cellule durante l'incubazione, sia da insulina fissatasi sui mitocondri nella successiva fase di omogenizzazione. La concordanza però delle percentuali di radioattività fissata dai mitocondri nelle due condizioni di contatto (incubazione di frazioni e omogenizzazione delle fettine) (vedi Tab. 4), fa sì che la seconda causa sia sufficiente a giustificare tutto l'aumento della fissazione.

Gli AA. in base alle suddette ricerche orientative ritengono che lo studio della fissazione dell'insulina sulle frazioni cellulari potrà, con il miglioramento delle tecniche di separazione di queste e con particolari accorgimenti sperimentali, dare maggiori indicazioni sul problema della localizzazione dell'insulina, che da altra parte resta, nonostante i differenti metodi di attacco impiegati da vari autori, un problema ancora irrisolto.

Degradazione della radioiodioinsulina.

Dal confronto delle autoradiografie dei cromatogrammi monodimensionali dei mezzi di incubazione di diaframma di ratto e di fettine di tessuto adiposo bruno, di fegato, e di cervello e dei mezzi di incubazione delle frazioni nucleare e mitocondriale di adiposo bruno risulta che il cromatogramma relativo al mezzo dopo incubazione delle fettine di fegato, ha una macchia caratteristica di $R_{fA} = 0,47$ non presente nei cromatogrammi degli altri mezzi di incubazione.

I mezzi dopo incubazione delle frazioni nucleare e mitocondriale hanno fornito cromatogrammi simili a quelli relativi alle fettine ma con una degradazione che, misurata sul radiocromatogramma, è risultata essere circa 1/3 di quella ottenuta nel caso di incubazione delle fettine.

Il radiocromatogramma del mezzo di incubazione della vaschetta di Warburg di controllo (senza tessuto) è risultato qualitativamente simile a quello dopo incubazione, ma con le macchie dei prodotti di degradazione assai più deboli.

La macchia iniziale dei vari cromatogrammi monodimensionali è riferibile a radioiodioinsulina (MIRSKY, PERISSUTI & DIXON, 1955); inoltre mentre gli eluati non idrolizzati, rivelati con ninidrina, presentano solo alcune macchie bianche non riferibili ad amminoacidi, gli idrolizzati mostrano numerose macchie violette identificabili con i principali amminoacidi. Questo indica che la molecola dell'insulina viene degradata in polipeptidi.

La Tab. 6 riporta la distribuzione della radioattività fra il gruppo di macchie riferibili a insulina e quello dei prodotti di degradazione, dei cromatogrammi bidimensionali nel caso di incubazione di fettine di tessuto adiposo bruno e di fegato con radioiodioinsulina, sia senza che con aggiunta di un eccesso di insulina non marcata (2 mg/ml).

TABELLA 6.

Distribuzione della radioattività nei radiocromatogrammi bidimensionali nel caso di incubazione di fettine di tessuto adiposo bruno e di fegato con radioiodioinsulina, sia senza che con aggiunta di un eccesso di insulina non marcata (2 mg/ml).

(I dati sono espressi in percentuale della radioattività di ciascun gruppo di macchie (vedi LOSTIA & ROSSI, 1968) rispetto a quella totale delle macchie nel cromatogramma).

	Macchie riferibili a insulina	Macchie riferibili a prodotti di degradazione
Adiposo con sola radioiodioinsulina	23,5	76,2
Adiposo con eccesso d'insulina	93,3	7,7
Fegato con sola radioiodioinsulina	17,5	82,6
Fegato con eccesso d'insulina	92,7	7,4

togrammi bidimensionali ottenuti nei casi di incubazione di fettine di tessuto adiposo bruno e di fegato in un mezzo contenente radioiodioinsulina, senza o con aggiunta di eccesso di insulina non marcata 2 mg/ml).

Si nota che l'aggiunta, prima dell'incubazione, di insulina non marcata al mezzo contenente radioiodioinsulina, riduce la degradazione di questa, confermando così che si tratta per la quasi totalità d'azione enzimatica: si nota inoltre che tale attività enzimatica è notevole, in quanto anche con l'aggiunta di un quantitativo di insulina circa 500 volte quello della radioiodioinsulina (che già è in eccesso rispetto ai livelli fisiologici) la degradazione dell'ormone supera il 7%.

Gli AA. ringraziano i Sig.ri Rolando Magrini e Domenico Zorretta per la collaborazione tecnica prestata.

21 aprile 1969.

BIBLIOGRAFIA

- BERSON, S. A., R. S. YALOW, A. BAUMAN, M. A. ROTSCCHILD & K. NEWERLY, 1956, *J. Clin. Invest.*, **35**, 170.
- GARRAT, C. J., J. S. CAMERON & G. MENZINGER, 1966, *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 179.
- GRIMMINGER, V. H., V. SASIVIMOLKUL & E. KALLEE, 1964, *Z. Naturforsch.*, **19 b**, 357.
- GRODSTRY, G. & H. TAVER, 1956, *Nature*, **177**, 223.
- KONO, T. & S. P. COLOWICH, 1961, *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 520.
- LEE, N. D. & R. H. WILLIAMS, 1954, *Endocrinology*, **54**, 5.
- LEE, N. D. & R. WISEMAN, JR., 1959, *Endocrinology*, **65**, 412.
- LIGHT, A. & M. V. SIMPSON, 1956, *Nature*, **177**, 224.
- LOSTIA, O. & C. ROSSI, 1968, *Ann. Ist. Super. Sanità*, **4**, 211.
- MALAISSÉ, W. & J. R. M. FRANKSON, 1965, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **155**, 481.
- MIRSKY, I. A., G. PERISSUTI & F. J. DIXON, 1955, *J. Biol. Chem.*, **214**, 397.
- NEWERLY, K. & S. A. BERSON, 1957, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **94**, 751.
- PIAZZA, E. U., M. D. CHARLES, J. GOODNER, M. D. & N. FREINKEL, 1959, *Diabetes*, **8**, 459.
- POCCHIARI, F. & C. ROSSI, 1961, *J. Chromatog.*, **5**, 377.
- STADIE, W. C., N. HAUGAARD & M. VAUGHAN, 1952, *J. Biol. Chem.*, **199**, 729.
- WISEMAN, R. JR. & B. E. BALTZ, 1961, *Endocrinology*, **68**, 354.