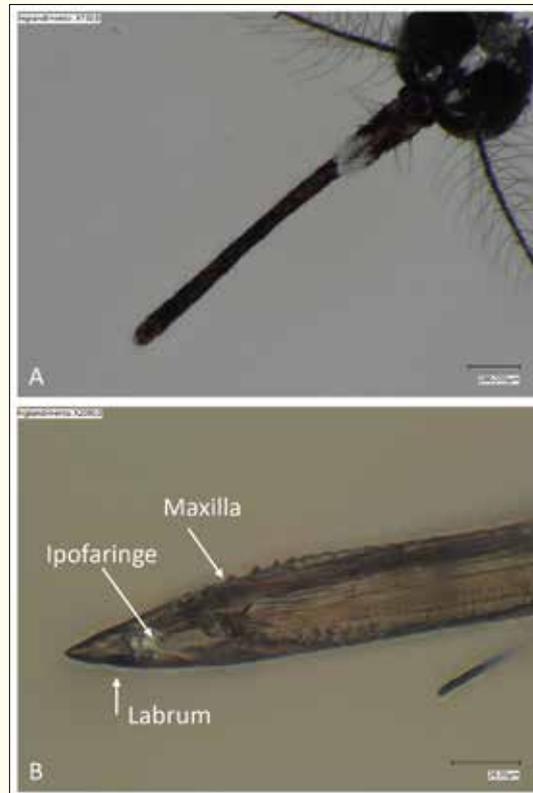




Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XLV.

I CULICIDI VETTORI DI INFEZIONI DI INTERESSE MEDICO-VETERINARIO: DALLA BIOLOGIA MOLECOLARE ALLO SVILUPPO DI METODOLOGIE DI CONTROLLO



Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXXI - 2023



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

LXXI.

**I CULICIDI VETTORI DI INFEZIONI
DI INTERESSE MEDICO-VETERINARIO:
DALLA BIOLOGIA MOLECOLARE
ALLO SVILUPPO DI METODOLOGIE DI CONTROLLO**

Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXXI - 2023

INDICE

Tavola Rotonda su:

I CULICIDI VETTORI DI INFEZIONI DI INTERESSE MEDICO-VETERINARIO: DALLA BIOLOGIA MOLECOLARE ALLO SVILUPPO DI METODOLOGIE DI CONTROLLO »	89
RICCARDO MOLteni, MIRIAM VADALÀ, GIULIA MARIA CATTANEO, GIORGIA BETTONI, SARA EPIS E CLAUDIO BANDI – <i>I culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo</i> »	91
MIRIAM FORMICA E THOMAS VACCARI – <i>Drosophila, “toolkit” della ricerca biomedica e biotecnologia</i> . . . »	97
AYDA KHORRAMNEJAD E MARIANGELA BONIZZONI – <i>Da cosa dipende il successo invasivo di Aedes albopictus?</i> »	101
GIOVANNI NARO, GIUSEPPE RABBITO E PAOLO GABRIELLI – <i>Ricostruzione ultrastrutturale dell’apparato pungitore nelle zanzare e meccanismi bio-molecolari del pasto ematico</i> »	105
MARIANNA VARONE, FRANCESCA LUCIBELLI, PAOLO DI LILLO E MARCO SALVEMINI – <i>La determinazione del sesso in Nematoceri vettori: stato dell’arte e prospettive di studio</i> »	111
VERENA PICHLER, BENIAMINO CAPUTO E ALESSANDRA DELLA TORRE – <i>La resistenza agli insetticidi in Culicidi vettori di patogeni umani e zoonotici in Italia</i> »	117
ALESSIA CAPPELLI E GUIDO FAVIA – <i>Simbiosi e controllo dei Ditteri vettori e delle malattie trasmesse</i> . . . »	121

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE, 10 NOVEMBRE 2023

Tavola Rotonda su:

I CULICIDI VETTORI DI INFEZIONI DI INTERESSE MEDICO-VETERINARIO:
DALLA BIOLOGIA MOLECOLARE ALLO SVILUPPO DI METODOLOGIE DI CONTROLLO

Coordinatori:

CLAUDIO BANDI e

SARA EPIS

I CULICIDI VETTORI DI INFEZIONI DI INTERESSE MEDICO-VETERINARIO: DALLA BIOLOGIA MOLECOLARE ALLO SVILUPPO DI METODOLOGIE DI CONTROLLO

RICCARDO MOLTENI ^a - MIRIAM VADALÀ ^a - GIULIA MARIA CATTANEO ^a - GIORGIA BETTONI ^a
SARA EPIS ^a - CLAUDIO BANDI ^{a*}

^a *Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milano Italia*

* *Corresponding Author* claudio.band@unimi.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Culicidae as vectors of infections of veterinary-medical interest: from molecular biology to the development of control methodologies

I Culicidi sono ditteri ematofagi che possono fungere da vettori per molti agenti patogeni, specifici per l'uomo, o di carattere zoonotico. Le virosi trasmesse da questi artropodi, come la febbre dengue e la febbre del Nilo occidentale, insieme ad altre arbovirosi, costituiscono un importante problema di sanità pubblica. La globalizzazione, il cambiamento climatico e la frammentazione degli habitat stanno influenzando la distribuzione e l'abbondanza di zanzare vettrici, aumentando il rischio di trasmissione di arbovirosi. Per affrontare la crescente minaccia, è essenziale agire tramite un sistema di sorveglianza coordinato a livello internazionale, che possa guidare l'implementazione delle strategie di controllo dei vettori.

KEY WORDS: mosquitoes, arbovirosis, globalization, global warming, control methods

CULICIDI

I Culicidi, più comunemente noti come zanzare, sono insetti appartenenti all'ordine dei Ditteri. Nel mondo sono conosciute più di 3500 specie, raggruppate in tre sottofamiglie: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitina (SEVERINI *et al.*, 2009). Le zanzare sono insetti olometaboli, ovvero a metamorfosi completa, e il loro ciclo vitale è composto da quattro stadi: uovo, larva, pupa e adulto, di cui i primi tre sono acquatici. La loro ecologia è quindi strettamente connessa alla presenza di raccolte d'acqua non corrente/stagnante e ad aree con clima caldo-umido che favoriscono il ciclo di sviluppo e la sopravvivenza degli adulti (ROMI *et al.*, 2012). Gli adulti sono artropodi esili e affusolati la cui lunghezza è nell'ordine del centimetro, che si caratterizzano per il loro apparato buccale pungente succhiante, sottoforma di lunga proboscide, formata da labbro superiore, mandibole, mascelle e ipofaringe. I maschi utilizzano la proboscide per nutrirsi di sostanze zuccherine di origine vegetale, presentando infatti mandibole e mascelle ridotte o assenti. Le femmine ematofaghe, invece, effettuano il pasto di sangue su ospiti vertebrati per la produzione e la maturazione delle uova (SEVERINI *et al.*, 2022). Gli ospiti vengono individuati per via chemiotropica, soprattutto grazie alle emissioni di anidride carbonica, o alla temperatura corporea (DUTTO, 2008). L'apparato buccale è poi utilizzato per effettuare la puntura, raggiungendo un vaso sanguigno da cui viene prelevato il sangue (SEVERINI *et al.*, 2022). I ritmi circadiani dei Culicidi sono caratterizzati da uno o due picchi di attività, nelle ore notturne per alcune specie di interesse per l'uomo, alternati a fasi di riposo. Le zanzare sono

tra gli insetti di maggior interesse medico-veterinario in quanto potenziali vettori di agenti eziologici come arbovirus, plasmodi e filarie (VERDONSCHOT e BESSE-LOTOTSKAYA, 2014). In Italia vengono segnalate poco più di 60 specie, così ripartite nei diversi generi: *Anopheles*, 15; *Aedes*, 28; *Coquillettidia*, 2; *Culex*, 12; *Culiseta* 6; *Orthopodomyia*, 1; *Uranotaenia*, 1 (SEVERINI *et al.*, 2022).

ZOONOSI: LE ARBOVIROSI

Come definito nel 1951 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le zoonosi sono malattie e infezioni trasmesse tra vertebrati animali e umani (WHO, 1951). Le malattie zoonotiche possono essere trasmesse agli umani tramite un contatto diretto con un ospite vertebrato infetto o indirettamente tramite vettori biologici o meccanici (BHATT *et al.*, 2013; CHOMEL, 2009; GUBLER, 2007). Le malattie trasmesse da vettori costituiscono un importante problema di sanità pubblica: l'OMS stima che ogni anno siano responsabili di oltre un miliardo di infezioni nell'uomo, con un milione di morti, rappresentando circa il 17% dei casi totali di malattie infettive (WHO, 2023a). In particolare, fra le malattie trasmesse da vettori, degne di rilevanza sono le arbovirosi o *arthropod-borne viral diseases*, ossia infezioni virali trasmesse da artropodi, come zanzare, zecche e flebotomi, in cui la modalità di trasmissione avviene tramite la puntura da parte dell'artropode infetto verso un ospite vertebrato non infetto. Il ciclo di vita di questi virus a trasmissione vettoriale implica la sopravvivenza e la trasmissione tra due ospiti distinti (WU *et al.*, 2019). Gli arbovirus comprendono oltre 250 specie, a distribuzione ubiquitaria, di

questi si stima che oltre 100 virus identificati siano in grado di causare malattia nell'uomo (MINISTERO DELLA SALUTE, 2019). Il termine "arbovirus" è in realtà descrittivo e non indica alcuna specie, genere o famiglia. La maggior parte di questi agenti infettivi appartengono a diverse famiglie e generi, tra i quali Togaviridae (*Alphavirus*), Flaviridae (*Flavivirus*) e Bunyaviridae (*Bunyavirus* e *Phlebovirus*) (ICTV, 2024). Ogni anno, centinaia di milioni di casi d'infezione virale nell'uomo sono causati da virus trasmessi da zanzare (WHO, 2023a). Due specie, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sono responsabili della trasmissione all'uomo di più del 5% delle malattie infettive trasmesse da zanzare (Fig. 1). Queste due specie sono vettori di oltre 22 arbovirus di importanza globale per la salute pubblica, tra cui i virus responsabili di malattie come dengue, chikungunya, zika, encefalite giapponese, febbre della Rift Valley, febbre gialla e febbre West Nile (MEDLOCK *et al.*, 2015; SCHAFFNER, MEDLOCK, BORTEL, 2013).



Fig. 1 - Fotografia in microscopia digitale di esemplare femmina di *Aedes albopictus* (foto I. Arnoldi)

ARBOVIROSI IN ITALIA: DENGUE E WEST NILE

In Italia, le arbovirosi possono essere sia di origine autoctona, fra cui si annovera la febbre da West Nile virus (WNV), l'infezione da virus usutu (USUV), l'infezione da virus Toscana (TOSV) e l'encefalite virale da zecche (TBEV); sia arbovirosi di importazione, come le infezioni causate dai virus chikungunya (CHIKV), dengue (DV) e zika (ZV). Lungo il territorio italiano gli artropodi vettori di arbovirosi sono rappresentati, tra gli aracnidi, da alcune "zecche dure" (famiglia Ixodidae)

e, tra gli insetti, da alcune specie di flebotomi (famiglia Psychodidae) e zanzare (famiglia Culicidae). Per quanto riguarda questi ultimi, la zanzara *Culex pipiens*, ubiquitaria in Italia e particolarmente presente durante il periodo estivo, è il principale vettore di WNV e USUV. La specie *A. albopictus*, conosciuta come "zanzara tigre" e introdotta in Italia nel 1990 dal Sud-Est asiatico, è vettore competente di DV e di CHIKV. Altre specie invasive e potenziali vettori di arbovirus, come *Aedes koreicus* e *Aedes japonicus*, sono state solo ultimamente introdotte in alcune aree del nostro paese (ISS, 2022a; MINISTERO DELLA SALUTE, 2019).

West Nile Virus - Il WNV è un virus a RNA della famiglia Flaviviridae isolato per la prima volta nel 1937 in Uganda nel distretto West Nile (SMITHBURN *et al.*, 1940). In Europa è stato segnalato a partire dal 1958 e tra i virus del genere *Flavivirus* è il più diffuso al mondo e presente in tutti i continenti. Gli uccelli selvatici, come le specie presenti in Italia *Pica pica*, *Corvus corone cornix*, *Garrulus glandarius*, rappresentano il principale serbatoio del virus. Tuttavia, in alcuni casi il virus può raggiungere accidentalmente altri ospiti, come cavallo, roditori, gatti e uomo. È trasmesso principalmente attraverso la puntura di zanzare ornitofile infette (più frequentemente del genere *Culex*), le quali acquisiscono il virus da uccelli infetti (MCLEAN *et al.*, 2001; ISS, 2023). La febbre West Nile si sviluppa in modo asintomatico nella maggior parte dei casi. Tuttavia, nelle categorie a rischio, come persone anziane, individui con disturbi immunitari e coloro che soffrono di patologie croniche come tumori, diabete, ipertensione, patologie renali o che sono stati sottoposti a trapianto, l'infezione da WNV può manifestarsi con sintomi neurologici, talvolta letali (ROSSI, ROSS e EVANS, 2010; ISS, 2022b). In Italia il primo focolaio di febbre West Nile risale all'estate del 1998 (AUTORINO *et al.*, 2002) con il riscontro di alcuni casi clinicamente accertati in cavalli presenti nell'area circostante la zona di Padule di Fucecchio, in Toscana. L'infezione è stata da allora segnalata ogni anno nell'uomo, negli animali e nei vettori, coinvolgendo anche nuovi territori dell'Italia settentrionale e centro-meridionale (DELBUE *et al.*, 2014). Complessivamente, dal 2008 sono 14 le Regioni italiane (Emilia-Romagna, Veneto, Lombardia, Sardegna, Sicilia, Friuli-Venezia Giulia, Piemonte, Molise, Toscana, Basilicata, Lazio, Puglia, Calabria, Liguria) in cui è stata rilevata la circolazione di WNV. Nel 2023, dall'inizio di maggio i casi di infezione da WNV segnalati in Italia sono stati 332 nell'uomo, di questi, 190 si sono manifestati nella forma neuro-invasiva, 71 casi asintomatici identificati in donatori di sangue e 1 caso asintomatico in Lombardia. Tra i casi confermati, sono stati notificati 27 decessi (6 Piemonte, 11 Lombardia, 1 Friuli-Venezia Giulia, 9 Emilia-Romagna) (ISS, 2023)

Dengue - Il virus responsabile della dengue è un virus a RNA della famiglia Flaviviridae, genere *Flavivirus*. La malattia virale dengue è causata da quattro differenti sierotipi (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) ed è trasmessa agli

esseri umani dalle punture di zanzare infette del genere *Aedes*. Nell'emisfero occidentale il vettore principale è la zanzara *A. aegypti*, anche se si sono registrati casi trasmessi da *A. albopictus*. Il virus circola nel sangue della persona infetta per 2-7 giorni e in questo periodo la zanzara può prelevarlo e trasmetterlo ad altri individui. Non si ha contagio diretto tra esseri umani, anche se l'uomo è il principale ospite del virus (MINISTERO DELLA SALUTE, 2019). Secondo l'OMS circa metà della popolazione mondiale è oggi a rischio d'infezione da virus dengue, con una stima di 100-400 milioni di infezioni all'anno (WHO, 2023b). *A. albopictus* è ritenuta il vettore potenzialmente principale per questa tipologia di arbovirus. La prima segnalazione della presenza di questa zanzara in Italia risale al 1990. Attualmente è presente stabilmente in tutto il Paese, dalle pianure fino a quote collinari, soprattutto nei centri abitati, dove stagionalmente può raggiungere densità molto elevate. La dengue è particolarmente diffusa, durante e dopo la stagione delle piogge, in molte zone tropicali e subtropicali (Sud-Est Asiatico, Africa, Cina, India, Medio Oriente, America latina e centrale, Australia e diverse zone del Pacifico). Tuttavia, negli ultimi anni si è registrata un'espansione di febbre dengue anche verso i paesi dell'emisfero nord, in particolare in Europa, in associazione con l'incremento di spostamenti di merci e persone. Sebbene nella maggior parte dei casi l'infezione si presenti in forma asintomatica oppure come malattia febbrile, sono state descritte anche forme gravi, talora con esito fatale (RUCHE et al. 2010; MINISTERO DELLA SALUTE, 2023). Il sistema di sorveglianza nazionale ha registrato dall'1 gennaio al 4 dicembre 2023, 362 casi confermati di dengue, tra cui 280 casi importati e 82 casi autoctoni. Questi ultimi casi sono riferiti a quattro episodi di trasmissione non collegati tra loro in provincia di Lodi (41 casi confermati), in provincia di Latina (2 casi) e in provincia di Roma (38 casi con esposizioni in diverse parti della città metropolitana di Roma e 1 caso ad Anzio). Distintivi sono i casi considerati "autoctoni" emersi a Castiglione d'Adda in provincia di Lodi (CASSANITI et al., 2023; ISS, 2024).

LA GLOBALIZZAZIONE

Nell'ultimo secolo, il fenomeno della globalizzazione, i viaggi, il commercio, l'urbanizzazione e i cambiamenti climatici stanno avendo un impatto significativo sulla diffusione di malattie virali. Sono diversi i fattori legati a questi processi che contribuiscono tutt'oggi alla diffusione dei vettori e dei patogeni trasmessi. Alcune patologie, come la febbre dengue, la chikungunya e la febbre West Nile, stanno emergendo in paesi in cui erano precedentemente sconosciute (GEZAIRY, 2003).

I viaggi e il commercio internazionale

Nel corso della storia, l'apertura delle rotte di viaggio e commerciali è stata accompagnata dalla diffusione di malattie infettive, dalla ben nota peste nera diffusasi dal Sud-Est asiatico in Europa nel XIV secolo, passando alle pandemie di colera nel XIX e XX secolo, originatesi nel subcontinente indiano. Attualmente, gli oltre 700 milioni

di viaggiatori che si spostano ogni anno sul nostro pianeta hanno un rischio significativo di infettarsi e diventare veicolo di infezione, trasferendo agenti infettivi tra Paesi geograficamente distanti ma ormai temporalmente vicini (GEZAIRY, 2003). Oltre a ciò, le principali vie di diffusione dei vettori e delle relative malattie vettoriali virali emergenti sono anche da ritrovare nel trasporto accidentale degli stessi vettori tramite merci, come il commercio di copertoni usati (le zanzare depongono infatti le uova appena sopra il pelo dell'acqua ristagnante nelle gomme) e anche tramite le piante ornamentali che vengono trasportate in acqua, tra cui arbusti come il "lucky bamboo" (IBÁÑEZ-JUSTICIA et al., 2020; REITER P. 1998).

Cambiamento climatico

Si stima che le attività umane abbiano portato all'aumento della temperatura superficiale media globale di circa 1°C rispetto ai livelli preindustriali ed è probabile che si raggiunga un aumento di 1,5°C tra il 2030 e il 2052 (IPCC, 2018). Il riscaldamento globale gioca un ruolo fondamentale nella diffusione delle zanzare. La temperatura è un fattore che influenza moltissimo la progressione delle generazioni e la dimensione della popolazione di questi vettori. All'aumentare della temperatura, infatti, subiscono un'accelerazione non solo la riproduzione e il ciclo vitale, ma anche la frequenza dei pasti di sangue, con conseguente aumento della possibilità di trasmissione di agenti patogeni (BECKER, 2008). Inoltre, i cambiamenti delle temperature sono spesso accompagnati da mutamenti a livello di precipitazioni e umidità, altri importanti aspetti nella dinamica delle popolazioni delle zanzare. Sia in caso di siccità che di inondazioni questi vettori andranno incontro a un aumento di abbondanza e a una maggiore diffusione (KHEZZANI et al., 2023). SINGH e PUROHIT, nel 2014, hanno stimato uno spostamento latitudinale di circa 200 km per ogni grado Celsius di aumento della temperatura globale. Il riscaldamento climatico può ripercuotersi anche sul patogeno che può potenzialmente essere trasmesso dalla zanzara, aumentando la velocità di moltiplicazione o riducendone i tempi di incubazione (KHEZZANI et al., 2023). Infine, anche la popolazione ospite (i.e. uomo) può risentire degli effetti di questo aumento di temperatura andando incontro a un aumento della percentuale di persone che scendono al di sotto delle soglie immunitarie critiche che proteggono da infezioni e malattie (SWAMINATHAN et al., 2014).

Frammentazione degli habitat

Tra le cause del cambiamento climatico è annoverato il mutamento nell'uso del territorio, che a sua volta viene intensificato dal riscaldamento globale stesso. Questo circolo vizioso si riflette ulteriormente sull'idoneità ambientale per lo sviluppo dei vettori e dei patogeni. Inoltre, l'urbanizzazione e la frammentazione degli habitat creano non solo nuove aree disponibili alla crescita e allo sviluppo di popolazioni di zanzare, ma aumentano anche le opportunità di incontro tra vettori e ospiti (KHEZZANI et al., 2023). In uno studio del 2019, GAO e colleghi riportano che dal punto di vista biologico, la frammentazione

e l'irregolarità dell'habitat promuovono l'insorgenza di malattie e ne intensificano la persistenza. Una distribuzione proporzionale tra esseri umani e zanzare sembra ridurre al minimo il rischio di infezione.

BIBLIOGRAFIA

- AUTORINO, GIAN LUCA ET AL., 2002 - *West Nile virus Epidemic in Horses, Tuscany Region, Italy*. - *Emerging Infectious Diseases*, 8(12): 1372–78.
- BECKER N., 2008 - *Influence of climate change on mosquito development and mosquito-borne diseases in Europe*. - *Parasitol Res (Suppl 1)*, 103:S19–S28 DOI 10.1007/s00436-008-1210-2.
- BHATT S. ET AL., 2013 - *The Global Distribution and Burden of Dengue*. - *Nature*, 496(7446): 504–7.
- CASSANTI I., ET AL., 2023 - *Preliminary results on an autochthonous dengue outbreak in Lombardy Region, Italy, August 2023*. - *Eurosurveillance*, 28(37): 2300471.
- CHOMEL B.B., 2009 - *Zoonoses*. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, a c. di Moselio Schaechter. - Oxford: Academic Press, 820–29.
- CURRENT ICTV TAXONOMY RELEASE (ICTV), 2024 - <https://ictv.global/taxonomy>.
- DELBUE S. ET AL., 2014 - *Review of West Nile Virus Epidemiology in Italy and Report of a Case of West Nile Virus Encephalitis*. - *Journal of Neurovirology*, 20(5): 437–41.
- DUTTO M., 2008 - *Lineamenti di Entomologia Medica*. C. & G. Edizioni Medico Scientifiche.
- GAO D., VAN DEN DRIESSCHE P., COSNER C., 2019 - *Habitat fragmentation promotes malaria persistence*. - *Journal of Mathematical Biology*, 79:2255–2280 <https://doi.org/10.1007/s00285-019-01428-2>.
- GEZAIRY H.A., 2003 - *Travel epidemiology: WHO perspective*. - *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(2): 86–88.
- GUBLER D.J., 2007 - *The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere*. - *Clinical Infectious Diseases*, 45(8): 1039–46.
- IBÁÑEZ-JUSTICIA A. ET AL., 2020 - *Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera: Culicidae) at International Airports in Europe*. - *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10): 3450.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC), 2018 - *Summary for Policymakers*. In: *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 3–24. <https://doi.org/10.1017/9781009157940.001>.
- ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (ISS), 2022a - *Epicentro - l'epidemiologia per la sanità pubblica*. - <https://www.epicentro.iss.it/arbovirosi/>.
- ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (ISS), 2022b - *Epicentro - l'epidemiologia per la sanità pubblica*. - <https://www.epicentro.iss.it/westnile/>.
- ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (ISS), 2023 - *Bollettino N.18 del 9/11/ 2023, Risultati nazionali*. - https://www.epicentro.iss.it/westnile/bollettino/Bollettino_WND_2023_18.pdf.
- ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (ISS), 2024 - *Bollettino dell'11/1/2024*. - <https://www.epicentro.iss.it/arbovirosi/aggiornamenti>.
- KHEZZANI B., BAYMAKOVA M., KHECHEKHOUCHE E.A., TSACHEV I., 2023 - *Global warming and mosquito-borne diseases in Africa: a narrative review*. - *Pan African Medical Journal*, 44(70). 10.11604/pamj.2023.44.70.37318.
- MCLEAN R.G. ET AL., 2001 - *West Nile Virus Transmission and Ecology in Birds*. - *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951: 54–57.
- MEDLOCK J.M. ET AL., 2015 - *An Entomological Review of Invasive Mosquitoes in Europe*. - *Bulletin of Entomological Research*, 105(6): 637–63.
- MINISTERO DELLA SALUTE, 2019 - *Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle arbovirosi (PNA) 2020-2025*. - https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2947_allegato.pdf.
- MINISTERO DELLA SALUTE, 2023 - *Portale del ministero della Salute - Malattie infettive*. - <https://www.salute.gov.it/portale/malattieinfettive>.
- REITER P., 1998 - *Aedes albopictus and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come?* - *J Am Mosq Control Assoc.*,14(1):83-94. PMID: 9599329.
- ROMI R., KHOURY C., BIANCHI R., SEVERINI F. (ED.), 2012 - *Artropodi di interesse sanitario in Italia e in Europa*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. Rapporti ISTISAN 12/41.
- ROSSI S.L., ROSS T.M., EVANS J.D., 2010 - *WEST NILE VIRUS*. - *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1): 47–65.
- RUCHE G. LA ET AL., 2010 - *First Two Autochthonous Dengue Virus Infections in Metropolitan France, September 2010*. - *Eurosurveillance*, 15(39): 19676.
- SCHAFFNER F., MEDLOCK J.M., VAN BORTEL W., 2013 - *Public Health Significance of Invasive Mosquitoes in Europe*. - *Clinical Microbiology and Infection*, 19(8): 685–92.
- SEVERINI F., TOMA L., DI LUCA M., ROMI R., 2009 - *Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera, Culicidae)*. - *Fragmenta entomologica*, Roma, 41 (2): 213-372.
- SEVERINI F., TOMA L., DI LUCA M., 2022 - *Zanzare in Italia: raccolta, identificazione e conservazione delle specie più comuni*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. Rapporti ISTISAN 22/3.
- SINGH A., PUROHIT B.M., 2014 - *Public health impacts of global warming and climate change*. - *Peace Review*, 26(1), 112-120.
- SMITHBURN K.C., HUGHES T.P., BURKE A.W., PAUL J.H., 1940. - *A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda*. - *American Journal of Tropical Medicine*, 20: 471–72.

- SWAMINATHAN A., LUCAS R. M., HARLEY D., MCMICHAEL A.J., 2014. - *Will Global Climate Change Alter Fundamental Human Immune Reactivity: Implications for Child Health*. *Children*, 1, 403-423; doi:10.3390/children1030403.
- VERDONSCHOT P.F.M., BESSE-LOTOTSKAYA A.A., 2014 - *Flight distance of mosquitoes (Culicidae): A meta-data analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands*. - *Limnologica*, 45: 69-79.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023a - *Disease outbreak news - Dengue global situation*. - <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023b - *Fact sheet - Dengue and severe dengue*. - <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- WU P., XI Y., PENGHUA W., GONG C., 2019 - *Arbovirus Lifecycle in Mosquito: Acquisition, Propagation and Transmission*. - *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 21: e1.

DROSOPHILA, TOOLKIT PER LA RICERCA BIOMEDICA E BIOTECNOLOGICA

MIRIAM FORMICA ^a - THOMAS VACCARI ^a

^a *Dipartimento di Bioscienze, Università degli studi di Milano, Via Celoria 26, 20133, Milano*

Corresponding Author: thomas.vaccari@unimi.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Drosophila, a toolkit for biomedicine and biotechnology

Glioblastoma (GBM), a highly aggressive and incurable tumor, often stems from constitutive activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K). To understand the role of autophagy in glioma pathogenesis *in vivo*, we utilized an established *Drosophila melanogaster* model of glioma based on overexpression in larval glial cells of an active human EGFR and the PI3K homolog Pi3K92E/Dp110. Such glia exhibits hyperplastic cell growth and high cellular levels of a key component of the lysosomal-autophagic compartment, ref(2)P (refractory to Sigma P), the *Drosophila* homolog of SQSTM1/p62. However, autophagic cargo degradation appears inhibited. Surprisingly, depletion via RNA interference of vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) subunits, of Pdk1, or of the TORC1 complex component raptor prevents overgrowth and normalizes ref(2)P levels. Additionally, depletion of the V-ATPase subunit VhaPPA1-1 reduces AKT and mTOR-dependent signaling and restores autophagic degradation. Consistent with fly experiments, patient neurospheres with high expression of the V-ATPase G1 subunit show autophagy inhibition. Overall, our data suggest that autophagy is suppressed during glioma tumorigenesis due to excessive anabolic oncogenic signaling and that V-ATPase and mTORC1 components acting on lysosomes could represent therapeutic targets against GBM.

KEY WORDS: *Drosophila melanogaster*, genetica, metabolismo dei nutrienti, glioma

INTRODUZIONE

Drosophila melanogaster, comunemente nota come moscerino della frutta, è un organismo modello cruciale nella ricerca biomedica. La sua breve durata di vita, facile manipolazione genetica, e la condivisione di molti processi biologici con i mammiferi ne fanno un sistema sperimentale altamente pratico e rilevante per la salute umana.

Drosophila è stata fondamentale nella comprensione di processi biologici determinanti come lo sviluppo embrionale o del sistema nervoso. Inoltre, il moscerino della frutta è ampiamente utilizzato per lo studio delle malattie rare o neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson. I modelli di *Drosophila* possono riprodurre fedelmente molte caratteristiche delle malattie umane, fornendo così *insight* preziosi per lo sviluppo di terapie e farmaci.

Drosophila ha assunto un ruolo centrale anche nella modellizzazione genetica dei tumori, offrendo un sistema sperimentale efficiente per comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nella carcinogenesi. I modelli di *Drosophila* sono stati particolarmente utili nello studio dei geni coinvolti nella formazione dei tumori, nella regolazione della crescita cellulare e perfino nella metastasi. Ciò ha indubbiamente accelerato la comprensione dei processi regolati da potenziali oncogeni e soppressori tumorali e ha contribuito a identificare vie di segnalazione cruciali coinvolte nella progressione tumorale.

Molti degli studi in *Drosophila* si sono avvalsi di ap-

procci di genetica diretta, nei quali tramite mutagenesi vengono isolati mutanti in geni che controllano i processi biologici oggetto dell'osservazione. Tali approcci hanno portato alla comprensione del funzionamento di geni come il proto oncogene Notch, che sono mutati in diversi tumori e malattie genetiche rare. Altri esempi includono i geni soppressori tumorali che costituiscono la via di segnalazione di Hippo che limita la crescita di tessuti e organi. Approcci di genetica inversa invece tendono inattivare o sovraesprimere geni frequentemente mutati nelle malattie umane. Tale ricreazione della genetica dei pazienti rende il sistema un valido avatar per esplorare i processi patogenici *in vivo*.

I gliomi sono un gruppo di tumori cerebrali rari con prognosi e decorso variabile. Tra i gliomi, il glioblastoma (GBM) ha esiti particolarmente infausti e limitatissime opzioni terapeutiche. Un modello di sviluppo dei gliomi in *Drosophila* è stato descritto da READ *et al* 2013. Tale modello prevede la co-espressione ectopica nelle cellule gliali della larva di una forma oncogenica del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) umano e della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K). L'espressione ectopica è regolata da RepoGal4, un attivatore trascrizionale esclusivamente espresso nelle cellule gliali, che vengono marcate anche dall'espressione di GFP regolata dallo stesso elemento. In animali coesprimenti EGFR e PI3K è stato osservato lo sviluppo massiccio di tessuto GFP positivo che rappresenta l'eccesso di crescita cellulare. Tale crescita eccessiva mima il processo di gliomagenesi e porta alla formazione

di larve dotate di complessi cefalici molto ingrossati che soccombono prima di trasformarsi in pupe.

Nonostante le segnalazioni di EGFR e PI3K funzionino a monte di sistemi che regolano i sistemi di nutrimento delle cellule, come i gliomi regolino l'utilizzo di nutrienti per la loro crescita non è del tutto noto. In particolare, non è chiaro il ruolo dell'autofagia, il processo cellulare catabolico che ricicla porzioni del citoplasma, veicolandone i componenti al lisosoma, dove, grazie alla degradazione, la cellula recupera nutrienti per nuovi processi anabolici.

In uno studio recente (FORMICA *et al.*, 2021), abbiamo utilizzato *Drosophila melanogaster* come modello *in vivo* per definire il ruolo dell'autofagia durante la gliomagenesi. I nostri dati indicano che l'autofagia è repressa sia nell'animale che nelle neurosfere derivate da pazienti GBM e che i componenti della via AKT-mTOR, così come il complesso della H⁺-ATPasi di tipo vacuolare (V-ATPasi) sono probabilmente fattori limitanti per la crescita e l'inibizione dell'autofagia.

LA CRESCITA DEL GLIOMA DIPENDE
DALLA SEGNALEZIONE AL LISOSOMA

Per determinare se la via di segnalazione di TORC1, operante al lisosoma, è richiesta per la gliomagenesi in *Drosophila* abbiamo depletato nelle cellule gliali sovraespressanti EGFR e PI3K il gene *raptor* che codifica per un componente necessario per la funzionalità di TORC1. Abbiamo anche depletato *Pdk1* che codifica per un trasduttore che opera a valle di EGFR e PI3K, ma a monte di AKT, una chinasi che a sua volta attiva TORC1. Entrambe le delezioni in condizioni di controllo non impattano lo sviluppo delle larve, indicando che la deplezione riduce solo parzialmente l'espressione genica. In contrasto a ciò,

l e *VhaPPAI-1*, tre geni che codificano per componenti della V-ATPasi, riduce la gliomagenesi *in vivo* senza che le stesse delezioni blocchino la crescita delle cellule gliali in animali di controllo. In aggiunta a ciò, troviamo che laddove l'attivazione di AKT è fortemente aumentata nei complessi cefalici di larve sovraespressanti EGFR e PI3K, questa è parzialmente ridotta dalla deplezione di *VhaPPAI-1*. Questi dati suggeriscono che la crescita eccessiva delle cellule gliali in condizioni genetiche che mimano la gliomagenesi dipende da una forte attivazione lisosomale di AKT, mTOR e V-ATPase in senso anabolico. Tali fattori appaiono particolarmente limitanti perchè la loro riduzione a livelli che non impattano cellule gliali normali, ne limitano la crescita in condizioni di gliomagenesi.

L'AUTOFAGIA È BLOCCATA NELLE CELLULE CHE SVILUPPANO
IL GLIOMA E PUÒ ESSERE RIATTIVATA RIDUCENDO
L'ESPRESSIONE DI GENI DELLA V-ATPASI

Per comprendere il ruolo dell'autofagia nella gliomagenesi abbiamo valutato la quantità di foci cellulari di ref(2)P (refrattario a Sigma P), l'omologo in *Drosophila* di SQSTM1/p62. I foci di ref(2)P rappresentano i componenti cellulari che verranno degradati dalla via autofagica-lisosomale. L'analisi a immunofluorescenza delle cellule gliali GFP positive dei complessi cefalici delle larve di *Drosophila* ha mostrato che le cellule sovraespressanti EGFR e PI3K contengono molta accumulazione di ref(2)P. Anche in condizioni di alto flusso autofagico, se la degradazione lisosomale funziona correttamente è improbabile che ref(2)P si accumuli. Quindi è possibile che in condizioni di segnalazione in senso fortemente anabolico, le cellule del glioma inattivino la via autofagica. Ciò in realtà è atteso perchè in condizioni normali la via anabolica

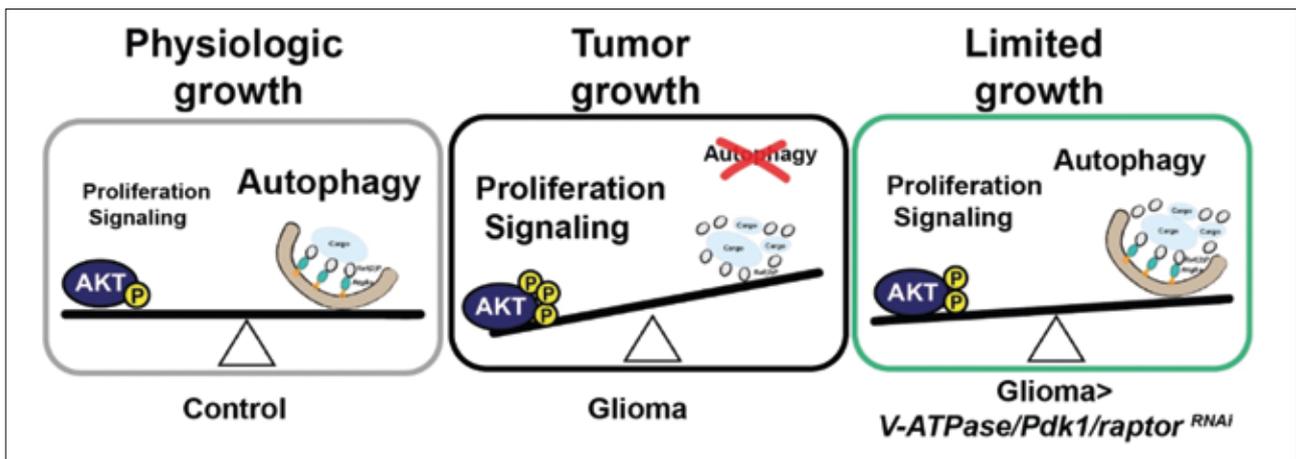


Fig. 1 - Un modello di alterazione metabolica dei nutrienti cellulari durante la gliomagenesi *in vivo* in *Drosophila melanogaster*.

a seguito della coespressione di EGFR e PI3K e in condizioni di deplezione di *raptor* o di *Pdk1*, osserviamo che la crescita eccessiva dei complessi cefalici larvali viene quasi interamente recuperata, portando alla formazione di pupe che riescono a completare la metamorfosi. In modo simile, abbiamo osservato che la deplezione di *Vha14-1*, *Vha16-*

di mTOR e quella autofagica sono alternative (SETTEMBRE *et al.*, 2012). Sorprendentemente le cellule sovraespressanti EGFR e PI3K in cui *VhaPPAI-1* è stato depletato non mostrano però l'accumulo di ref(2)P come nel caso delle cellule gliali di controllo. In un esperimento di microscopia elettronica su neurosfere in coltura derivate da cellule di

pazienti affetti da GBM, abbiamo anche osservato che in sfere con alti livelli di espressione della subunità G1 della V-ATPasi, il flusso autofagico è bloccato mentre in neurosfere che esprimono poca V-ATPasi G1 il flusso autofagico è presente. In una serie di studi precedenti abbiamo descritto i due tipi di neurosfere e dimostrato che quelle alto-esprimenti derivano da pazienti affetti da GBM con un decorso più infausto di pazienti con bassi livelli di V-ATPasi G1 (Di Cristofori *et al.*, 2015; Terrasi *et al.*, 2019; Bertolini *et al.*, 2019). Queste evidenze sperimentali suggeriscono che nei gliomi la via autofagica sia bloccata dalla segnalazione anabolica e che la riduzione dell'anabolismo controllato dalla V-ATPasi riattivi la via catabolica lisosomale.

CONCLUSIONI

Questo studio ci ha permesso di elaborare un modello per la funzione lisosomale e della V-ATPasi nello sviluppo gliomi larvali in *Drosophila* (Fig. 1). L'equilibrio fisiologico tra i processi anabolici e catabolici che governano la normale crescita cellulare (*physiologic growth*) viene fortemente compromesso nei gliomi a causa della segnalazione oncogenica di EGFR e PI3K che portano a una forte attivazione di AKT e dei processi anabolici associati a mTOR e al lisosoma. In queste condizioni, durante la gliomagenesi, la crescita è favorita mentre il catabolismo, che potrebbe agire come soppressore tumorale, è inibito (*tumor growth*). La deplezione di *VhaP-PA1-1*, *Pdk1* o *raptor* ripristina l'equilibrio che controlla il metabolismo dei nutrienti, riattivando l'autofagia e di-

minuendo la crescita del tumore (*limited growth*). Tali osservazioni, se confermate nei pazienti GBM potrebbero portare all'uso di farmaci che bloccino mTOR e/o che attivino la via autofagica.

REFERENCES

- BERTOLINI I., TERRASI A., MARTELLI C., ET AL., 2019 - *A GBM-like V-ATPase signature directs cell-cell tumor signaling and reprogramming via large oncosomes.* – *EbioMedicine*, 41: 225-235.
- DI CRISTOFORI A., FERRERO S., BERTOLINI I., ET AL., 2015 - *The vacuolar H⁺ ATPase is a novel therapeutic target for glioblastoma.* - *Oncotarget*, 6(19):17514–17531.
- FORMICA M., STORACI A.M., BERTOLINI I. ET AL., 2019 - *V-ATPase controls tumor growth and autophagy in a Drosophila model of gliomagenesis.* – *Autophagy*, 17:12: 4442-4452,
- READ R.D., CAVENEE W.K., FURNARI F.B., ET AL., 2009 - *A Drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma.* - *PLoS Genet.*, 5(2). e1000374
- SETTEMBRE C., ZONCU R., MEDINA D.L., ET AL., 2012 - *A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB.* - *Embo J.*, 31(5):1095–1108.
- TERRASI A., BERTOLINI I., MARTELLI C., ET AL., 2019 - *Specific V-ATPase expression sub-classifies IDHwt lower-grade gliomas and impacts glioma growth in vivo.* – *EbioMedicine*, 41: 214–244.

DA COSA DIPENDE IL SUCCESSO INVASIVO DI *AEDES ALBOPICTUS*?

AYDA KHORRAMNEJAD^a - MARIANGELA BONIZZONI^{a,*}

^aDipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia, Pavia, Italia

*Corresponding Author, mariangela.bonizzoni@unipv.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Investigating the invasive success of Aedes albopictus

Understanding phenotypic traits, their intraspecific variation, and their genetic basis are a major goal of evolutionary studies. For invasive species of public health significance, such as the arboviral vector *Aedes albopictus*, these studies are essential to understand the potential for expansion, to implement new vector control strategies, such as those based on mass production of genetically or biologically manipulated mosquitoes, and to design mathematical models of mosquito populations or control programs.

KEY WORDS: invasion, arboviral vectors, *Aedes*

INTRODUZIONE ALLA TEMATICA

La comprensione dei tratti fenotipici, della loro variazione intraspecifica e della loro base genetica sono tra i principali obiettivi degli studi evolutivi, tradizionalmente perseguiti utilizzando organismi modello come *Drosophila melanogaster* (STERN and ORGOGOZO, 2008; FONSECA *et al.*, 2013). La fitness di *Dr. melanogaster* è ben compresa e, in diversi casi, sono state identificate le basi genetiche della variazione fenotipica dei tratti di fitness (POOL e AQUADRO, 2007). Negli organismi non modello, questo tipo di studi è limitato (SHAPIRO *et al.*, 2017). La zanzara tigre asiatica *Aedes albopictus* è un esempio di organismo per il quale la comprensione della variazione

origine. Negli ultimi 40-50 anni, questa specie ha conquistato tutti i continenti, a parte l'Antartide, dal Sud-Est asiatico e dalle vecchie isole colonizzate dell'Oceano Indiano e del Pacifico (BONIZZONI *et al.*, 2013). Questa rapida diffusione è stata sostenuta dalla propensione delle zanzare *Ae. albopictus* a riprodursi in contenitori costruiti dall'uomo e dalla capacità di svernare attraverso la diapausa fotoperiodica (ARMBRUSTER, 2016). Le popolazioni di *Ae. albopictus* differiscono per la loro capacità di diapausa e la comprensione delle basi molecolari di questo fenotipo dovrebbe aiutare a sfidare le potenzialità di adattamento delle zanzare a nuovi ambienti (ARMBRUSTER, 2016). Oltre a una prospettiva ecologica, lo studio dei tratti di fitness di *Ae. albopictus* è rilevante anche perché questa specie è un vettore di numerosi arbovirus, tra cui i virus dengue, zika e chikungunya. L'incidenza e l'impatto sulla salute umana di questi virus trasmessi da artropodi (arbovirus) sono aumentati negli ultimi 30 anni, soprattutto in seguito alla dispersione dei loro vettori (BENELLI e MEHLHORN, 2016). Ad esempio, sono stati rilevati casi di trasmissione autoctona di dengue nella Francia meridionale e in Croazia, mentre l'Italia è stata colpita da due focolai di chikungunya e uno di dengue dopo l'insediamento di popolazioni di *Ae. albopictus* in tutte le regioni del bacino del Mediterraneo nei primi anni 2000 (ROSSI *et al.*, 2023). L'importanza di quantificare i tratti di fitness delle zanzare, come la longevità degli adulti, per prevedere le epidemie di malattie trasmesse dalle zanzare e organizzare programmi di controllo

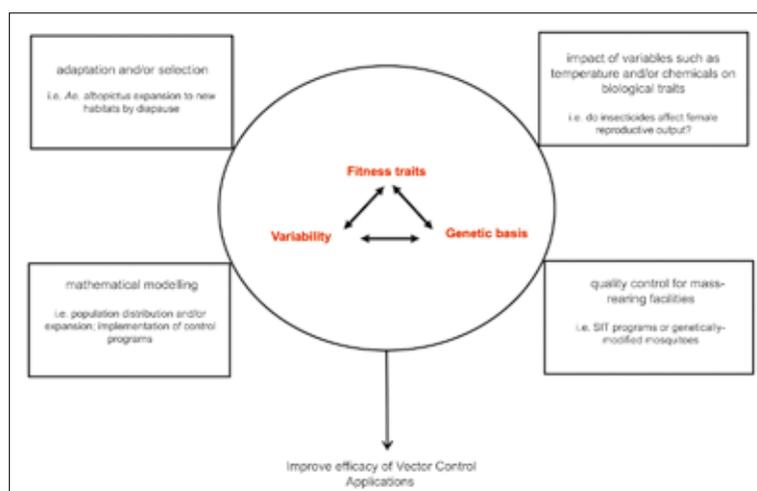


Fig. 1 - Importanza dello studio dei tratti di fitness in *Aedes albopictus*

fenotipica nei tratti di fitness e delle componenti genetiche di questi tratti ha motivazioni sia biologiche che applicative (Fig. 1). *Aedes albopictus* è classificata come una delle 100 specie più invasive al mondo a causa della sua aggressiva e rapida dispersione fuori dall'areale di

efficaci è stata osservata fin dalla formulazione originale della teoria della trasmissione di agenti patogeni trasmessi dalle zanzare da parte di Ross e Macdonald più di un secolo fa (MACDONALD, 1956). Tuttavia, nonostante i progressi nella modellazione matematica delle malattie tra-

smesse dalle zanzare verso l'inclusione di parametri di eterogeneità (ad esempio, tasso di puntura variabile delle zanzare, variazione spaziale e temporale nella distribuzione delle zanzare) e di adattamento locale, i modellatori si trovano spesso ad affrontare incertezze dovute alla scarsità di dati biologici con cui valutare le prestazioni dei loro modelli (ROBERT *et al.*, 2012). Pertanto, una comprensione più approfondita dei tratti di fitness di *Ae. albopictus*, della loro variabilità tra le popolazioni e della loro regolazione genetica aiuterebbe la progettazione di modelli matematici, che sono spesso richiesti dai responsabili politici prima di allocare le risorse per i programmi di controllo dei vettori.

METODOLOGIE

Ceppi di zanzare e dichiarazione etica

In questo studio sono stati utilizzati cinque ceppi di *Ae. albopictus*: Foshan (Fo), Rimini (Ri), La Reunion (LaR), Tapachula (Ta) e Crema (Cr). Fo è il ceppo di riferimento per il genoma: il suo DNA è stato utilizzato per ricavare l'attuale assemblaggio del genoma (PALATINI *et al.*, 2020). Fo è stato creato negli anni '80 da zanzare raccolte a Foshan (Cina). Il ceppo Ri, chiamato anche Fellini, è stato creato nel 2004 a partire da 500 uova raccolte in un ambiente urbano intorno alla città di Rimini (DRITSOU *et al.*, 2015). I ceppi Cr, Ta e LaR sono stati costituiti a partire da uova raccolte nell'estate-autunno del 2016 rispettivamente a Crema (Italia), Tapachula (Messico) e St. Pierre (Isola di La Reunion). I parametri di fitness di questi tre ceppi sono stati misurati nelle prime otto generazioni in laboratorio.

Le zanzare dei ceppi sopraindicati sono state allevate in parallelo a un'umidità relativa del 70-80%, a 28°C e con un fotoperiodo luce-buio di 12-12 ore. Le larve sono alimentate con un mangime per pesci finemente macinato (Tetramin, Tetra Werke, Germania). Per le femmine che

si nutrono di sangue viene utilizzato un apparato di alimentazione a membrana e sangue di montone disponibile in commercio. Non sono necessari permessi specifici per eseguire esperimenti di laboratorio sulle zanzare ai sensi della direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

Valutazione della fitness all'interno di ciascun ceppo

Sono stati quantificati i seguenti parametri: tempo di sviluppo da larva a pupa, vitalità larvale, apertura alare degli adulti, longevità degli adulti e fecondità (numero di uova deposte per femmina) e fertilità (percentuale di uova schiuse per femmina). Ogni parametro di fitness è stato analizzato contemporaneamente per tutti i ceppi seguendo procedure standard e costanti, per massimizzare la fiducia che le differenze nei tratti di fitness non derivino dalle condizioni ambientali o dalla manipolazione.

RISULTATI

Complessivamente, il tempo medio di sviluppo da larva a pupa è stato di 6,738 giorni \pm 0,793. Lo sviluppo delle zanzare Fo e Ri è stato generalmente ritardato di un giorno rispetto a quello delle zanzare dei tre ceppi di recente derivazione; le differenze sono risultate statisticamente significative tra le zanzare Fo e Cr ($H=4,48$, $p=0,0034$) e tra Ri e le zanzare Ta ($H=6,48$, $p=0,011$) e Cr ($H=7,406$, $p=0,0065$). La vitalità larvale era $> 0,9$ in tutti i ceppi e gli adulti emergenti mostravano una percentuale significativamente più alta di maschi o femmine nei ceppi Fo e Ta, rispettivamente (Tab. 1). L'apertura alare media era di $1,924 \pm 0,274$ mm per i maschi e di $2,441 \pm 0,254$ per le femmine. Le zanzare Fo e Ri hanno mostrato rispettivamente l'apertura alare più piccola e più grande tra tutti i ceppi analizzati. In tutti i ceppi, le femmine erano significativamente più grandi dei maschi (Tab. 1). Le differen-

Tabella 1 - Riepilogo dei parametri analizzati. Per ogni parametro si riporta la media con la loro relativa deviazione standard.

Parametri fitness	Ceppi di riferimento		Ceppi di recente colonizzazione		
	Foshan	Rimini	La Reunion	Tapachula	Crema
Fecondità (1)	4.26 \pm 14.06 (30,19-63)	31.04 \pm 9.33 (30,11-50)	38.73 \pm 17.53 (30, 1-81)	58.26 \pm 21.41 (30, 9-100)	56.93 \pm 24.33 (50, 7-115)
Fertilità (2)	38.51% (2-42)	38.55% (1-35)	29.17% (0-52)	29.40% (1-44)	31.49% (0-42)
sviluppo larva-pupae (giorni) (3)	7.15 \pm 0.34 (10)	7.08 \pm 0.17 (10)	6.96 \pm 0.23 (10)	6.19 \pm 0.24 (10)	6.29 \pm 0.79 (10)
Sopravvivenza larvale	0.976 \pm 0.020	0.928 \pm 0.037	0.928 \pm 0.042	0.958 \pm 0.037	0.948 \pm 0.010
Sopravvivenza Femmine (giorni)	52.98 \pm 2.67	55.24 \pm 2.57	50.56 \pm 2.43	46.62 \pm 2.65	38.16 \pm 3.08
Sopravvivenza maschi (giorni)	39.40 \pm 2.14	47.04 \pm 2.30	51.32 \pm 3.07	49.02 \pm 2.42	38.16 \pm 3.08
Dimensione ali femmine (mm)	2.074 \pm 0.066	2.784 \pm 0.084	2.542 \pm 0.070	2.294 \pm 0.109	2.512 \pm 0.075
Dimensione ali maschi (mm)	1.547 \pm 0.074	2.264 \pm 0.063	2.066 \pm 0.069	1.680 \pm 0.073	2.054 \pm 0.054

(1) Media +/- deviazione standard, in parentesi sono il numero di femmine usate, ed i numeri minimo e massimo di uova deposte.

(2) Media +/- deviazione standard, in parentesi i numeri minimo e massimo di larve schiuse.

(3) Numero di repliche utilizzato

ze nell'apertura alare erano statisticamente significative anche tra i ceppi, con l'eccezione delle zanzare dei ceppi LaR e Cr. In tutti i ceppi, le femmine hanno avuto una vita media più lunga (50,0996 giorni \pm 1,1356) rispetto ai maschi (45,0197 giorni \pm 1,2095). Le curve di sopravvivenza delle femmine hanno mostrato che la maggior parte delle zanzare ha iniziato a morire dopo 40 giorni, mentre le curve di sopravvivenza dei maschi hanno mostrato una mortalità più graduale nel tempo. Differenze significative tra i sessi sono state osservate nei due ceppi a lungo adattamento, Foshan e Rimini, e nel ceppo LaR. Le curve di sopravvivenza delle femmine del ceppo di Rimini erano statisticamente significative rispetto a quelle di tutti i ceppi di recente derivazione, con le femmine di Rimini che avevano un tempo medio di sopravvivenza più lungo. Il numero medio di uova deposto da femmina singola per ceppo è 46.13 ± 11.56 considerando globalmente i 5 ceppi. La media di uova deposte per femmina singola è più alta in Crema e Tapachula. Il ceppo Rimini invece presenta la media più bassa. Tuttavia, la percentuale di fertilità non è diversa tra i ceppi.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano che mentre alcuni parametri, come la sopravvivenza larvale e la fertilità, non differiscono tra i ceppi, altri parametri hanno mostrato differenze. Tali differenze non seguono un'unica tendenza, ma rivelano un quadro articolato che rispecchia la complessità biologica della fitness. I cinque ceppi studiati hanno un'origine geografica diversa e tempi diversi di colonizzazione. Per esempio, Foshan e Rimini sono ceppi di riferimento, da lungo tempo (>15 anni) adattati a condizioni di laboratorio, mentre Tapachula, Crema e La Reunion sono stati recentemente derivati da uova catturare in natura. L'analisi dei dati di fitness mostra che non c'è un ceppo che performa meglio di altri in tutti i parametri studiati, ma differenze significative sono distribuite in diversi parametri e ceppi. Da notare sono il tempo di sviluppo dallo stadio larvale a quello pupale, la longevità delle femmine e la fecondità. Anche se la differenza non è statisticamente significativa, il tempo di sviluppo dallo stadio larvale a quello pupale dei ceppi di riferimento è più lungo di circa un giorno rispetto a quello delle zanzare dei ceppi di recente colonizzazione. Statisticamente significativa risulta la differenza tra la sopravvivenza delle femmine nei ceppi di riferimento rispetto ai ceppi di recente colonizzazione (one-tailed t test=3,09 con $p<0.05$), con le femmine di Rimini e Foshan che vivono una media di 54,11 giorni rispetto ai 47,64 giorni delle femmine dei ceppi La Reunion, Tapachula e Crema. Verrebbe da speculare che queste differenze sono legate al tempo di colonizzazione in laboratorio. Le condizioni di laboratorio sono più controllate e meno ostili rispetto agli ambienti naturali. Altra differenza significativa riguarda il numero delle uova deposte da ciascuna femmina (fecondità) che è statisticamente diverso in comparazioni che riguardano due ceppi di recente colonizzazione (Crema e Tapachula) e sia Rimini sia La Reunion. I ceppi Crema e Tapachula

depongono un numero di uova statisticamente superiore a quello deposto dagli altri ceppi sopra citati, suggerendo che la capacità riproduttiva correla con la capacità invasiva di *Ae. albopictus*.

BIBLIOGRAFIA

- ARMBRUSTER P.A., 2016.- *Photoperiodic Diapause and the Establishment of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in North America.* - J. Med. Entomology, 53: 1013-1023.
- BENELLI G., MEHLHORN H., 2016- *Declining malaria, rising of Dengue and Zika virus; insights for mosquito control.* - Parasitol. Res., 115: 1474-1754.
- BONIZZONI M., GASPERI G., CHEN X., JAMES A.A., 2013 - *The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives.* - Trends Parasitol., 29:460-8.
- BONO J.M., MATZKIN L.M., CASTREZANA S., MARKOW T.A., 2008 - *Molecular evolution and population genetics of tw0 Drosophila mettleri cytochrome P450 genes involved in host plant utilization.* - Mol. Ecol. 17:3211-21.
- DRISSOU V., TOPALIS P., WINDBICHLER N., SIMONI A., HALL A., ET AL., 2015 - *A draft genome sequence of an invasive mosquito: an Italian Aedes albopictus.* - Pathog. Glob. Health., 109: 207-20.
- FONSECA N.A., MORALES-HOJAS R., REIS M., ROCHA H., VIEIRA C.P., NOLTE V., SCHLÖTTERER C., VIEIRA J., 2013 - *Drosophila americana as a model species for comparative studies on the molecular basis of phenotypic variation.* - Genome Biol. Evol., 5: 661-79.
- MACDONALD G., 1956 - *Theory of the eradication of malaria.* - Bull. World Health Organ., 15: 369-387.
- PALATINI U., MASRI R.A., COSME L.V., KOREN S., THIBAUD-NISSEN F., ET AL., 2020 - *Improved reference genome of the arboviral vector Aedes albopictus.* - Genome Biol., 21: 215.
- POOL J.E., AQUADRO C.F., 2007 - *The genetic basis of adaptive pigmentation variation in Drosophila melanogaster.* - Mol. Ecol., 16: 2844-2851.
- ROBERT M.A., LEGROS M., FACCHINELLI L., VALERIO L., RAMSEY J.M., SCOTT T.W., GOULD F., LLOYD A.L., 2012 - *Mathematical models as aids for design and development of experiments: the case of transgenic mosquitoes.* - J. Med. Entomol., 49: 1177-88.
- ROSSI B., BARRECA F., BENVENUTO D., BRACCIALARGHE N., CAMPOGIANI L., ET AL., 2023 - *Human Arboviral Infections in Italy: Past, Current, and Future Challenges.* - Viruses, 15: 368.
- SHAPIRO L.L.M., WHITEHEAD S.A., THOMAS M.B., 2017 - *Quantifying the effects of temperature on mosquito and parasite traits that determine the transmission potential of human malaria.* - Plos Biology, 15: e2003489.
- STERN D.L., ORGOGOZO V., 2008 - *The loci of evolution: how predictable is genetic evolution?* - Evolution, 62: 2155-77.

RICOSTRUZIONE ULTRASTRUTTURALE DELL'APPARATO PUNGITORE NELLE ZANZARE E MECCANISMI BIO-MOLECOLARI DEL PASTO EMATICO

GIOVANNI NARO ^a - GIUSEPPE RABBITO ^a - PAOLO GABRIELI ^{a*}

^aDipartimento di Bioscienze, via Celoria 26, Università degli studi di Milano, Milano

*Corresponding Author: paolo.gabrieli@unimi.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo". Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Ultrastructural reconstruction of the biting apparatus in mosquitoes and bio-molecular mechanisms of blood feeding

The evolutionary success of insects is due to their extraordinary morphological variability, with highly specialized mouthparts reflecting the dietary needs of each species. This diversity allows insects to occupy different ecological niches. In the case of mosquitoes, the proboscis plays a key role in the blood meal. During metamorphosis, larvae develop in water with chewing mouthparts, while adults have a biting-sucking proboscis to feed on nectar and blood. Mosquitoes can transmit pathogens during blood feeding, making the study of the morphology and function of the mouthparts crucial for the development of control strategies.

X-ray microcomputed tomography is a useful tool for studying the anatomy of the mouthparts of mosquitoes. This technique allows the visualization of the internal tissues and the three-dimensional reconstruction of the structures, providing detailed information on the development of the mouthparts.

To understand how the blood meal works, the knowledge of the structure of the proboscis is not sufficient, but we need to comprehend the role of the substances injected by the insect during the process. Mosquito saliva, a complex mixture of proteins, plays a crucial role in facilitating blood feeding. Biomolecular interactions during feeding include modulation of the host immune system and facilitation of blood vessel localization.

Specifically, a salivary protein called LIPS-2 from the tiger mosquito *Aedes albopictus* affects blood feeding behavior. Inhibition of this protein showed a slowdown in the skin perforation process, highlighting its role in enhancing the efficacy of the blood meal. The interaction of LIPS-2 with the labrum, a part of the mouthparts, morphologically modifies this structure. This modification is mediated by the interaction of LIPS-2 with a cuticular protein (Cp19).

Understanding the process of stylet development and the molecular interactions between salivary proteins and the cuticle can provide further insight into the biochemical and physiological mechanisms involved in mosquito blood feeding.

KEY WORDS: Mosquito, X-ray tomography, saliva, blood feeding

L'APPARATO BOCCALE DEGLI INSETTI VETTORI

L'eccezionale variabilità morfologica degli insetti rappresenta la chiave del loro straordinario successo evolutivo, che ha permesso loro di colonizzare e adattarsi a moltissimi ambienti e risorse alimentari. Tale diversità è particolarmente evidente negli apparati boccali, strutture altamente specializzate che riflettono le esigenze alimentari caratteristiche di ogni insetto. A titolo di esempio, gli insetti masticatori, come gli ortotteri, possiedono mandibole robuste adatte per cibarsi di materiale vegetale, mentre insetti pungenti e succhianti, come le zanzare, sviluppano durante la metamorfosi proboscidi lunghe e sottili per perforare tessuti e nutrirsi di liquidi. La diversità degli apparati boccali ha consentito loro di sfruttare nicchie ecologiche diverse, consentendo la coesistenza di numerose specie nello stesso ambiente (SCORTECCI, 1960).

Inoltre, all'interno della stessa specie, gli organismi

possono occupare habitat diversi durante il loro sviluppo, sfruttando conseguentemente risorse trofiche differenti. Questo fenomeno è particolarmente evidente negli insetti olometaboli. Per esempio, nei Lepidotteri, durante la fase larvale, l'insetto sfrutta l'apparato boccale masticatore per alimentarsi di materiale vegetale. Nell'età adulta, dopo la metamorfosi, l'insetto è in grado di volare nell'ambiente e si nutre di nettare mediante la spiritromba. Questa strategia evolutiva minimizza la competizione diretta tra gli individui della stessa specie, consentendo loro di sfruttare ambienti e risorse trofiche differenti durante le diverse fasi di sviluppo (SCORTECCI, 1960).

L'analisi dell'apparato boccale risulta quindi fondamentale nello studio della biologia degli insetti, soprattutto quando questi sono vettori di malattie. Ad esempio, insetti come le zanzare utilizzano il loro apparato boccale per nutrirsi di sangue, trasmettendo così patogeni e parassiti agli ospiti. Di conseguenza, la comprensione della morfologia e della funzione dell'apparato boccale di tali

insetti è anche essenziale per sviluppare strategie di controllo mirate e prevenire la diffusione di zoonosi (FOSTER e WALKER, 2019; MULLER e DURDEN, 2019).

CULICIDAE: PROBOSCID E RUOLO VETTORIALE

Appartenenti alla famiglia Culicidae, le zanzare costituiscono un ampio gruppo di insetti ematofagi che conta circa 3600 specie. Le zanzare sono insetti olometaboli, il che significa che la larva si sviluppa in adulto attraverso un processo di metamorfosi completa. Inoltre, nel caso di questi insetti, l'ambiente che viene occupato dalla larva è diverso da quello dell'adulto. La larva si sviluppa solitamente in acqua, alimentandosi di particolato di origine vegetale o animale grazie all'apparato boccale masticatore. L'adulto invece è glicifago, ossia si nutre di nettare e altri fluidi zuccherini mediante l'apparato boccale di tipo pungente-succhiante. La femmina di molte specie di zanzara effettua il pasto di sangue per permettere lo sviluppo delle uova. A questo proposito, l'apparato boccale delle femmine è generalmente più sviluppato di quello dei maschi (SCORTECCI, 1960; FOSTER e WALKER, 2019; MULLER e DURDEN, 2019).

L'apparato boccale pungente-succhiante delle zanzare adulte è rappresentato dalla proboscide. Questa è costituita dal labium che raccoglie sei stiletti, ovvero due mandibole, due mascelle, l'ipofaringe e il labrum. Gli stiletti sono costituiti da materiale cuticolare e per la maggior parte non contengono cellule. Durante la metamorfosi tutte le componenti devono essere sintetizzate nuovamente (CHAPMAN *et al.*, 2013). A differenza di altri insetti come gli afidi, il labium delle zanzare non viene inserito durante l'alimentazione, ma piuttosto, dato che all'estremità presenta due lobi ricchi di terminazioni sensoriali, viene piegato all'indietro e guida gli stiletti nella cute. Durante il pasto di sangue gli stiletti mascellari e mandibolari penetrano nella cute dell'ospite. Successivamente la saliva viene secreta attraverso l'ipofaringe, e, una volta create le condizioni necessarie, il sangue viene assorbito attraverso il canale alimentare presente all'interno del labrum (SCORTECCI, 1960; FOSTER e WALKER, 2019; MULLER e DURDEN, 2019).

Durante il pasto di sangue, diversi agenti infettivi possono essere trasmessi all'ospite attraverso la saliva, dando origine a zoonosi. Le zanzare sono in grado di trasmettere diversi arbovirus (come zika, chikungunya e dengue), nematodi (filarie) e protozoi (*Plasmodium*). Il successo dell'infezione dipende in gran parte dalla saliva, la cui azione, oltre a facilitare il pasto di sangue, crea le condizioni necessarie per favorire la trasmissione di patogeni e parassiti. Oltre alla loro notevole versatilità come vettori, le zanzare, essendo diffuse a livello globale, costituiscono il gruppo di insetti di maggiore rilevanza in ambito medico-sanitario (FOSTER e WALKER, 2019; MULLER e DURDEN, 2019).

STUDIARE L'ANATOMIA DELLA PROBOSCID CON LA MICROTOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA A RAGGI X

Le dimensioni dell'apparato boccale delle zanzare impongono l'utilizzo di strumenti per poter osservare

le strutture col dovuto ingrandimento e definizione. Per poter osservare lo sviluppo delle strutture all'interno del corpo dell'insetto, diventa utile utilizzare approcci differenti da tecniche classiche di microscopia. A questo proposito, l'utilizzo della microtomografia computerizzata a raggi X permette l'osservazione dei tessuti interni, fornendo dati per la successiva ricostruzione 3D delle strutture (HALL e MARTÍN-VEGA, 2019). Il principio di questa tecnica è la rilevazione dell'assorbimento differente che i diversi tessuti hanno per i raggi X. Il campione viene esposto alla radiazione e ne viene rilevato l'assorbimento con strumenti quali gli scintillatori, creando un'immagine bidimensionale. L'esposizione e la rilevazione ripetuta mentre il campione ruota, permette l'acquisizione di numerose immagini da angoli diversi, le quali possono essere utilizzate da opportuni software per ricostruire un'immagine tridimensionale (BAIRD e TAYLOR, 2017). Per ottenere immagini ad alta risoluzione, è possibile utilizzare la radiazione prodotta da un sincrotrone. Questa struttura accelera degli elettroni in modo da far emettere raggi X, i quali possono essere deviati e utilizzati da strumentazioni per la rilevazione tomografica. L'utilizzo della radiazione da sincrotrone ha i vantaggi di fornire un fascio monocromatico, grazie a opportuni filtri, parallelo e ad alta intensità. Queste caratteristiche permettono di ottenere tomografie ad alta definizione (MIZUTANI e SUZUKI, 2012).

L'utilizzo della microtomografia a raggi X si è dimostrata in diversi casi utile per lo studio del funzionamento dell'apparato boccale delle zanzare. Uno studio del 2012, per esempio, ha permesso di visualizzare tridimensionalmente il sistema di muscoli che permettono l'aspirazione del sangue in *Aedes togoi* (Theobald, 1907). È stato possibile visualizzarne la disposizione nel capo e la capacità volumetrica delle camere di pompaggio del sangue (KIM *et al.*, 2012). Con lo stesso approccio è stata studiata la differenza di queste strutture tra le specie *Ae. togoi* e *Anopheles sinensis* (Wiedemann, 1828), evidenziando differenze morfologiche importanti tra queste due specie (HA *et al.*, 2015).

La sostituzione dell'apparato boccale nelle zanzare avviene a ogni muta, ma in particolare tra il passaggio da larva ad adulto si assiste a un cambiamento completo della tipologia di apparato. Questa trasformazione avviene grazie alla presenza di cellule in grado di secernere e modellare le nuove strutture in ogni processo dello sviluppo. La microtomografia a raggi X offre l'opportunità di seguire le fasi dello sviluppo dell'apparato boccale. La sintesi delle nuove strutture avviene tra una muta e l'altra al di sotto della cuticola, per cui l'utilizzo della tomografia permette di osservarne la loro disposizione spaziale senza danneggiare i campioni. L'osservazione a diversi di campioni presi a tempi successivi permette di seguire lo sviluppo delle strutture e comprenderne la genesi (WIPFLER *et al.*, 2016).

Con questi presupposti, è stato svolto uno studio sulla struttura della proboscide della zanzara tigre (*Aedes albopictus*, Skuse 1894) (Fig. 1). Si è osservato lo sviluppo della proboscide durante lo stadio di pupa. In questa fase,

l'insetto non si alimenta e non ha un apparato boccale funzionante, ma presenta le componenti della proboscide in via di formazione, localizzate ventralmente sul cefalotorace (BECKER *et al.*, 2020). La microtomografia a raggi X è stata eseguita allo SLS Synchrotron Radiation Facility del Paul Scherrer Institute (Villingen PSI, Svizzera), utilizzando la *beamline* TOMCAT, specializzata in questo tipo di analisi. Sono state analizzate pupe a diverse ore dalla metamorfosi, in particolare dopo 0, 1, 2, 3, 4, 5,

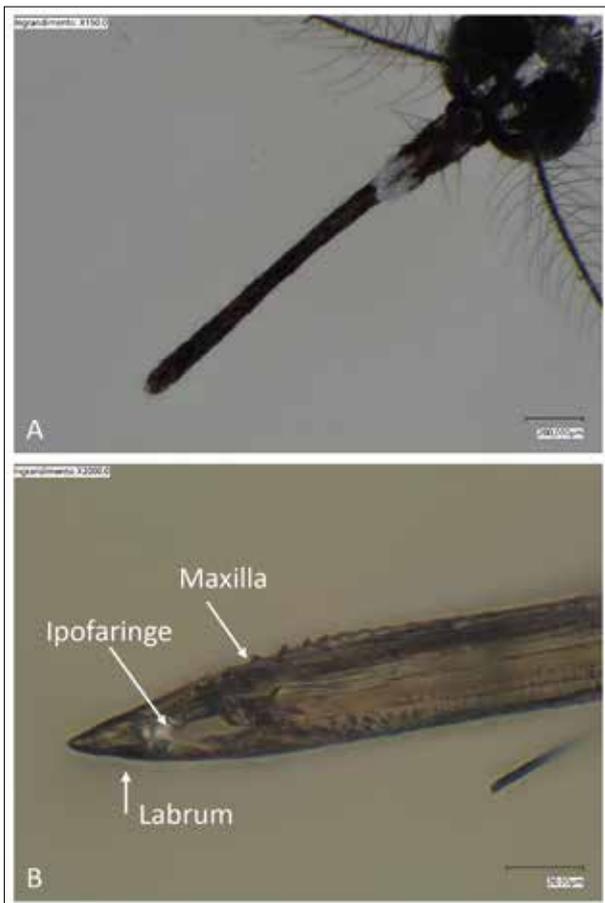


Fig. 1 - La proboscide di *Aedes albopictus* (immagini da microscopio digitale Keyence VHX-7000, Osaka, Japan).

- A. Testa e proboscide di *Ae. albopictus*. Lo stiletto è nascosto dal labium, la struttura che termina con due labella dalla funzione tattile e chemorecettiva.
- B. Stiletto di *Ae. albopictus* dopo la rimozione della proboscide. Si può notare il labrum, che forma il canale alimentare, le strutture seghettate delle maxillae e la punta dell'ipofaringe che porta il canale salivare. Le mandibole non sono visibili in questa immagine in quanto coperte dalle maxillae e dall'ipofaringe. Si noti che lo stiletto viene visualizzato dalla sua porzione ventrale.

6, 7, 8, 20, 30, 40 e 47 ore, in modo da seguirne completamente lo sviluppo. Si è potuto osservare che lo sviluppo delle componenti boccali adulte inizia durante lo stadio L4, in prossimità della muta a pupa. Le strutture germinali sono infatti già presenti e involuti nella testa della larva, per poi estrudersi durante lo sviluppo pupale. Tramite la tomografia, è possibile riconoscere già nella larva

le strutture che daranno origine alle strutture del labium e del labrum. Il primo si localizza sotto la placca del mento, mentre il secondo si origina sotto la cuticola della parete anteriore dorsale. Le gemme delle mascelle e delle mandibole prendono forma dall'epidermide alla base delle strutture larvali. L'ipofaringe, invece, non è stata osservata all'inizio dello sviluppo della pupa, ma inizia a modellarsi dopo 20 ore, probabilmente a partire dal labium. Le osservazioni in tomografia hanno permesso di evidenziare la formazione di sacche cuticolari che servono da *scaffold* per la sintesi degli stiletti. Questi *scaffold* vengono rivestiti da un monostrato di cellule epiteliali nelle prime 5 ore dalla formazione della pupa. Successivamente, lo strato di cellule si restringe, originando una struttura tubolare chitinosa, ben distinguibile entro le 7 ore. Da questa struttura si origineranno le appendici dell'apparato boccale, con il collasso e appiattimento della struttura tubolare, a 20 ore per mandibole e mascelle e a 40 ore per labium e labrum. Lo sviluppo dei palpi mascellari segue lo stesso processo, in sacche cuticolari separati, assumendo la forma definitiva entro 20 ore. Alla conclusione del processo le cellule che hanno sintetizzato gli stiletti regrediscono fino a scomparire, con la sola permanenza dei neuroni lungo il labrum, i quali hanno funzione sensoriale. L'osservazione in tomografia dello sviluppo della proboscide ha permesso di confermare l'origine delle regioni germinali dei componenti degli stiletti, evidenziando inoltre come le cellule interagiscano con la cuticola, sintetizzando i nuovi elementi, per poi scomparire.

RUOLO DELLA SALIVA NEL PASTO DI SANGUE DELLE ZANZARE

Per comprendere il funzionamento del pasto del sangue non basta conoscere la struttura della proboscide, ma anche le sostanze iniettate dall'insetto durante il processo. La saliva delle zanzare è una miscela complessa di proteine che consente loro di effettuare il pasto di sangue su ospiti vertebrati. Le proteine salivari consentono alla zanzara di contrastare diversi processi fisiologici dell'ospite, come la vasocostrizione e l'emostasi. Nonostante si possano riconoscere proteine dalla funzione comune, la composizione molecolare della saliva varia tra le diverse specie di zanzara (GUERRERO *et al.*, 2020). Inoltre, l'espressione dei geni coinvolti nella produzione di queste proteine è spesso associata al raggiungimento della maturità sessuale dell'organismo, come dimostrato in *Aedes aegypti* (KING *et al.*, 2011).

La presenza delle ghiandole salivari si è dimostrata cruciale nel ridurre il tempo che le zanzare impiegano nel perforare la cute dell'ospite e nell'inserire gli stiletti (*intra*dermal *probing*), rispetto agli organismi a cui sono state rimosse (YAMAMOTO *et al.*, 2016). Inoltre, è stato dimostrato che l'azione anticoagulante e immunomodulatoria della saliva favorisca indirettamente la rilevazione dei vasi sanguigni al di sotto della pelle. A titolo di esempio, l'apirasi presente nella saliva idrolizza ATP e ADP. L'ATP normalmente induce vasocostrizione e aggregazione delle piastrine. Pertanto l'apirasi non solo

impedisce la coagulazione agevolando la localizzazione dei capillari, ma suggerisce anche la possibilità che la saliva favorisca la formazione di ematomi attorno ai vasi sanguigni. Tale processo potrebbe agevolare la localizzazione dei vasi, poiché la formazione di un ematoma nel tessuto sondato aumenterebbe al suo interno il volume di sangue, rendendo quest'ultimo più facile da individuare (RIBERIO *et al.*, 1984). Oltre a ciò, la risposta allergica a specifici allergeni presenti nella saliva potrebbe stimolare la degranolazione dei mastociti che risiedono nella cute dell'ospite, provocando vasodilatazione (CONWAY *et al.*, 2021). D'altro canto, alcune proteine salivari potrebbero interagire direttamente con l'apparato boccale della zanzara, rendendo più efficace l'individuazione dei vasi sanguigni (ARNOLDI *et al.*, 2022).

Come già accennato in precedenza, nel momento in cui la saliva delle zanzare modula il sistema immunitario dell'ospite per facilitare l'assorbimento di sangue, promuove allo stesso tempo la replicazione e la trasmissione di patogeni e parassiti. Pertanto, una migliore comprensione della composizione della saliva e delle interazioni molecolari che si verificano durante il pasto di sangue non solo arricchirebbe le nostre conoscenze riguardo la biologia dell'insetto, ma potrebbe fornire informazioni cruciali sulla competenza vettoriale e per la progettazione di strategie di controllo efficaci per questo vettore (ARNOLDI *et al.*, 2022).

INTERAZIONI BIOMOLECOLARI NEL PASTO DI SANGUE

L'osservazione del ruolo della saliva nel successo del pasto di sangue della femmina di zanzara ha portato a interrogarsi se fosse possibile individuare dei fattori, presenti nella saliva, che abbiano un effetto diretto sulla zanzara e che modulino il comportamento durante il pasto ematico (ARNOLDI *et al.*, 2022). La zanzara modello utilizzata è stata *Ae. albopictus*. Grazie a precedenti analisi di trascrittomiche, è stato possibile individuare delle proteine candidate tra quelle espresse dalle ghiandole salivari (ARCA *et al.*, 2007). Cercando una proteina che corrispondesse a criteri quali l'espressione durante la maturità sessuale, la somiglianza con proteine individuate in *Aedes aegypti*, l'esclusione di fattori già noti per il ruolo nella coagulazione del sangue, lo studio ha trovato un buon candidato in una proteina del gruppo 34-k, presente solo nella sottofamiglia dei Culicinae. La proteina è stata denominata quindi LIPS-2, *Labrum Interaction Protein of the Saliva-2*.

Per verificare l'effettivo coinvolgimento di LIPS-2 durante il pasto di sangue, sono stati eseguiti esperimenti volti a verificare il comportamento delle zanzare in assenza della sua espressione. Usando la tecnica del RNA *interference*, è stato iniettato in femmine adulte RNA sintetico, generando zanzare knock-down per LIPS-2. Queste zanzare impiegano più tempo nell'attuare l'*intra-dermal probing* rispetto al controllo, mentre non si ha un aumento del tempo utilizzato per ingerire sangue. Applicando LIPS-2 ricombinante alla proboscide di femmine non trattate, si osserva che l'apparato boccale attua dei

movimenti tipici dell'*intra-dermal probing*, in particolare muovendo il labrum e le mascelle e aumentando la salivazione. Appare evidente come LIPS-2 abbia un ruolo nel controllare la fase iniziale del pasto di sangue.

Una volta chiarito l'effetto di LIPS-2 sull'efficacia del pasto di sangue, si è cercato di capire il meccanismo di interazione con gli stiletti. Per fare ciò, è stato eseguito un esperimento di interazione con LIPS-2 ricombinante legata a GFP, per visualizzare eventuali siti di legame con elementi della proboscide. Si è così notato che LIPS-2 interagisce a livello della estremità del labrum. Inoltre, la struttura del labrum subisce delle modificazioni morfologiche interagendo con la proteina: le "creste a V" presenti sulla punta del labrum aumentano di profondità se trattate con LIPS-2. Il labrum, dunque, non è semplicemente un pezzo rigido cuticolare, ma è in grado di modificarsi interagendo con la saliva durante il pasto di sangue. Nel labrum sono presenti inoltre cellule nervose sensoriali, che potrebbero percepire LPS-2 e attivare i comportamenti e i cambiamenti osservati.

Per comprendere appieno il meccanismo di azione di LIPS-2, si è cercato di individuare l'eventuale recettore presente sulla cuticola, in grado di interagire con la proteina salivare. Si è individuata una proteina cuticolare, Cp19, localizzata sulla punta del labrum, in corrispondenza dei siti dove è localizzata LIPS-2. Studiando l'espressione di Cp19 durante lo sviluppo, si nota come essa raggiunge un picco intorno alle 24 ore dalla metamorfosi in pupa, per poi scomparire. L'espressione corrisponderebbe quindi al periodo in cui si sviluppano gli stiletti.

Comprendere il processo di sviluppo degli stiletti può aiutare quindi a comprendere i processi biochimici che accadono durante il pasto di sangue delle zanzare.

RIASSUNTO

Il successo evolutivo degli insetti è attribuibile alla loro straordinaria variabilità morfologica, con gli apparati boccali altamente specializzati che riflettono le esigenze alimentari di ciascuna specie. Questa diversità consente agli insetti di occupare diverse nicchie ecologiche. Nel caso delle zanzare la proboscide svolge un ruolo chiave nel pasto di sangue. Durante la metamorfosi, le larve si sviluppano in acqua con un apparato boccale masticatore, mentre gli adulti hanno una proboscide pungente-succhiante per nutrirsi di nettare e sangue. Le zanzare possono trasmettere patogeni durante il pasto di sangue, rendendo cruciale lo studio della morfologia e della funzione dell'apparato boccale per lo sviluppo di strategie di controllo.

La microtomografia computerizzata a raggi X è uno strumento utile per studiare l'anatomia dell'apparato boccale delle zanzare. Questa tecnica consente la visualizzazione dei tessuti interni e la ricostruzione tridimensionale delle strutture, fornendo informazioni dettagliate sullo sviluppo dell'apparato boccale.

Per comprendere il funzionamento del pasto del sangue non basta conoscere la struttura della proboscide, ma anche le sostanze iniettate dall'insetto durante il

processo. La saliva delle zanzare, una miscela complessa di proteine, svolge un ruolo cruciale nel facilitare il pasto di sangue. Le interazioni biomolecolari durante il pasto includono la modulazione del sistema immunitario dell'ospite e la facilitazione della localizzazione dei vasi sanguigni.

In modo specifico, una proteina salivare chiamata LIPS-2 della zanzara tigre *Aedes albopictus* influisce sul comportamento durante il pasto di sangue. L'inibizione di questa proteina ha mostrato un rallentamento nel processo di perforazione della cute, evidenziando il suo ruolo nell'efficacia del pasto di sangue. L'interazione di LIPS-2 con il labrum, una parte dell'apparato boccale, modifica morfologicamente questa struttura. Questa modificazione è mediata dall'interazione di LIPS-2 con una proteina cuticolare (Cp19).

Comprendere il processo di sviluppo degli stilette e le interazioni molecolari tra proteine salivari e cuticola può fornire ulteriori informazioni sui meccanismi biochimici e fisiologici coinvolti nel pasto di sangue delle zanzare.

BIBLIOGRAFIA

- ARCÀ B., LOMBARDO F., FRANCISCETTI I.M.B., PHAM V.M., MESTRES-SIMON M., ANDERSEN J.F., RIBEIRO J.M.C., 2007 - *An insight into the sialome of the adult female mosquito Aedes albopictus*. - *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 107–127. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.10.007>
- ARNOLDI I., MANCINI G., FUMAGALLI M., GASTALDI D., D'ANDREA L., BANDI C., DI VENERE M., IADAROLA P., FORNERIS F., GABRIELI P., 2022 - *A salivary factor binds a cuticular protein and modulates biting by inducing morphological changes in the mosquito labrum*. - *Current Biology*, 32: 3493-3504.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.06.049>
- BAIRD E., TAYLO G., 2017 - *X-ray micro computed-tomography*. - *Current Biology*, 27: R289–R291. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.066>
- BECKER N., PETRIĆ D., ZGOMBA M., BOASE C., MADON M.B., DAHL C., KAISER A., 2020 - *Mosquitoes: Identification, Ecology and Control, Fascinating Life Sciences*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11623-1>
- CHAPMAN R.F., SIMPSON S.J., DOUGLAS A.E., 2013 - *The insects: structure and function*, Fifth edition. ed. Cambridge University Press, New York.
- CONWAY M.J., 2021 - *Type I hypersensitivity promotes Aedes aegypti blood feeding*. - *Sci. Rep.*, 11: 14891. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94416-w>
- FOSTER A.W., WALKER D.E., 2019 - *Mosquitoes (Culicidae)*. 15:261-325; in: *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* a cura di Muller G.R. e Durden L.A. Editore: Academic Press, Elsevier
- GUERRERO D., CANTAERT T., MISSE D., 2020 - *Aedes mosquito salivary components and their effect on the immune response to arboviruses*. - *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10: 407. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00407>
- HA Y.-R., LEE S.-C., SEO S.-J., RYU J., LEE D.-K., LEE S.-J., 2015 - *Comparison of the functional features of the pump organs of Anopheles sinensis and Aedes togoi*. - *Sci. Rep.*, 5: 15148. <https://doi.org/10.1038/srep15148>
- HALL M.J.R., MARTÍN-VEGA D., 2019 - *Visualization of insect metamorphosis*. - *Phil. Trans. R. Soc. B*, 374: 20190071. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0071>
- KIM B.H., SEO E.S., LIM J.H., LEE S.J., 2012 - *Synchrotron X-ray microscopic computed tomography of the pump system of a female mosquito*. - *Microscopy Res & Technique*, 75: 1051–1058. <https://doi.org/10.1002/jemt.22030>
- KING J.G., VERNICK K.D., HILLYER J.F., 2011 - *Members of the salivary gland surface protein (SGS) family are major immunogenic components of mosquito saliva*. - *J. Biol. Chem.*, 286: 40824–40834. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280552>
- MIZUTANI R., SUZUKI Y., 2012 - *X-ray microtomography in biology*. - *Micron*, 43: 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.10.002>
- MULLER G., DURDEN L., 2019 - *Flies (Diptera)*, 11:171-190. In: *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* a cura di Mullen G.R. e Durden L.A. Editore: Academic Press, Elsevier
- RIBEIRO J.M.C., ROSSIGNOL P.A., SPIELMAN A., 1984 - *Role of Mosquito Saliva in Blood Vessel Location*. - *Journal of Experimental Biology*, 108(1):1-7. <https://doi.org/10.1242/jeb.108.1.1>
- SCORTECCI G., 1960 - *Insetti. Come sono. Dove vivono. Come vivono*. Editore: labor
- WIPFLER B., POHL H., YAVORSKAYA M.I., BEUTEL R.G., 2016 - *A review of methods for analysing insect structures — the role of morphology in the age of phylogenomics*. - *Current Opinion in Insect Science*, 18: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.09.004>
- YAMAMOTO D.S., SUMITANI M., KASASHIMA K., SEZUTSU H., MATSUOKA H., 2016 - *Inhibition of malaria infection in transgenic anopheline mosquitoes lacking salivary gland cells*. - *PLoS Pathog.*, 12: e1005872. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005872>

LA DETERMINAZIONE DEL SESSO IN NEMATOCERI VETTORI: STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE DI STUDIO

MARIANNA VARONE ^a - FRANCESCA LUCIBELLI ^a - PAOLA DI LILLO ^a - MARCO SALVEMINI ^{a,*}

^aDipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II

*Corresponding Author: marco.salvemini@unina.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo" - Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Sex determination in Nematoceran vector species: state of the art and study perspectives

The insect sex determination pathway is governed by a regulatory cascade activated by primary signals, mainly of genetic nature, which are extremely variable among species. This genetic pathway in Nematoceran Diptera, although still poorly characterized, exhibits conservation of genes at the bottom of the regulatory cascade, but substantial differences in the upstream primary signals. The study of sex determination in these insects can be useful for the development and application of innovative control strategies, representing valid tools to combat vector species uncontrolled spread, which poses a serious risk to public health.

KEY WORDS: Sex determination, mosquitoes, sandflies, vector control

INTRODUZIONE

Gli insetti come vettori di malattie

Nella complessa interazione tra uomo, animali e ambiente, gli artropodi ricoprono un ruolo significativo nella trasmissione di patogeni che possono influenzare la salute umana e animale. Numerose specie appartenenti al Phylum Arthropoda manifestano la capacità di fungere da veicolo per agenti patogeni quali parassiti, virus o batteri. Nell'ambito di tale interazione, quando un organismo agevola attivamente la trasmissione di agenti patogeni da un ospite a un altro, si colloca nella categoria di "vettore". Gli artropodi vettori svolgono un ruolo cruciale nella trasmissione di malattie a umani e animali, mediante meccanismi come il trasferimento meccanico di patogeni e la trasmissione biologica durante il pasto di sangue. L'aumento del rischio di trasmissione è correlato alla continua espansione geografica degli artropodi vettori (PERVEEN *et al.*, 2023). La maggior parte delle specie di vettori artropodi appartiene alla classe degli Insetti, ordine dei Ditteri. Tra queste fatta eccezione per le mosche ematofaghe delle famiglie Glossinidae del genere *Glossina* e quelle delle famiglie Tabanidae, entrambe appartenenti al sottordine Brachycera, la maggior parte delle specie di interesse sanitario appartiene al sottordine Nematocera che annovera zanzare, flebotomi, ceratopogonidi ematofagi e simuliidi.

Le zanzare, appartenenti alla famiglia delle Culicidae, sono considerate i più importanti tra i ditteri ematofagi, responsabili di causare centinaia di migliaia di morti in tutto il mondo ogni anno (McCARTHY, 2014). Gli adulti di entrambi i sessi si alimentano con fluidi zuccherini di origine vegetale; tuttavia, le zanzare di sesso femminile compiono un pasto di sangue, atto attraverso il quale possono veicolare svariati tipi di virus (PAUPY *et al.*, 2009).

Tra le zanzare, i principali generi associati alla trasmissione di malattie includono *Anopheles*, responsabili della trasmissione del parassita *Plasmodium*, agente eziologico della malaria umana; *Aedes*, vettore di malattie virali quali il *flavivirus* della febbre gialla, il virus della dengue, il virus zika e l'*alphavirus*; e *Culex*, principalmente coinvolto nella trasmissione del virus *West Nile*.

I flebotomi o pappataci, appartenenti alla famiglia dei Psychodidae, sono ditteri ectoparassiti ematofagi di rilevante interesse sanitario. Agiscono come vettori di agenti patogeni, tra cui i protozoi del genere *Leishmania*, i batteri del genere *Bartonella* e differenti *Arbovirus* (MAROLI *et al.*, 2013). Le femmine, necessitando di un pasto di sangue per la maturazione delle uova, si nutrono di una vasta gamma di mammiferi, compreso l'uomo.

I Culicoidi, appartenenti alla famiglia Ceratopogonidae, sono un gruppo di insetti ematofagi noti comunemente come moscerini pungenti. La loro importanza è derivata dalla loro capacità di agire come vettori di oltre 50 *Arbovirus* e di vari agenti patogeni, tra cui protozoi e vermi filariali. In particolare, un significativo patogeno virale trasmesso biologicamente dai Culicoidi è il virus *Oropouche* (OROV), responsabile di una malattia febbrile nell'uomo (MELLOR *et al.*, 2000).

I simuliidi, appartenenti alla famiglia Simuliidae, sono comunemente conosciuti come moscerini neri e costituiscono una famiglia di ditteri ematofagi, responsabili della trasmissione a uccelli e mammiferi di patogeni tra cui il nematode *Onchocerca volvulus* agente eziologico dell'oncocercosi o cecità fluviale (ADLER *et al.*, 2019).

Meccanismi di determinazione del sesso negli insetti

La determinazione del sesso negli insetti suscita curiosità e ispira la ricerca, essendo uno dei primi meccanismi

differenziativi nello sviluppo individuale, influenzando morfologia, fisiologia e comportamento sessuale. Si utilizza il termine “determinazione del sesso” per indicare le istruzioni iniziali che consentono all’embrione di differenziarsi in senso maschile o femminile. I geni alla base di questo programma presentano un’interazione strutturata in modo gerarchico a “cascata” (SÁNCHEZ, 2008).

tutto lo sviluppo; 2) il pre-mRNA del gene *transformer* (*tra*), determinandone uno *splicing* femmina-specifico che porta alla traduzione di una proteina TRA funzionale solo in femmine. La proteina TRA funzionale, insieme al prodotto del gene autosomico *transformer-2* (*tra-2*, espresso in entrambi i sessi), forma un complesso che dirige lo *splicing* femmina-specifico dei geni *dsx* e *fru*. Le

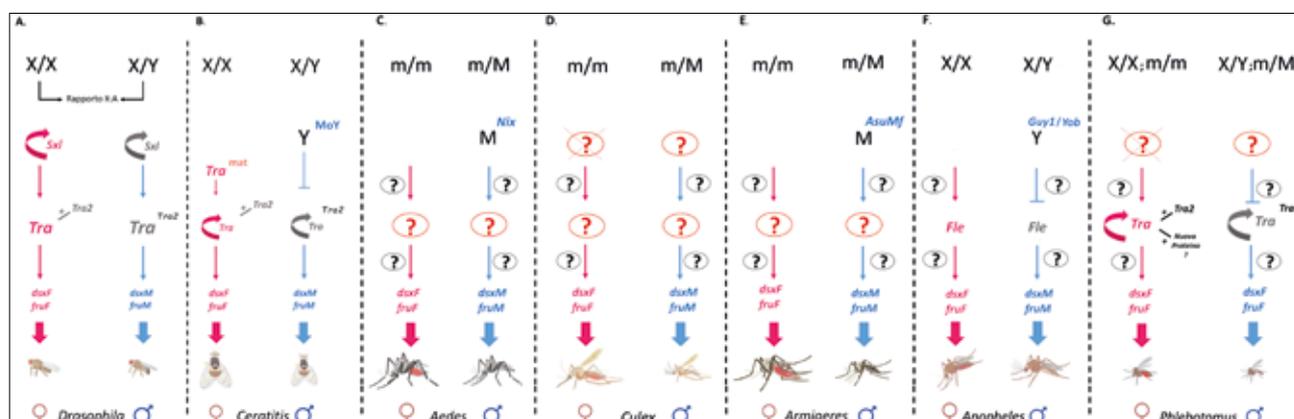


Fig. 1 - Analisi comparativa dei meccanismi di determinazione del sesso. A) *D. melanogaster*; B) *C. capitata*; C) Genere *Aedes*; D) Genere *Culex*; E) Genere *Armigeres*; F) Genere *Anopheles*; G) Genere *Phlebotomus*.

I componenti chiave della cascata di determinazione del sesso sono: un segnale primario, un prodotto materno, un gene chiave e uno o più geni terminali in grado di attuare un doppio *switch*. In questo modello conservato il segnale primario e i geni chiave evolvono rapidamente e risultano diversificati nelle varie famiglie di insetti, mentre i geni terminali sono altamente conservati (GRAHAM *et al.*, 2003). In particolare, il segnale primario può essere classificato in tre categorie: 1) zigotico, 2) materno o 3) ambientale. Questo segnale attiva una cascata di eventi molecolari che portano tutti a uno stesso *output* estremamente conservato: lo *splicing* sesso-specifico dei geni *doublesex* (*dsx*) e *fruitless* (*fru*), geni caratterizzati dal doppio *switch*. Essi codificano per fattori di trascrizione responsabili di attivare il corretto programma di sviluppo sessuale dell’individuo (SÁNCHEZ, 2008).

Nella specie modello *Drosophila melanogaster* sono presenti due cromosomi sessuali XY eteromorfici nei maschi e due copie del cromosoma X nelle femmine. Il segnale primario per la determinazione del sesso in tale specie è costituito dal rapporto tra il numero dei cromosomi X e gli assetti autosomi (A). Quando il rapporto X:A=1 si ottiene sviluppo femminile, quando X:A=0.5 si determina sviluppo maschile. La duplice copia del cromosoma X garantisce il funzionamento di fattori trascrizionali X-linked Signaling Elements (XSE) che attivano la trascrizione del gene, definito *master regulator*, *Sex-lethal* (*Sxl*) dal suo promotore zigotico. La proteina funzionale SXL è un fattore di *splicing* contenente due domini del tipo RRM (RNA Recognition Motif), in grado di riconoscere e regolare due bersagli chiave: 1) il pre-mRNA tardivo di *Sxl* stesso, determinando l’espressione di una proteina SXL tardiva funzionale e femmina-specifica, che continua a mantenere il *feedback* positivo durante

proteine TRA/TRA-2 riconoscono sui pre-mRNA di tali geni ripetizioni di una sequenza regolativa, detta “TRA/TRA-2 binding site”, guidando lo *splicing* femmina-specifico dei pre-mRNA dei geni *dsx^F* e *fru^F*. In embrioni XY, l’assenza della proteina funzionale SXL determina la mancata maturazione della proteina TRA funzionale e la conseguente assenza del complesso TRA/TRA-2, generando le isoforme maschio-specifiche *dsx^M* e *fru^M* (CLOUGH *et al.*, 2014) (Fig. 1A).

L’analisi della determinazione del sesso in numerose specie di ditteri e in altre specie di insetti appartenenti a differenti ordini ha evidenziato una conservazione solo parziale della cascata di determinazione del sesso osservata in *Drosophila*. In molte specie di mosche *non-Drosophilidae*, il segnale primario della determinazione del sesso è costituito da un fattore M dominante presente sul cromosoma Y. È questo il caso della mosca *Ceratitis capitata*, appartenente alla famiglia Tephritidae, per la quale il fattore M responsabile della mascolinizzazione è costituito dal locus Y-linked *Male-on-the-Y* (*MoY*) (MECCARIELLO *et al.*, 2019). In tale specie il gene chiave per lo sviluppo femminile non è più *Sxl*, come in *Drosophila*, ma il gene *transformer*, che assume un ruolo fondamentale nel *pathway*. In *C. capitata* il gene *tra* è in grado di attivare un meccanismo di auto-regolazione positiva, in maniera analoga a quanto osservato per *Sxl* in *Drosophila*, che consente il mantenimento del *pathway* in senso femminile.

Negli embrioni XX, il trascritto materno del gene *tra* codifica una proteina TRA materna che, interagendo con la proteina TRA-2, permette lo *splicing* femmina-specifico dei pre-mRNA zigotici di *tra* riconoscendo copie multiple della sequenza TRA/TRA-2 binding site sul pre-mRNA di *tra*. Di conseguenza, viene sintetizzata la proteina

TRA zigotica che induce uno *splicing* in senso femminile del trascritto *tra* stesso, innescando un loop autoregolativo positivo. A valle, la formazione del complesso TRA/TRA-2, determina lo *splicing* femmina-specifico dei geni *dsx* e *fru* riconoscendo le TRA/TRA-2 *binding site* presenti su tali geni. In embrioni XY, la proteina MOY inibisce il legame del complesso TRA/TRA-2 con i siti di *binding* sul pre-mRNA zigotico di *tra*, con un meccanismo ancora non noto, determinando uno *splicing* maschio-specifico che genera un trascritto codificante per una proteina TRA tronca e inattiva. La mancanza del complesso TRA/TRA-2 in embrioni di sesso maschile induce lo *splicing* predefinito in senso maschile dei trascritti dei geni a valle *dsx* e *fru* (PANE *et al.*, 2002; SALVEMINI *et al.*, 2009) (Fig. 1B).

Lo studio della determinazione del sesso in numerose altre specie di Ditteri appartenenti ai generi *Bactrocera*, *Musca*, *Glossina*, ma anche in altre specie appartenenti a ordini diversi quali Imenotteri (*Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*) e Coleotteri (*Tribolium castaneum*) ha permesso di evidenziare una sostanziale conservazione del modulo regolativo scoperto in *C. capitata* costituito da *tra* → *dsx+fru*, con un gene *tra* in grado di rispondere al segnale primario e di mantenere memoria del corretto stato di attivazione nei due sessi (LAGOS *et al.*, 2007; BURGHARDT *et al.*, 2005; HEDIGER *et al.*, 2010; GEMPE *et al.*, 2009; GEUVERINK *et al.*, 2017; SHUKLA *et al.*, 2012).

DETERMINAZIONE DEL SESSO IN INSETTI NEMATOCERI VETTORI

Famiglia Culicidae - sottofamiglia Culicinae

La sottofamiglia Culicinae comprende insetti comunemente noti come zanzare che includono i generi *Aedes*, *Armigeres* e *Culex*. Il cariotipo di tali specie non mostra cromosomi sessuali, ma presenta cromosomi omomorfici sessuali indistinguibili citologicamente, considerati una forma ancestrale dei cromosomi sessuali delle zanzare (TOUPS e HAHN, 2010).

Nel genere *Aedes*, nelle specie *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, è stato identificato un segnale primario per la determinazione del sesso maschile, noto come *Nix* (HALL *et al.*, 2015; GOMULSKI *et al.*, 2018). La proteina NIX è una RNA-binding protein, caratterizzata da tre motivi di legame all'RNA del tipo RMM. L'inattivazione di *Nix* porta alla femminizzazione dei maschi, con lo sviluppo di caratteristiche morfologiche femminili e inducendone lo *splicing* femmina-specifico dei geni a valle *dsx* e *fru*. Questi risultati dimostrano che il gene *Nix* è sia necessario che sufficiente per avviare il processo di differenziazione maschile sia in *Ae. aegypti* che in *Ae. albopictus* (ARYAN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020) (Fig. 1C).

Recentemente è stato identificato un ulteriore fattore M nella zanzara della specie *Armigeres subalbatus* (LIU *et al.*, 2023), il gene *AsuMf*, codificante per una proteina con domini RMM ma differente rispetto alle proteine NIX. La presenza anche nel genere *Culex* di un fattore M (GILCHRIST e HALDANE, 1947) suggerisce la conservazione di un segnale primario, ancora non identificato, in grado di indurre la differenziazione del sesso maschile

nelle zanzare Culicinae e la cui eliminazione determina la variazione nello *splicing* sesso-specifico dei geni *dsx* e *fru* (Fig. 1C-D-E).

Gli interruttori finali della cascata di determinazione del sesso delle zanzare Culicinae sono *dsx* e *fru*. Essi conservano, come nella maggior parte dei ditteri, una regolazione sesso-specifica con conseguente presenza di trascritti femminili e maschili.

In generale, negli insetti olometaboli la regolazione dello *splicing* femmina-specifico dei geni *dsx* e *fru* è mediata dal complesso TRA/TRA-2, che risulta piuttosto conservato (BOPP *et al.*, 2014). Tuttavia, un gene codificante per la proteina TRA non è stato ancora identificato in nessuna specie di zanzara, sebbene siano stati rilevati potenziali TRA/TRA-2 *binding site* nei geni *dsx* e *fru* di *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*, analoghi a quelli presenti in *Drosophila* ma con una ridotta conservazione di sequenza, indicando un possibile coinvolgimento di fattori TRA-2 e TRA-like in tali specie (PRICE *et al.*, 2015; SALVEMINI *et al.*, 2013; SCALI *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2020; SALVEMINI *et al.*, 201; LIU *et al.*, 2023).

Famiglia Culicidae - sottofamiglia Anofelinae

La sottofamiglia delle Anofelinae include le zanzare del genere *Anopheles* che presentano cariotipo caratterizzato dalla presenza di cromosomi sessuali, XX nelle femmine e X e Y nei maschi (FRACCARO *et al.*, 1977).

Nelle specie *An. stephensi* e *An. gambiae* sul cromosoma Y sono presenti due diversi geni che costituiscono il segnale primario di determinazione del sesso maschile: il gene *Guy1* e *Yob* (CRISCIONE *et al.*, 2013; KRZYWINSKA *et al.*, 2016). Tali geni sono coinvolti anche nella regolazione della compensazione del dosaggio attraverso l'induzione dell'ipertrascrizione dei geni X-linked nei maschi (QI *et al.*, 2019).

Come per le zanzare del genere *Aedes*, nel genere *Anopheles* non risulta identificato un omologo del gene *tra*, tuttavia è stato recentemente identificato un gene che codifica per una proteina, FEMALELESS (FLE), che condivide il motivo RRM di riconoscimento dell'RNA con le proteine TRA-2 di altri insetti. FLE agisce come effettore intermedio nella cascata genica di determinazione del sesso, sia modulando lo *splicing* femmina-specifico di *dsx* e *fru* sia come regolatore della compensazione del dosaggio nelle femmine (KRZYWINSKA *et al.*, 2021). L'assenza del complesso TRA/TRA-2, suggerisce che la proteina FLE può da sola regolare lo *splicing* femmina-specifico dei geni *dsx* e *fru*.

Nei maschi XY, invece, la presenza del fattore M costituito dal gene *Yob* impedisce il corretto funzionamento della proteina FLE, mediante un meccanismo ancora non caratterizzato, che porta allo *splicing* maschio-specifico dei geni *dsx* e *fru* (KRZYWINSKA *et al.*, 2021) (Fig. 1F).

Famiglia Psychodidae - sottofamiglia Phlebotominae

I flebotomi sono secondi solo alle zanzare come vettori di agenti patogeni. Nella maggior parte delle specie di flebotomi caratterizzati sono presenti cromosomi sessuali omomorfici. Fanno eccezione alcune specie come

Phlebotomus perniciosus, *Lutzomyia shannoni* e *Lutzomyia longipalpis* s.l. che presentano cromosomi sessuali eteromorfici (VIGODER *et al.*, 2021).

I geni coinvolti nella determinazione del sesso dei flebotomi sono stati recentemente identificati mediante un approccio di trascrittoma comparativa (PETRELLA *et al.*, 2019) che ha permesso di evidenziare una sostanziale conservazione della cascata regolativa. A differenza di quanto osservato per le zanzare, in alcune specie di flebotomi del genere *Phlebotomus* il gene *tra* è presente e mostra una conservazione della sua regolazione per *splicing* alternativo sesso-specifico. Gli ortologhi del gene *tra* sono stati identificati solo nel genere *Phlebotomus* ma non in *Lutzomyia*, suggerendo che il gene *tra* potrebbe essere stato perso in seguito alla separazione evolutiva tra questi due generi. Tutti i geni *tra* identificati nel genere *Phlebotomus* codificano per una proteina TRA caratterizzata dalla mancanza del dominio presumibilmente coinvolto nell'auto-regolazione del gene. Questa diversa struttura della proteina TRA suggerisce l'evoluzione di un nuovo dominio che possa svolgere il ruolo autoregolativo o la presenza di una nuova proteina che agisce contestualmente a TRA-2. Tuttavia, l'elevata conservazione delle TRA/TRA-2 *binding sites*, presenti nel gene *tra* della specie *P. perniciosus*, suggeriscono che il meccanismo di autoregolazione di *tra* potrebbe essere conservato anche nei flebotomi.

Nella parte terminale del pathway i geni *dsx* e *fru* sono stati identificati nelle specie *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *L. longipalpis*, conservando la regolazione per *splicing* alternativo sesso-specifico e la presenza di TRA/TRA-2 *binding site* altamente conservate suggerisce che lo *splicing* è guidato anche in queste specie dalla formazione di questo complesso (PETRELLA *et al.*, 2019) (Fig. 1G).

CONCLUSIONI

Lo studio della determinazione del sesso negli insetti vettori Nematoceri rivela una maggiore complessità e variabilità rispetto a quanto osservato in altri ditteri. In particolare, nella sottofamiglia Culicinae è nota la presenza di un locus M contenente il segnale primario della determinazione del sesso maschile. Resta ignota la natura molecolare del regolatore intermedio, posto tra tale segnale primario e geni effettori a valle, responsabile dello *splicing* alternativo sesso-specifico dei geni *dsx* e *fru*. Un tale regolatore intermedio è stato identificato nella sottofamiglia Anophelinae, il gene *fle*, di cui il meccanismo di azione non è ancora noto. Per contro, nella sottofamiglia Phlebotominae, dove è stata evidenziata la conservazione di un gene *tra* come elemento chiave per lo sviluppo sessuale femminile, l'identificazione di un segnale primario resta una domanda aperta che necessita di ulteriori indagini. Studi futuri saranno necessari per incrementare le conoscenze sulla cascata genica della determinazione del sesso sia in altre specie di zanzare, flebotomi e altri Nematoceri vettori, come ad esempio Culicoides e Simuliidi, per i quali a oggi non si dispone di nessuna informazione.

Rispondere alle diverse questioni aperte sui meccanismi di determinazione del sesso descritti in questo ar-

ticolo rappresenta una importante sfida da affrontare nei prossimi anni. Tale studio potrebbe contribuire anche a migliorare i sistemi di controllo di insetti Nematoceri vettori, riducendo il loro impatto sulla salute pubblica.

Le principali strategie di controllo ecosostenibile adoperate nei confronti di insetti vettori sono la tecnica dell'insetto sterile e la tecnica dell'insetto incompatibile. Attualmente questi approcci sono impiegati per il controllo di diverse specie di zanzare ma ancora non ottimizzati per il controllo dei pappataci o altri Nematoceri vettori.

Per l'applicazione di tali tecnologie è estremamente importante l'utilizzo di individui del solo sesso maschile, incapaci di pungere e di trasmettere quindi patologie. Tuttavia, le strategie correnti di sessaggio/eliminazione degli individui di sesso femminile sono generalmente di tipo meccanico e caratterizzate da prolungata durata, costi elevati e non garantiscono un'efficacia del 100% (BIEDLER *et al.*, 2016). Lo studio dei geni per la determinazione del sesso potrebbe consentire di identificare target genici per lo sviluppo di ceppi di insetti ottimizzati per produrre solo progenie maschile, utilizzabili in programmi di controllo. Allo stesso tempo, questi geni potrebbero essere impiegati per ideare strategie di controllo basate su tecniche di *gene drive*, da esaminare in test pilota in campo per il controllo di popolazioni naturali di insetti vettori.

REFERENZE

- ADLER P.H., MCCREADIE J.W., 2019 – *Black flies (Simuliidae)*. – Medical and veterinary entomology. Academic Press, 2019. 237-259.
- ARYAN A., ANDERSON M.A., BIEDLER J.K., QI Y., OVERCASH J.M., NAUMENKO A.N., SHARAKHOVA M.V., MAO C., ADELMAN Z.N., TU Z., 2020 – *Nix alone is sufficient to convert female Aedes aegypti into fertile males and myo-sex is needed for male flight*. – Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(30): 17702-17709.
- BOPP D., SACCONI G., BEYE M., 2014 – *Sex Determination in Insects: Variations on a Common Theme*. – Sex Dev., 8: 20–28.
- BURGHARDT G., HEDIGER M., SIEGENTHALER C., MOSER M., DÜBENDORFER A., BOPP D., 2005 – *The transformer2 gene in Musca domestica is required for selecting and maintaining the female pathway of development*. – Development genes and evolution, 215: 165-176.
- CLOUGH E., JIMENEZ E., KIM Y.A., WHITWORTH C., NEVILLE M.C., HEMPEL L.U., PAVLOU H.J., CHEN Z.X., STURGILL D., DALE R.K., SMITH H.E., PRZYTYCKA T.M., GOODWIN S.F., VAN DOREN M., OLIVER B., 2014 – *Sex- and tissue-specific functions of Drosophila doublesex transcription factor target genes*. – Dev. Cell, 31(6): 761-73.
- CRISCIONE F., QI Y., SAUNDERS R., HALL B., TU Z., 2013 – *A unique Y gene in the Asian malaria mosquito Anopheles stephensi encodes a small lysine-rich protein and is transcribed at the onset of embryonic development*. – Insect Mol. Biol., 22(4): 433-41.
- FRACCARO M., TIEPOLO L., LAUDANI U., MARCHI A.,

- JAYAKAR S.D., 1977 – *Y chromosome controls mating behaviour on Anopheles mosquitoes*. – *Nature*, 265(5592): 326-328.
- GEMPE T., HASSELMANN M., SCHIÖTT M., HAUSE G., OTTE M., BEYE M., 2009 – *Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway*. – *PLoS biology*, 7(10), e1000222.21-230.
- GEUVERINK E., RENSINK A.H., RONDEEL I., BEUKEBOOM L.W., VAN DE ZANDE L., VERHULST E.C., 2017 – *Maternal provision of transformer-2 is required for female development and embryo viability in the wasp Nasonia vitripennis*. – *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 90: 23-33.
- GILCHRIST B.M., HALDANE J.B.S., 1947 – *Sex linkage and sex determination in a mosquito, Culex molestus*. – *Hereditas*, 33: 175-190.
- GOMULSKI L.M., MARICONTI M., DI COSIMO A., SCOLARI F., MANNI M., SAVINI G., MALACRIDA A.R., GASPERI G., 2018 – *The Nix locus on the male-specific homologue of chromosome 1 in Aedes albopictus is a strong candidate for a male-determining factor*. – *Parasit. Vectors.*, 24;11(Suppl 2): 647.
- GRAHAM P., PENN J.K., SCHEDL P., 2003 – *Masters change, slaves remain*. – *Bioessays*, 25: 1-4.
- HALL A.B., BASU S., JIANG X., QI Y., TIMOSHEVSKIY V.A., BIEDLER J.K., SHARAKHOVA M.V., ELAHI R., ANDERSON M.A., CHEN X.G., SHARAKHOV I.V., ADELMAN Z.N., TU Z., 2015 – *A male-determining factor in the mosquito Aedes aegypti*. – *Science*, 348(6240): 1268-1270.
- HEDIGER M., HENGGELER C., MEIER N., PEREZ R., SACCONI G., BOPP D., 2010 – *Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly*. – *Genetics*, 184(1):155-70.
- JIN B., ZHAO Y., DONG Y., LIU P., SUN Y., LI X., ZHANG X., CHEN X.G., GU J., 2020 – *Alternative splicing patterns of doublesex reveal a missing link between Nix and doublesex in the sex determination cascade of Aedes albopictus*. – *Insect Sci.*, 28(6):1601-1620.
- KRZYWINSKA E., FERRETTI L., LI J., LI J.C., CHEN C.H., KRZYWINSKI J., 2021 – *Femaleless Controls Sex Determination and Dosage Compensation Pathways in Females of Anopheles Mosquitoes*. – *Curr. Biol.*, 31(5):1084-1091.e4.
- LAGOS D., KOUKIDOU M., SAVAKIS C., KOMITOPOULOU K., 2007 – *The transformer gene in Bactrocera oleae: the genetic switch that determines its sex fate*. – *Insect molecular biology*, 16(2), 2.
- LIU P., JIN B., LI X., ZHAO Y., GU J., BIEDLER J.K., TU Z.J., CHEN X.G., 2020 – *Nix is a male-determining factor in the Asian tiger mosquito Aedes albopictus*. – *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 118:103311.
- LIU P., YANG W., KONG L., ZHAO S., XIE Z., ZHAO Y., WU Y., GUO Y., XIE Y., LIU T., JIN B., GU J., TU Z.J., JAMES A.A., CHEN X.G., 2023 – *A DBHS family member regulates male determination in the filariasis vector Armigeres subalbatus*. – *Nat. Commun.* 14: 2292.
- MAROLI M., FELICIANGELI M.D., BICHAUD L., CHARREL R.N., GRADONI L., 2013 – *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern*. – *Medical and veterinary entomology*, 27(2): 123-147.
- MCCARTHY N., 2014 – *The World's Deadliest Animals* – www.statista.com/chart/2203/the-worlds-deadliest-animals/
- MECCARIELLO A., SALVEMINI M., PRIMO P., HALL B., KOSKINIOTI P., DALÍKOVÁ M., GRAVINA A., GUCCIARDINO M.A., FORLENZA F., GREGORIOU M.E., IPPOLITO D., MONTI S.M., PETRELLA V., PERROTTA M.M., SCHMEING S., RUGGIERO A., SCOLARI F., GIORDANO E., TSOUMANI K.T., MAREC F., WINDBICHLER N., ARUNKUMAR K.P., BOURTZIS K., MATHIOPOULOS K.D., RAGOUSSIS J., VITAGLIANO L., TU Z., PAPATHANOS P.A., ROBINSON M.D., SACCONI G., 2019 – *Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests*. – *Science*, 27;365(6460): 1457-1460.
- MELLOR P.S., BOORMAN J., BAYLIS M., 2000 – *Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors*. – *Annual review of entomology*, 45(1): 307-340.
- PANE A., SALVEMINI M., BOVI P.D., POLITO C., SACCONI G., 2002 – *The transformer gene in Ceratitis capitata provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate*. – *Development*, 129(15): 3715-25.
- PAUPY C., DELATTE H., BAGNY L., CORBEL V., FONTENILLE D., 2009 – *Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light*. – *Microbes and infection*, 11(14-15): 1177-1185.
- PERVEEN N., MUHAMMAD K., MUZAFFAR S.B., ZAHEER T., MUNAWAR N., GAJIC B., SPARAGANO O.A., KISHORE U., WILLINGHAM A.L., 2023 – *Host-pathogen interaction in arthropod vectors: Lessons from viral infections*. – *Front. Immunol.*, 14: 1061899.
- PETRELLA V., ACETO S., COLONNA V., SACCONI G., SANGES R., POLANSKA N., VOLF P., GRADONI L., BONGIORNO G., SALVEMINI M., 2019 – *Identification of sex determination genes and their evolution in Phlebotominae sand flies (Diptera, Nematocera)*. – *BMC Genomics*, 20(1): 522.
- PRICE D.C., EGIZI A., FONSECA D.M., 2015 – *Characterization of the doublesex gene within the Culex pipiens complex suggests regulatory plasticity at the base of the mosquito sex determination cascade*. – *BMC Evol. Biol.*, 15: 108.
- QI Y., WU Y., SAUNDERS R., CHEN X.G., MAO C., BIEDLER J.K., TU Z.J., 2019 – *Guy1, a Y-linked embryonic signal, regulates dosage compensation in Anopheles stephensi by increasing X gene expression*. – *Elife*, 8: e43570.
- SALVEMINI M., D'AMATO R., PETRELLA V., ACETO S., NIMMO D., NEIRA M., ALPHEY L., POLITO L.C., SACCONI G., 2013 – *The orthologue of the fruitfly sex behaviour gene fruitless in the mosquito Aedes aegypti: evolution of genomic organisation and alternative splicing*. – *PLoS One*, 8(2): e48554.
- SALVEMINI M., MAURO U., LOMBARDO F., MILANO A., ZAZ-

- ZARO V., ARCA B., POLITO L.C., SACCONI G., 2011–
Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a Drosophila regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito Aedes aegypti. – *Bmc. Evolutionary Biology*, 11.
- SALVEMINI M., ROBERTSON M., ARONSON B. ATKINSON P., POLITO L.C., SACCONI G., 2009 – *Ceratitis Capitata Transformer-2 Gene Is Required to Establish and Maintain the Autoregulation of Cctra, the Master Gene for Female Sex Determination.* – *Int. J. Dev. Biol.*, 53: 109–120.
- SCALI C., CATTERUCCIA F., LI Q., CRISANTI A., 2005 – *Identification of sex-specific transcripts of the Anopheles gambiae doublesex gene.* – *J. Exp. Biol.*, 208(Pt 19): 3701-3709.
- SÁNCHEZ L., 2008 – *Sex-determining mechanisms in insects.* – *Int. J. Dev. Biol.*, 52(7): 837-56.
- SHUKLA J.N., PALLI S.R., 2012 – *Sex determination in beetles: production of all male progeny by parental RNAi knockdown of transformer.* – *Scientific reports*, 2(1): 602.
- TOUPS M.A., HAHN M.W., 2010 – *Retrogenes reveal the direction of sex-chromosome evolution in mosquitoes.* – *Genetics*, 186(2): 763-766.
- VIGODER F.M., ARARIPE L.O., CARVALHO A.B., 2021 – *Identification of the sex chromosome system in a sand fly species, Lutzomyia longipalpis sl.* – *G3*, 11(8), jkab217.

LA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI PIRETROIDI IN CULICIDI VETTORI DI PATOGENI UMANI E ZONOTICI IN ITALIA

VERENA PICHLER^a - BENIAMINO CAPUTO^a - ALESSANDRA DELLA TORRE^{a*}

^a *Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università SAPIENZA, Roma, Italia.*

*Corresponding Author: alessandra.dellatorre@uniroma1.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: “I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo” - Seduta pubblica dell’Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Pyrethroid resistance on Culicidae vectors of human and zoonotic pathogens in Italy

We here report the results obtained in the last few years by the Medical Entomology group in Sapienza University (Rome, Italy) by studying resistance to pyrethroid insecticides in the two main mosquito vectors of arboviral diseases (i.e. Dengue, West Nile) in Italy and Europe, *Culex pipiens* and *Aedes albopictus*, respectively. Results highlight worrisome levels of phenotypic resistance in several populations across Italy and provide first evidence on its genetic and metabolic mechanisms. Overall, results draw attention to the need for an evidence-based implementation of mosquito nuisance control taking insecticide resistance management into consideration to maintain or restore the efficacy of the nowadays only chemical weapon available to stop arbovirus transmission in Europe.

KEY WORDS: mosquito control, insecticide resistance, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens*

INTRODUZIONE ALLA TEMATICA

Le malattie trasmesse da Culicidi provocano oltre 700.000 morti all’anno soprattutto in regioni tropicali. Tuttavia, in Italia la specie autoctona *Culex pipiens* è responsabile ogni anno di numerosi casi di trasmissione umana del virus del West Nile, mentre la specie invasiva *Aedes albopictus* ha causato negli ultimi anni la circolazione di nuovi arbovirus emergenti di origine tropicale, come il dengue e il chikungunya. Entrambe le specie di zanzare sono anche causa di importante fastidio a causa della loro attività di puntura notturna e diurna.

In accordo con le linee guida dell’European Center for Disease Control (ECDC), il Ministero della Sanità italiano raccomanda la gestione dei focolai larvali e l’impiego di larvicidi per il controllo della densità di zanzare, del fastidio a esse associato e del rischio di trasmissione di patogeni (Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi, PNA 2020-2025). Interventi contro le zanzare adulte mediante irrorazione di piretroidi – l’unica classe di insetticidi autorizzata per il controllo delle zanzare adulte nell’UE (Direttiva UE 528/2012) – sono consigliati solo in caso di notifica di un caso infetto e/o trasmissione autoctona di arbovirus. Tuttavia, l’uso incontrollato/calendarizzato e spesso scorretto dei piretroidi per ridurre il fastidio associato alle zanzare e di altri insetti nocivi crea le condizioni per lo sviluppo e la diffusione di fenomeni di resistenza. I due principali meccanismi di resistenza nei Culicidi sono: i) metabolica (MR) - ovvero cambiamenti nei sistemi enzimatici degli insetti che portano a rapida disintossicazione o sequestro di insetticidi – e ii) genetica con alterazioni amminoacidiche a livello del canale del sodio voltaggio dipendente (VSSC, il bersaglio dei piretroidi)

(*target site resistance*, TSR). In particolare, mutazioni non sinonime nel gene del VSSC (note come mutazioni *knock-down* o *kdr*) possono ostacolare il legame dei piretroidi e interferire con la cinetica del canale riducendo la suscettibilità della zanzara ai piretroidi (HEMINGWAY & RANSON, 2000). Entrambi questi meccanismi sono molto studiati in zanzare del genere *Anopheles* vettori di malaria o nel principale vettore di arbovirus tropicale *Aedes aegypti*, ma molto meno in specie vettrici non tropicali. Il gruppo di ricerca di Entomologia Medica dell’Università Sapienza di Roma da anni studia i meccanismi e la diffusione della resistenza agli insetticidi in Italia e in Europa. Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti sulle due specie di Culicidi più diffuse in aree urbane in Italia e di maggiore importanza sanitaria.

RISULTATI - CULEX PIPPIENS

Resistenza fenotipica

Risultati di biosaggi eseguiti presso gli insettari della Sapienza seguendo il protocollo standard dell’Organizzazione Mondiale della Sanità (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016) hanno evidenziato alti livelli di resistenza fenotipica alla permetrina (dosaggio, 0,75%) in popolazioni di zanzare adulte raccolte nel 2016-2017 a Ferrara (mortalità<16%), Anzio (m=54%) e Bari (m=27%), e alla deltametrina nella popolazione di Bari (m=63%). Ridotta suscettibilità (mortalità<98%) alla permetrina è stata rilevata in quasi tutte le altre popolazioni (PICHLER *et al.*, 2022a).

Target-site resistance

PICHLER *et al.* (2022a) hanno rivelato una chiara associazione tra il fenotipo resistente e la presenza di alleli *kdr*

in posizione 1014 del VSSC. Il sequenziamento dell'intero gene *vssc* in 82 esemplari raccolti in Italia e Grecia ha consentito di identificare 659 varianti di cui alcune producono mutazioni in 5 posizioni aminoacidiche rilevanti (o potenzialmente tali) nel determinare resistenza. In dettaglio: i) sono stati riscontrati i 3 alleli nel locus 1014 – già descritti nella specie: l'allele 1014F è stato trovato in tutte le popolazioni campionate con una frequenza allelica variabile dal 25 -87%, mentre l'allele 1014C è stato trovato solo in Grecia (freq =50%) e 1014S è stato trovato in un unico esemplare eterozigote del Nord Italia; ii) la mutazione F1534L, è stata rilevata in tutte le popolazioni italiane analizzate con una frequenza complessiva dell'8%; iii) mutazioni nelle posizioni 253, 918 e 1879 associate a resistenza in altre specie di zanzare/insetti sono state rilevate a frequenze <5% , con la mutazione M918T rilevata per la prima volta nelle zanzare. Questi risultati descrivono un quadro preoccupante di elevata e diffusa resistenza genetica in Italia e forniscono dati per indagini future sull'impatto delle nuove mutazioni e sulla loro possibile sinergia (PICHLER *et al.*, In preparation).

Resistenza metabolica

Sono in corso esperimenti di trascrittomica per identificare enzimi che mostrino espressione differenziale in zanzare non esposte, resistenti e sensibili ai piretroidi.

RISULTATI - Aedes albopictus

Resistenza fenotipica

Risultati di biosaggi eseguiti presso gli insettari della Sapienza seguendo il protocollo standard dell'Organizzazione Mondiale della Sanità su 12 popolazioni adulte raccolte nel 2017 di Piemonte, Veneto, Emilia Romagna, Lazio e Calabria, hanno evidenziato piena sensibilità alla deltametrina (concentrazione=0,05%) e diversi livelli di resistenza fenotipica alla permetrina (0,75%) e/o α -cipermetrina (0,05%) in tutta Italia, con i livelli più alti nelle province di Ferrara e Roma (Roma e Anzio) dove si è verificata l'epidemia di chikungunya del 2017 (PICHLER *et al.*, 2018; 2019).

Target-site resistance

La genotipizzazione parziale del gene *vssc* nei campioni risultati resistenti nei biosaggi ha rivelato una diffusa distribuzione della mutazione V1016G e ha confermato la sua associazione con la resistenza fenotipica ai piretroidi già dimostrata attraverso l'esposizione di colonie di laboratorio omozigoti a diverse classi di piretroidi (KASAI *et al.*, 2019). Abbiamo sviluppato un saggio PCR (AS-PCR) per genotipizzare la mutazione V1016G e lo abbiamo utilizzato per analizzare popolazioni del Trentino, Veneto, Emilia Romagna, Toscana, and Lazio. I risultati hanno evidenziato frequenze dell'allele 1016G >5% in quasi tutte e le popolazioni con l'esclusione di quella del Trentino, con picchi di 20–45% nelle popolazioni turistiche costiere dove i trattamenti piretroidi sono ampiamente implementati e calendarizzati per ridurre il fastidio (PICHLER *et al.*, 2021). In uno studio simile condotto su popolazioni raccolte in 69

siti di campionamento in 19 paesi europei, l'allele 1016G è stata identificata in 12 popolazioni di nove paesi (con frequenze alleliche comprese tra 1 e 8%), per lo più distribuiti in due cluster geografici. Il cluster occidentale comprende popolazioni costiere del Mediterraneo dall'Italia, Francia e Malta, nonché singoli siti di Spagna e Svizzera. Il cluster orientale comprende popolazioni su entrambi le sponde del Mar Nero in Bulgaria, Turchia e Georgia, nonché una in Romania (PICHLER *et al.*, 2022b).

Resistenza metabolica

Come per *Cx pipiens*, sono in corso esperimenti di trascrittomica per identificare enzimi che mostrino espressione differenziale in zanzare non esposte, resistenti e sensibili ai piretroidi.

CONCLUSIONI

Nel complesso, i risultati ottenuti rivelano l'esistenza di estesi fenomeni di resistenza ai piretroidi nelle popolazioni italiane di *Cx pipiens* e di *Ae. albopictus* e rappresentano un campanello d'allarme, sollecitando un maggiore monitoraggio e una maggiore gestione di un fenomeno che rischia di neutralizzare l'unico mezzo oggi disponibile per contrastare e fermare le epidemie di arbovirus.

BIBLIOGRAFIA

- HEMINGWAY J., RANSON H., 2000 - *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. - Annual Review of Entomology, 45: 371–391.
- KASAI S.; CAPUTO B.; TSUNODA T.; CUONG T.C.; MAEKAWA Y.; LAM-PHUA S.G.; PICHLER V.; ITOKAWA K.; MUROTA K.; KOMAGATA O.; ET AL., 2019 - *First detection of a Vssc allele V1016G conferring a high level of insecticide resistance in Aedes albopictus collected from Europe (Italy) and Asia (Vietnam), 2016: A new emerging threat to controlling arboviral diseases*. - Eurosurveillance, 24: 1–12.
- PICHLER V., BELLINI R., VERONESI R., ARNOLDI D., RIZZOLI A., LIA R.P., ET AL., 2018 - *First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian Aedes albopictus populations after 26 years since invasion*. - Pest Management Science, 74: 1319–1327.
- PICHLER V., MALANDRUCCOLO C., SERINI C., BELLINI R., SEVERINI F., TOMA L., DI LUCA M., MONTARSI F., BALLARDINI M., MANICA M., PETRARCA V., VONTAS J., KASAI S., DELLA TORRE A., CAPUTO B., 2019 - *Phenotypic and genotypic pyrethroid resistance of Aedes albopictus, with focus on the 2017 chikungunya outbreak in Italy*. - Pest Management Science, 5 (10): 2642-2651.
- PICHLER V., MANCINI E., MICOCCI M., CALZETTA M., ARNOLDI D., RIZZOLI A., LENCIONI V., PAOLI F., BELLINI R., VERONESI R., ET AL., 2021 - *A Novel Allele Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) Assay to Detect the V1016G Knockdown Resistance Mutation Confirms Its Widespread Presence in Aedes albopictus Populations from Italy*. - Insects, 12: 79.
- PICHLER V., GIAMMARIOLI C., BELLINI R., VERONESI R.,

- ARNOLDI D., RIZZOLI A.P., LIA R., OTRANTO D., BALLARDINI M., COBRE P., SERINI P., DELLA TORRE A., CAPUTO B., 2022a - *First evidence of pyrethroid resistance in Italian populations of West Nile virus vector Culex pipiens*. - *Medical & Veterinary Entomology*, 12573.
- PICHLER V., CAPUTO B., VALADAS V., MICOCCHI M., HORVATH C., VIRGILLITO ., AIM-COST NETWORK MEMBERS, ARBOMONITOR PROJECT MEMBERS, SCHAFFNER F, PINTO J., DELLA TORRE A., 2022b - *Geographic distribution of the v1016g knockdown resistance mutation in Aedes albopictus: a warning bell for Europe*. - *Parasite & Vectors*, 15(1): 280.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2016 - *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. - World Health Organisation Technical Report Series, p. 22.

SIMBIOSI E CONTROLLO DEI DITTERI VETTORI E DELLE MALATTIE TRASMESSE

ALESSIA CAPPELLI - GUIDO FAVIA

Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda: "I Culicidi vettori di infezioni di interesse medico-veterinario: dalla biologia molecolare allo sviluppo di metodologie di controllo" - Seduta pubblica dell'Accademia, Firenze 10 novembre 2023.

Symbiosis and control of Dipteran vectors and transmitted diseases

It is well known that the symbiotic relationships that insects have established with different microorganisms have played a key role in their evolutionary success. Bacterial symbiosis is also prevalent in insects that are efficient vectors of pathogens, and numerous studies have attempted to decipher the basic mechanisms of host-symbiont relationships and develop ways to control vector-borne diseases. "Symbiotic control," a new multifaceted approach that uses symbiotic microorganisms to control insect pests or reduce vector competence, seems particularly promising. Three of these currently cutting-edge approaches are: (1) the elimination of microbial symbionts required by the insect host; (2) the manipulation of symbionts that can express anti-pathogen molecules within the host; and (3) the introduction of endogenous microbes into insect populations, able to influence the lifespan and the vectorial capacity of new hosts.

KEY WORDS: symbiosis, insect vector, mosquito

INTRODUZIONE ALLA TEMATICA

Alcune delle malattie infettive più devastanti, come la malaria, la dengue, la febbre gialla e la filariosi, sono trasmesse dalle zanzare e causano un drammatico carico sanitario per le persone che vivono in regioni endemiche del mondo. Le zanzare, come tutti gli insetti, rappresentano un esempio di grande successo evolutivo, come testimoniano il gran numero di specie descritte (circa 3500) e la loro ampia distribuzione in tutto il mondo, a eccezione dell'Antartide, segno della loro grande capacità adattarsi a tipi di habitat molto diversi. Tra i fattori che contribuiscono in modo significativo a questa grande adattabilità, il microbiota delle zanzare può svolgere un ruolo fondamentale. Sebbene i primi studi sul microbiota associato ad alcune specie di zanzare risalgano a pochi decenni fa (HERTIG and WOLBACH, 1924; YEN and BARR 1971), e sebbene i batteri, come alcune siero-varietà di *Bacillus thuringiensis*, siano stati proposti nel controllo biologico delle malattie trasmesse dalle zanzare (MBD) (LACEY, 2007), solo di recente la ricerca sulla "simbiosi nelle zanzare" è stata ampliata, con l'obiettivo di sviluppare strategie innovative di controllo del MBD attraverso il controllo simbiotico (SC), un approccio multiforme che utilizza microrganismi simbiotici per controllare gli insetti nocivi o ridurre la competenza dei vettori.

I BATTERI SIMBIONTI DEGLI INSETTI

Il rapporto "antico" e stretto tra batteri simbiotici e alcuni insetti ospiti è testimoniato da alcuni elementi biologici particolarmente caratterizzanti come l'organizzazione strutturale in batteriomi. Un batterioma è, per l'appunto, un organo specializzato che ospita batteri endosimbiotici. I batteriomi contengono a propria volta cellule specializzate dette batteriociti.

Altro aspetto riguarda la riduzione della dimensione

del genoma del simbiote. Le analisi sui genomi dei simbioti batterici mostrano che la riduzione del genoma è un processo continuo, che risulta in un *continuum* di dimensioni, con il genoma più piccolo attualmente conosciuto a 112 kilobasi. I geni che vengono persi riguardano tutte le categorie funzionali, ma i geni fondamentali per i processi informativi centrali, compresi i geni che codificano per le proteine ribosomiali, vengono per lo più conservati, mentre i geni alla base della produzione dei componenti dell'involucro cellulare sono particolarmente impoveriti. Pertanto, queste entità mantengono proprietà simili a cellule ma dipendono fortemente dal co-adattamento agli ospiti, che, a loro volta, si evolvono continuamente per supportare i simbioti da cui dipendono.

CONTROLLO SIMBIOTICO DI ZANZARE VETTRICI

Come anticipato, il controllo simbiotico degli insetti nocivi e dei vettori di malattie è stato sviluppato attraverso tre approcci principali:

1. la distruzione dei simbioti microbici richiesta da insetti nocivi/vettori di malattie;
2. la manipolazione di simbioti che possono esprimere molecole anti-patogene all'interno dell'ospite;
3. l'introduzione di microbi endogeni che colpiscono durata di vita e capacità vettoriale dei nuovi ospiti nelle popolazioni di insetti.

Nelle zanzare, il secondo e il terzo approccio sono stati recentemente esaminati in studi mirati a valutare il loro potenziale utilizzo nel controllo dell'MBD.

MANIPOLAZIONE DEI SIMBIONTI PER ESPRIMERE MOLECOLE ANTIPATOGENE ALL'INTERNO DELLA ZANZARA-OSPITE

La paratransgenesi mira a eliminare gli agenti patogeni dalle popolazioni del vettore ospite attraverso la transge-

nesi di un simbiote del vettore. Pertanto, per sviluppare un approccio paratransgenico efficiente per il controllo della MBD, devono essere identificati microrganismi simbiotici adatti con caratteristiche specifiche e ben definite.

Un potenziale candidato per l'uso nella paratransgenesi delle zanzare è l'alfa-proteobatterio *Asaia*, che ha suscitato notevole interesse a causa della sua peculiare relazione con le zanzare. Questa peculiarità è legata a diversi elementi: innanzitutto *Asaia* si localizza nell'intestino, nelle ghiandole salivari e negli organi riproduttivi delle zanzare di entrambi i sessi (FAVIA *et al.*, 2007). In secondo luogo, *Asaia* si trova in tutti gli stadi di sviluppo di tutti i vettori della malaria testati, nonché in *Aedes aegypti*, il principale vettore della febbre gialla, con una prevalenza molto elevata all'interno di diverse popolazioni (spesso raggiungendo il 100%) dove è il batterio dominante (CROTTI *et al.*, 2009; DIAZ *et al.*, 2021). *Asaia* è facilmente coltivabile al di fuori dell'ospite in terreni privi di cellule ed è stata geneticamente trasformata per esprimere proteine transgeniche. Recentemente, *Asaia* è stato utilizzato per esprimere condizionalmente la proteina anti-plasmodiale denominata "scorpina" al momento dell'effettuazione del pasto di sangue da parte della zanzara (SHANE *et al.*, 2018). *Asaia* utilizza diverse vie di trasmissione all'interno e tra le popolazioni; infatti, può essere trasmessa verticalmente alla progenie per vie materne, paterne e transstadiali e trasmessa orizzontalmente tra individui mediante accoppiamento e co-alimentazione (FAVIA *et al.*, 2007; DAMIANI *et al.*, 2008; DAMIANI *et al.*, 2010).

La trasmissione verticale potrebbe consentire di introdurre con successo batteri modificati nelle popolazioni di zanzare sul campo. Poiché una zanzara gravida depone circa 80-100 uova (Life cycle: the mosquito <https://www.cdc.gov/dengue/resources/factSheets/MosquitoLifecycleFINAL.pdf>), di cui circa il 50% si sviluppa in femmine adulte, si potrebbe prevedere un aumento significativo del numero di zanzare portatrici di *Asaia*, con una rapida diffusione del batterio tra i membri di una popolazione.

INTRODUZIONE DI MICROBI ENDOGENI CHE INFLUENZANO LA DURATA DELLA VITA E LA CAPACITÀ VETTORIALE DEI NUOVI OSPITI NELLE POPOLAZIONI DI INSETTI

La dengue è riemersa come una grave sfida per la salute pubblica. Negli ultimi tempi sono stati fatti diversi tentativi promettenti per controllare la malattia con scarso successo. Un metodo innovativo di controllo biologico della dengue è l'uso del batterio *Wolbachia*. Ceppi selezionati di *Wolbachia* sono stati introdotti nell'*Aedes aegypti* per prevenire la trasmissione del virus dengue da parte del vettore (FRENTIU *et al.*, 2014; UTARINI *et al.*, 2021). *Wolbachia* previene la trasmissione della dengue bloccando direttamente il virus o diminuendo la durata del vettore. Il meccanismo attraverso il quale provoca questi effetti non è chiaramente compreso. La principale preoccupazione di questa tecnica è l'emergere di un nuovo sierotipo del virus dengue che potrebbe eludere la protezione offerta da *Wolbachia*. La tecnica è rispettosa dell'ambiente e promettente per il controllo di altre

malattie trasmesse da vettori. In diversi studi condotti principalmente in Asia, è stato dimostrato che l'introduzione di un ceppo di *Wolbachia* (chiamato wMel) nelle popolazioni di *Ae. aegypti* è stata efficace nel ridurre l'incidenza della dengue sintomatica e ha comportato un minor numero di ricoveri per dengue tra i partecipanti a questi trials (PINTO *et al.*, 2021; VELEZ *et al.*, 2023).

COSA C'È DI NUOVO?

Il controllo della malaria richiede lo sviluppo di un'ampia gamma di strategie complementari. Recentemente, sono state descritte le proprietà di un batterio simbiotico presente in natura, non geneticamente modificato, *Delftia tsuruhatensis* TC1, che è stato isolato da zanzare incapaci di sostenere lo sviluppo dei parassiti *Plasmodium falciparum* (HUANG *et al.*, 2023). *D. tsuruhatensis* TC1 inibisce le prime fasi dello sviluppo del *Plasmodium* e la successiva trasmissione da parte della zanzara *Anopheles* attraverso la secrezione di una piccola molecola inibitrice. È stato identificato che questo inibitore è la molecola idrofobica armane. Si è inoltre scoperto che, al contatto con le zanzare, l'armane penetra nella cuticola, inibendo lo sviluppo del *Plasmodium*. *D. tsuruhatensis* TC1 popola stabilmente l'intestino della zanzara, non impone un costo di fitness alla zanzara e inibisce lo sviluppo del *Plasmodium* per la vita della zanzara. Gli studi sul campo condotti in Burkina Faso e la modellizzazione hanno dimostrato che *D. tsuruhatensis* TC1 ha il potenziale per integrare il controllo della trasmissione della malaria mirato alle zanzare.

CONCLUSIONI

Gli approcci basati sul controllo simbiotico devono affrontare le preoccupazioni normative ed etiche sollevate dagli specialisti e dalle popolazioni locali negli ultimi anni.

Nonostante queste preoccupazioni, il controllo simbiotico delle zanzare offre diverse caratteristiche favorevoli rispetto ad altri metodi di controllo. In primo luogo, la manipolazione genetica dei simbiotici è molto più semplice e veloce della manipolazione genetica delle zanzare, e i simbiotici trasformati sono molto più facili da introdurre nelle popolazioni di zanzare rispetto ai transgeni. In secondo luogo, l'uso di simbiotici trasformati supera le barriere genetiche delle popolazioni di zanzare riproduttivamente isolate che spesso si trovano in aree ad alta trasmissione della malaria e che quindi rappresentano un grande ostacolo alla diffusione dei transgeni delle zanzare. In terzo luogo, i microrganismi possono essere prodotti in gran parte a basso costo, anche in alcuni paesi in via di sviluppo, e la possibile inattivazione dei transgeni batterici sul campo non costituisce una delle maggiori preoccupazioni a causa della logistica più semplice per l'introduzione dei batteri appena trasformati.

Infine, per quanto riguarda i requisiti normativi ed etici, le normative già esistenti sul rilascio di batteri modificati nell'ambiente rappresentano un punto di partenza sufficiente per formulare linee guida più specifiche per le applicazioni sul campo delle zanzare simbiotici.

RIASSUNTO

È risaputo che le relazioni simbiotiche che gli insetti hanno stabilito con diversi microrganismi hanno avuto un ruolo chiave nel loro successo evolutivo. La simbiosi batterica è prevalente anche negli insetti che sono efficienti vettori di patogeni e numerosi studi hanno cercato di decifrare i meccanismi di base delle relazioni ospite-simbionte e di sviluppare modi per controllare le malattie trasmesse da vettori. Il “controllo simbiotico”, un nuovo approccio multiforme che utilizza microrganismi simbiotici per controllare gli insetti nocivi o ridurre la competenza dei vettori, sembra particolarmente promettente. Tre di questi approcci attualmente all'avanguardia sono:

1. l'eliminazione dei simbionti microbici richiesti dall'insetto ospite;
2. la manipolazione di simbionti che possono esprimere molecole anti-patogeno all'interno dell'ospite;
3. l'introduzione di microbi endogeni che influenzano la durata della vita e la capacità di vettore dei nuovi ospiti nelle popolazioni di insetti.

BIBLIOGRAFIA

- CROTTI E., DAMIANI C., PAJORO M., GONELLA E., RIZZI A., RICCI I., NEGRI I., SCUPPA P., ROSSI P., BALLARINI P., RADDADI N., MARZORATI M., SACCHI L., CLEMENTI E., GENCHI M., MANDRIOLI M., BANDI C., FAVIA G., ALMA A., DAFFONCHIO D., 2009 - *Asaia, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders.* - *Environmental Microbiology*, 11(12): 3252-64.
- DAMIANI C., RICCI I., CROTTI E., ROSSI P., RIZZI A., SCUPPA P., ESPOSITO F., BANDI C., DAFFONCHIO D., FAVIA G., 2008 - *Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors.* - *Current Biology*, 18(23): R1087-8.
- DAMIANI C., RICCI I., CROTTI E., ROSSI P., RIZZI A., SCUPPA P., CAPONE A., ULISSI U., EPIS S., GENCHI M., SAGNON N., FAYE I., KANG A., CHOUAIA B., WHITEHORN C., MOUSSA G.W., MANDRIOLI M., ESPOSITO F., SACCHI L., BANDI C., DAFFONCHIO D., FAVIA G., 2010 - *Mosquito-bacteria symbiosis: the case of Anopheles gambiae and Asaia.* - *Microbial Ecology*, 60(3): 644-654.
- DÍAZ S., CAMARGO C., AVILA F.W., 2021. *Characterization of the reproductive tract bacterial microbiota of virgin, mated, and blood-fed Aedes aegypti and Aedes albopictus females.* - *Parasite & Vectors*, 14(1):592.
- FAVIA G., RICCI I., DAMIANI C., RADDADI N., CROTTI E., MARZORATI M., RIZZI A., URSO R., BRUSETTI L., BORIN S., MORA D., SCUPPA P., PASQUALINI L., CLEMENTI E., GENCHI M., CORONA S., NEGRI I., GRANDI G., ALMA A., KRAMER L., ESPOSITO F., BANDI C., SACCHI L., DAFFONCHIO D., 2007 - *Bacteria of the genus Asaia stably associate with Anopheles stephensi, an Asian malarial mosquito vector.* - *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 104: 9047-9051.
- FRENTIU F.D., ZAKIR T., WALKER T., POPOVICI J., PYKE A.T., VAN DEN HURK A., MCGRAW E.A., O'NEILL S.L., 2014 - *Limited dengue virus replication in field-collected Aedes aegypti mosquitoes infected with Wolbachia.* - *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(2): e2688.
- HERTIG M., WOLBACH S.B., 1924 - *Studies on Rickettsia-like microorganisms in insects.* - *The Journal of Medical Research*, 44: 329-374.
- HUANG W., RODRIGUES J., BILGO E., TORMO J.R., CHALLENGER J.D., DE COZAR-GALLARDO C., PÉREZ-VICTORIA I., REYES F., CASTAÑEDA-CASADO P., GNAMBANI E.J., HIEN D.F.S., KONKOBOM M., URONES B., COPPENS I., MENDOZA-LOSANA A., BALLELL L., DIABATE A., CHURCHER T.S., JACOBS-LORENA M., 2023 - *Delftia tsuruhatensis TCI symbiont suppresses malaria transmission by anopheline mosquitoes.* - *Science*, 381(6657): 533-540.
- LACEY L.A., 2007 - *Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control.* - *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23: 133-163.
- PINTO S.B., RIBACK T.I.S., SYLVESTRE G., COSTA G., PEIXOTO J., DIAS F.B.S., TANAMAS S.K., SIMMONS C.P., DUFALTY S.M., RYAN P.A., O'NEILL S.L., MUZZI F.C., KUTCHER S., MONTGOMERY J., GREEN B.R., SMITHYMAN R., EPPINGHAUS A., SARACENI V., DUROVNI B., ANDERS K.L., MOREIRA L.A., 2021 - *Effectiveness of Wolbachia-infected mosquito deployments in reducing the incidence of dengue and other Aedes-borne diseases in Niterói, Brazil: A quasi-experimental study.* - *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(7): e0009556.
- SHANE J.L., GROGAN C.L., CWALINA C., LAMPE D.J., 2018 - *Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota.* - *Nature Communications*, 9(1): 4127.
- YEN J.H., BARR A.R., 1971 - *New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in Culex pipiens.* - *Nature*, 232: 657-658.
- UTARINI A., INDRIANI C., AHMAD R.A., TANTOWIJOYO W., ARGUNI E., ANSARI M.R., SUPRIYATI E., WARDANA D.S., MEITIKA Y., ERNESIA I., NURHAYATI I., PRABOWO E., ANDARI B., GREEN B.R., HODGSON L., CUTCHER Z., RANCÈS E., RYAN P.A., O'NEILL S.L., DUFALTY S.M., TANAMAS S.K., JEWELL N.P., ANDERS K.L., SIMMONS C.P. AWED STUDY GROUP., 2021 - *Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue.* - *The New England Journal of Medicine*, 384(23): 2177-2186.
- VELEZ I.D., TANAMAS S.K., ARBELAEZ M.P., KUTCHER S.C., DUQUE S.L., URIBE A., ZULUAGA L., MARTÍNEZ L., PATIÑO A.C., BARAJAS J., MUÑOZ E., MEJIA TORRES M.C., URIBE S., PORRAS S., ALMANZA R., PULIDO H., O'NEILL S.L., SANTACRUZ-SANMARTIN E., GONZALEZ S., RYAN P.A., DENTON J.A., JEWELL N.P., DUFALTY S.M., SIMMONS C.P., ANDERS K.L., 2023 - *Reduced dengue incidence following city-wide wMel Wolbachia mosquito releases throughout three Colombian cities: Interrupted time series analysis and a prospective case-control study.* - *PLOS Neglected Tropical Diseases* 17(11): e0011713. www.cdc.gov/dengue/resources/factsheets/mosquitoflifecyclefinal.pdf