



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**LA RISPOSTA DI DIFESA DEGLI ORGANISMI AGLI  
INSETTICIDI: DALL'ECOLOGIA DELLO STRESS  
AL CONTROLLO DI ARTROPODI VETTORI**

Tesi di Dottorato di  
**Agata Negri**

Tutor Scientifico  
Prof.ssa Sandra Urbanelli

XXXII Ciclo di Dottorato in Biologia Ambientale e dell'Evoluzione - *Scienze ecologiche* -  
A.A. 2016-2019



Foto di un adulto e di una larva della zanzara *Anopheles stephensi*  
realizzate dal Dott. Paolo Gabrieli





**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

La risposta di difesa degli organismi agli insetticidi:  
dall'ecologia dello stress al controllo di artropodi vettori

Organism defense response to insecticides in arthropod  
vectors: from stress ecology to vector control

**Dipartimento di Biologia Ambientale**  
**Corso di Dottorato di ricerca in Biologia Ambientale ed Evoluzionistica**

Tesi di Dottorato di  
**Agata Negri**

**Tutor Scientifico**  
Prof.ssa Sandra Urbanelli

XXXII Ciclo  
A.A. 2016-2019



## RIASSUNTO

---

Tra i principali argomenti di studio della biologia vi sono i meccanismi con cui le cellule e gli organismi sono in grado di mantenere l'omeostasi in un ambiente avverso, ricco di stress chimici e fisici. "L'obbligo" di sopravvivenza che guida ogni organismo quando viene esposto ad agenti tossici, come sostanze chimiche tossiche endogene o composti xenobiotici, ha portato all'evoluzione di una serie di famiglie di geni e di pathways che, nell'insieme, prendono il nome di "defensoma chimico". Questa rete di difesa integrata, che permette ad ogni organismo di avvertire, trasformare ed eliminare le sostanze chimiche tossiche, è stata recentemente sottoposta ad approfondite indagini, in particolare modo negli artropodi, in merito alla loro grande importanza economica, ambientale e medico-veterinaria. Considerato il ruolo ancora oggi svolto dai composti chimici, come strumento per il controllo di numerosi *pests*, l'insorgenza della resistenza metabolica contro diversi insetticidi rappresenta un problema dal punto di vista del controllo d'insetti dannosi, da cui deriva il rischio di un'intensificazione nell'utilizzo degli stessi insetticidi, quindi problematiche ecologiche.

Tra i principali meccanismi molecolari, appartenenti al complesso del defensoma chimico, vi sono gli ABC trasportatori, proteine integrali di membrana, atte a disintossicare la cellula da diversi composti nocivi con cui questa entra in contatto. Essi agiscono come prima linea di difesa nelle cellule esposte a uno stress chimico, trasportando le molecole tossiche all'esterno della cellula e riducendone di conseguenza la concentrazione intracellulare necessaria per provocare il danno all'organismo. Gli ABC trasportatori, ben noti e ampiamente indagati in altri animali, hanno suscitato interesse per quanto riguarda gli artropodi solo negli ultimi anni. Al momento, le indagini svolte hanno chiarito solo in parte il ruolo svolto da questi trasportatori nel complesso del defensoma, rimangono quindi diversi interrogativi irrisolti.

Questo progetto di dottorato si pone come primo obiettivo quello d'indagare approfonditamente il ruolo di queste proteine di detossificazione e la loro risposta, in termini di espressione genica, all'insetticida di sintesi piretroide, permetrina, in due specie di zanzara vettrici di malaria, *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae sensu stricto*. Una volta determinati i geni maggiormente coinvolti nei processi di detossificazione, si è posto come secondo obiettivo quello di sviluppare sistemi d'inibizione dell'espressione genica al fine di garantire una concentrazione adeguata dell'insetticida, in sede intracellulare, da cui deriverebbero sia un'intensificazione dell'azione dell'insetticida, sia la

mancata realizzazione di condizioni di sotto-dosaggio, potenzialmente favorevoli all'insorgenza di resistenze.

Per quanto riguarda *An. stephensi*, le ricerche hanno potuto trovare una base solida ed un background di confronto in lavori precedenti, in cui il grado di attivazione di un selezionato "pacchetto" di geni era già stato evidenziato in larve, in risposta al piretroide, a diversi tempi. Nel presente studio dunque abbiamo voluto indagare il pattern d'espressione degli stessi geni (sei, appartenenti alle sottofamiglie ABCB, ABCC, ABCG), correlato al tasso di mortalità, nello stadio adulto di *An. stephensi*, maschi e femmine, sottoposti al trattamento con permetrina. Le diverse pressioni selettive alle quali le molteplici forme sono sottoposte potrebbero influire sui valori e la dinamicità di espressione dei trasportatori.

In *An. gambiae* s.s. si è voluto analizzare, per la prima volta, il coinvolgimento degli stessi geni in larve, tramite duplice approccio: induzione ed inibizione aspecifica. È stato quindi evidenziato il pattern di espressione nel tempo di cinque geni ABC (sottofamiglie ABCB, ABCC, ABCG) dopo induzione sia con sola permetrina, sia in combinazione con un inibitore aspecifico dei trasportatori ABC (verapamil). Le indagini svolte nell'ambito del primo obiettivo hanno permesso di identificare il trasportatore ABCG4 come target promettente ai fini di un'inibizione dei meccanismi di difesa, sia in *An. stephensi* che in *An. gambiae*.

Il secondo obiettivo è stato perseguito attraverso esperimenti su larve di *An. stephensi*. Una prima fase di studio è consistita nella realizzazione di saggi d'inibizione attraverso siRNA specie- e sequenza-specifico. I risultati ottenuti hanno consolidato l'ipotesi di un marcato coinvolgimento di ABCG4 come prima difesa contro la permetrina nelle larve di *An. stephensi*.

La seconda fase dello studio d'inibizione ha previsto l'utilizzo di un diverso tipo di oligonucleotide antisense (Vivo-Morpholino), caratterizzato da una maggiore stabilità ed efficacia rispetto al siRNA e dunque più adatto per un eventuale utilizzo in campo. Maggiormente rispetto al siRNA, la molecola di Vivo-Morpholino ha potenziato l'azione della permetrina, permettendo di ottenere la medesima mortalità larvale in presenza di dosi ridotte d'insetticida.

In conclusione, il lavoro svolto, oltre a determinare il quadro di espressione di geni coinvolti nella detossificazione in due specie di zanzare malariche, ha percorso i primi passi verso la possibilità di sfruttare l'inibizione dell'espressione di un ABC trasportatore, per la progettazione di nuovi approcci di controllo del vettore, al fine di ridurre le dosi d'insetticidi chimici impiegati. Sarà dunque opportuno effettuare indagini più approfondite,

per lo sviluppo di larvicidi e di sistemi di *delivery* altamente ecocompatibili e dunque fruibili per future applicazioni in campo.



## ABSTRACT

---

One of the most relevant issues in biological studies is how cells and organisms are able to maintain homeostasis in an adverse environment, rich in chemical and physical stress. The survival "duty" that governs every organism once exposed to toxic agents, such as toxic endogenous chemicals or xenobiotic compounds, has resulted in the evolution of a number of gene families and pathways that are known as "chemical defensome". This integrated defence network, which enables every organism to sense, transform and eliminate toxic chemicals, has recently been subjected to deep investigations, notably in arthropods, in relation to their great economic, environmental and medical-veterinary importance. In light of the role still played by chemical compounds, as a tool for many pests control, the onset of metabolic resistance against different insecticides is a problem in term of control of harmful insects, taking risk of intensifying use of the same insecticides, causing ecological problems.

Among the main molecular mechanisms, belonging to the chemical defensome complex, the ABC transporters, are integral membrane proteins, able to detoxify the cell from different harmful compounds. They act as the first line of defence in cells exposed to chemical stress, transporting toxic molecules outside the cell and consequently reducing the intracellular concentration, necessary to cause damage to the organism. The ABC transporters, well known and extensively investigated in other animals, have recently attracted interest in arthropods. Currently, the investigations have provided a limited clarification about the role played by these transporters in the defensome complex, and a series of questions are still unanswered.

The first aim of this PhD project is to investigate in detail the role of these detoxification proteins and their response, in terms of gene expression, to the pyrethroid synthetic insecticide, permethrin, in two mosquitoes malaria vector, *Anopheles stephensi* and *Anopheles gambiae* sensu stricto. The identification of the genes most involved in the detoxification processes has allowed the subsequent development of gene expression inhibition systems, in order to ensure an appropriate concentration of the insecticide, in the intracellular area. The increase in the intracytoplasmic concentration of toxicant would allow both an intensification of the insecticide action, and the failure of under-dosage conditions achieving, that potentially promote the onset of resistance.

With regard to *An. stephensi*, the research could find a solid basis and background for comparison in previous works, where the activation level of a selected "set" of genes had already been highlighted in larvae, in response to pyrethroid, at different times.

In the present study, thus, we wanted to investigate the expression pattern of the same genes (six, belonging to the subfamilies ABCB, ABCC, ABCG), related to the mortality rate, in the adult stages of *An. stephensi*, male and female, treated with permethrin. The different selective pressures under which the multiple forms are exposed, in fact, could influence the values and the dynamism of the transporters' expression.

In *An. gambiae* s.s. we have analyzed, for the first time, the involvement of the same genes in larvae, through a double approach: induction and non-specific inhibition. It was then highlighted the pattern of expression over time of five ABC genes (subfamilies ABCB, ABCC, ABCG) after induction either with permethrin alone, or in combination with a nonspecific inhibitor for ABC transporters (verapamil).

The investigations carried out under the first aim allowed the identification of the transporter ABCG4 as a promising target for the inhibition of the defence mechanisms, both in *An. stephensi* and in *An. gambiae*.

The second aim was pursued through experiments on larvae of *An. stephensi*. A first step of study was to perform inhibition tests using species-specific and sequence-specific siRNAs. The results obtained consolidated the hypothesis of a strong involvement of ABCG4 as the first defence against permethrin in larvae of *An. stephensi*. In the second phase of the inhibition study, we have used a different type of antisense oligonucleotide (Vivo-Morpholino), characterized by greater stability and efficacy compared to siRNA and therefore more suitable for possible use in field. The Vivo-Morpholino molecule has enhanced the action of permethrin greater than siRNA, allowing to obtain the same larval mortality, at lower doses of insecticide.

Therefore, at the end of this PhD project it was possible both to draw the complex picture of genes involved in detoxification, in two important species of malarial mosquitoes, and to take the first steps towards the possibility of exploiting the expression inhibition of ABC transporters to design new vector control strategies aimed to reduce the doses of chemical insecticides. Certainly, it will be interesting to carry out more detailed investigations, in order to develop larvicides and a eco-friendly delivery system, available for future applications in field.



# INDICE

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Scopo della ricerca</b>   | 9   |
| <b>Introduzione</b>  | 13  |
| <b>1 Insetti dannosi e resistenza agli insetticidi</b>   |     |
| 1.1 Insetti dannosi d'interesse agrario e medico sanitario   | 15  |
| 1.2 Controllo degli insetti dannosi  | 18  |
| 1.3 Resistenza agli insetticidi  | 21  |
| 1.4 Resistenza metabolica: il ruolo del defensoma chimico  | 22  |
| 1.5 I trasportatori di membrana ABC  | 25  |
| <b>2 Gli insetti vettori: zanzare Anophelinae</b>  |     |
| 2.1 Vettori e malattie trasmesse da vettori  | 27  |
| 2.2 Malaria  | 28  |
| 2.3 <i>Anopheles gambiae</i> e <i>Anopheles stephensi</i>  | 31  |
| 2.4 Controllo delle zanzare Anophelinae  | 34  |
| 2.5 ABC trasportatori nei vettori anophelini   | 38  |
| <b>Articolo 1:</b> Gene expression modulation of ABC transporter genes in response to permethrin in adults of the mosquito malaria vector <i>Anopheles stephensi</i> | 41  |
| <b>Articolo 2:</b> Insecticide exposure triggers a modulated expression of ABC transporter genes in larvae of <i>Anopheles gambiae</i> s.s.                          | 63  |
| <b>Articolo 3:</b> Gene silencing through RNAi and antisense Vivo-Morpholino increases the efficacy of pyrethroids on larvae of <i>Anopheles stephensi</i>           | 87  |
| <b>Discussione e conclusione</b>   | 119 |
| <b>Referenze</b>   | 127 |
| <b>Materiale supplementare</b>   | 145 |
| <b>Altre pubblicazioni</b>   | 153 |





## **SCOPO DELLA RICERCA**

---



Questo progetto di dottorato s'inserisce in un contesto di ricerche che puntano a ridurre l'utilizzo degli insetticidi chimici impiegati nel controllo di artropodi vettori di malattie. Nello specifico, il progetto è stato condotto su due specie di zanzare, *Anopheles stephensi* ed *Anopheles gambiae* sensu stricto, annoverate tra i principali vettori di malaria a livello mondiale. Considerate le problematiche derivanti dall'insorgenza di forme di resistenza nei confronti di numerose molecole ad azione insetticida, la ricerca si è focalizzata su un particolare sistema di detossificazione, presente negli insetti, così come nella maggior parte degli organismi, costituito dalle pompe di efflusso, note come ABC trasportatori. Gli ABC trasportatori intervengono come prima linea di difesa nelle cellule esposte ad uno stress chimico, trasportando le molecole tossiche all'esterno della cellula e riducendone di conseguenza la concentrazione intracellulare necessaria per provocare il danno all'organismo. Quindi, oltre a ridurre l'efficacia dell'insetticida, l'attivazione di queste pompe di efflusso determina nei fatti un sotto-dosaggio (dosaggio sub-letale), in sede intracellulare, della molecola insetticida; ne deriva una condizione che può favorire l'insorgenza di ulteriori meccanismi di resistenza.

Nello specifico, il lavoro è stato svolto prefiggendosi due obiettivi principali: 1) determinare la risposta, in termini di espressione dei geni codificanti per ABC trasportatori, nelle due specie di zanzare, esposte ad uno specifico insetticida (permetrina); 2) sviluppare sistemi d'inibizione dell'espressione dei geni identificati come potenzialmente coinvolti nella protezione delle zanzare nei confronti dell'insetticida.

Le indagini svolte nell'ambito del primo obiettivo hanno permesso di identificare il trasportatore ABCG4 come target promettente ai fini di un'inibizione dei meccanismi di espulsione del tossico permetrina, sia in *An. stephensi* che in *An. gambiae*.

Il secondo obiettivo è stato perseguito attraverso esperimenti su larve di *An. stephensi*. Una prima fase di studio è consistita nella realizzazione di saggi d'inibizione dell'espressione di ABCG4 attraverso un siRNA specie- e sequenza-specifico. I risultati ottenuti hanno consolidato l'ipotesi di un marcato coinvolgimento di ABCG4 come prima difesa contro la permetrina nelle larve di *An. stephensi*. La seconda fase è consistita nell'esecuzione di saggi attraverso l'utilizzo di una diversa molecola di tipo oligonucleotidico, Vivo-Morpholino, specifica per l'RNA messaggero di ABCG4, caratterizzata da un maggiore stabilità ed efficacia rispetto al siRNA e dunque più adatta per un eventuale utilizzo in campo. Così come nel caso del siRNA, la molecola di Vivo-



Morpholino ha potenziato l'azione della permetrina, permettendo di ottenere la medesima mortalità larvale in presenza di dosi ridotte d'insetticida.

In conclusione, il lavoro svolto ha permesso di determinare il quadro di espressione di geni coinvolti nella detossificazione in due specie di zanzara malarica. Uno dei geni presi in esame è stato identificato come possibile target per un'inibizione specifica. I saggi eseguiti hanno effettivamente permesso di ottenere un "potenziamento" dell'azione tossica della permetrina, anche attraverso l'utilizzo di molecole potenzialmente fruibili per future applicazioni in campo.



## **INTRODUZIONE**

---



# 1 Insetti dannosi e resistenza agli insetticidi

## 1.1 Insetti dannosi d'interesse agrario e medico sanitario

Gli insetti (Insecta Linnaeus, 1758) sono tra gli organismi più comuni e diffusi sul pianeta; rappresentano circa il 60% di tutti gli animali, relativamente alle terre emerse (Tremblay, 1981), in grado di contribuire alla variabilità dell'ambiente e di avere un'influenza significativa sulle caratteristiche dell'ecosistema, al punto da rappresentare un bioindicatore della salute di quest'ultimo (Corbi et al., 2011; Ciadamidaro et al., 2016; Azmat et al., 2018). Gli insetti, inoltre, hanno una fortissima capacità di adattamento biologico che consente loro di sopravvivere in zone climatiche estremamente variabili, anche attraverso meccanismi di resistenza quali la diapausa. Il forte legame che s'instaura tra gli insetti e l'ambiente è principalmente dovuto alla loro strettissima dipendenza reciproca: i primi sono vincolati alla loro fonte di cibo (prevalentemente di origine vegetale, ma anche animale), l'ambiente, invece, deve agli insetti la possibilità di riproduzione di molte piante grazie al fenomeno dell'impollinazione (Sarwar et al., 2016).

Quello che intercorre invece tra insetti e uomo è un rapporto di gran lunga più recente. Negli ultimi secoli, quest'ultimo ha tentato di modificare su larga scala l'ambiente, nell'ottica di sfruttare i benefici che gli insetti possono offrire. La necessità, infatti, di aumentare il numero d'insetti utili e/o diminuire il numero di quelli dannosi si è presentata recentemente con l'avvento di una serie di problematiche sociali ed economiche che includono la domanda alimentare associata all'aumento demografico, l'urbanizzazione, il trasporto di prodotti e di persone e la tendenza alla monocoltura. Contributo limitato se pensiamo che solo l'1%, di un insieme di circa 5-10 milioni di specie d'insetti, interagisce con gli esseri umani, direttamente o indirettamente (Gillot, 2005).

È stato osservato che l'attività degli insetti può avere un duplice effetto, che coinvolge sia la produzione, che la salute pubblica. Da un lato, essi possono fornire benefici attraverso *servizi ecosistemici* (ES), come l'impollinazione o la predazione e il parassitismo indirizzato verso parassiti ancora più dannosi (Garibaldi et al., 2013; Lamarque et al., 2014). Dall'altro, possono infliggere costi, attraverso danni diretti alle colture che causano perdite nel reddito agrario (Murray et al., 2013) o possono rallentare la crescita economica dei paesi in via di sviluppo, attraverso costi sanitari diretti e indiretti, quali la perdita di produttività e turismo (CDC). Secondo le stime riportate negli ultimi anni, insetti e acari avrebbero determinato perdite annue nei raccolti, a livello globale, pari al 18-20%, per un valore di oltre 470 miliardi di dollari (Sharma et al., 2017). Lo scenario risulta spesso

complesso da dirimere, poiché gli insetti possono rivestire il ruolo di prede, predatori o parassiti, oltre che di riciclatori di materiale in decomposizione. Al fine di una piena comprensione dei processi ecologici e del raggiungimento di un beneficio netto complessivo, sia in un contesto agrario, sia sanitario, è dunque sempre necessario valutare il margine sottile che intercorre tra organismo utile e dannoso.

In particolare, è stato conferito l'appellativo di "*pests*" a quelle specie che hanno sviluppato e ottimizzato la loro capacità parassitaria, sfruttando l'ospite, sia esso flora o fauna, fino a portarlo all'indebolimento o addirittura alla morte (Sarwar et al., 2016).

Gli organismi dannosi, in grado cioè di arrecare danno alle coltivazioni, ai prodotti alimentari o ad altri prodotti d'interesse per l'economia e, non ultimo alla salute pubblica, vengono comunemente definiti con l'appellativo di *pests* (Rajendran and Singh, 2016). I *pests*, spesso, sono specie che hanno sviluppato e ottimizzato la loro capacità parassitaria, e sono in grado di sfruttare l'ospite, sia esso vegetale o animale, fino a portarlo all'indebolimento o, in alcuni casi, alla morte (Sarwar et al., 2016). Fra essi, alcuni *pests* possono condurre una vita parassitaria per l'intera durata del ciclo vitale, mentre in altri è limitata soltanto a determinate fasi del ciclo vitale; un esempio esplicativo è quello dei lepidotteri, che allo stadio larvale possono essere parassiti altamente dannosi per le colture, mentre in età adulta sono utili impollinatori (Nsibande, 1999; Saunders et al., 2016).

Una categoria importante nell'ambito dei *pests*, è rappresentata dai vettori, ossia organismi in grado di trasmettere agenti patogeni di diverse malattie sia ad ospiti vegetali che animali. In ambito vegetale, ad esempio, fitopatie infettive legate ai vettori sono state documentate sia in ecosistemi antropizzati, che naturali: si stima che circa 180 specie di afidi siano in grado di trasmettere 164 specie diverse di virus, mentre 151 diverse specie di cavallette siano in grado di trasmettere 55 virus e altri 40 microrganismi (Kiritani et al., 1987). La trasmissione di tali agenti eziologici avviene grazie ad organismi appartenenti prevalentemente a due ordini, i Thysanoptera (Tisanotteri), principali responsabili della diffusione di *Thrips tabaci* e *Frankliniella fusca* (Nault, 1997; Sarwar et al., 2018), e soprattutto gli Hemiptera (Omotteri), tra cui compaiono gli afidi, i pidocchi delle piante (Aphidoideae) e le aleurodidi o mosche bianche (Aleyrodidae). Queste ultime due famiglie rientrano tra gli insetti fitomizi (che si nutrono di linfa delle piante) di maggiore interesse economico, a causa della loro diffusione cosmopolita e della capacità di veicolare numerosi agenti patogeni, prevalentemente virali (Tremblay, 1985).

Per quanto riguarda invece malattie infettive zoonotiche (malattie trasmesse tra animale e uomo) o le antroponosi (malattie trasmesse tra esseri umani), la maggior parte dei vettori responsabili sono insetti ematofagi che durante i pasti di sangue ingeriscono i microrganismi da un ospite infetto (umano o animale) e li trasmettono a un nuovo ospite, attraverso il pasto successivo. Tra i vettori ematofagi più importanti figurano le zanzare, ma anche zecche, mosche, flebotomi, pulci e triatomine. Questi vettori sono coinvolti nella trasmissione di svariate patologie quali malaria, febbre gialla, tifo, peste, febbre dengue, varie forme di encefalite, febbre recidivante, cecità dei fiumi, filariosi linfatica, malattia del sonno e innumerevoli altre malattie debilitanti o addirittura mortali, non solo in climi caldi ma anche in quelli temperati (Resh and Cardé, 2009). Stime raccolte dalla World Health Organization (WHO) mostrano che più del 17% dei casi d'infezioni nell'uomo, responsabili di oltre 700.000 decessi l'anno, sono da attribuirsi proprio ad agenti trasmessi da artropodi vettori (WHO, 2017).

La relazione che intercorre tra vettore e patogeno, sia nel mondo vegetale, sia in quello animale, è spesso caratterizzata da un certo grado di specificità, che influenza la capacità di trasmissione del patogeno stesso, e dunque la potenziale insorgenza della malattia (Creamer et al., 2005). Talvolta questa specificità porta a fenomeni di manipolazione biologica, messi in atto dal patogeno nei confronti del relativo vettore, al fine di migliorare l'efficienza della sua trasmissione. E' stato osservato, che alcuni agenti eziologici, come i virus, aumentano la concentrazione di amminoacidi disponibili, modificando la fisiologia dell'afide vettore da cui sono veicolati, portando così ad un aumento della loro capacità riproduttiva. Queste alterazioni dirette, che portano a una maggiore possibilità di diffusione della malattia, risultano funzionali sia al patogeno che al vettore, al punto da poter affermare che il rapporto tra i due organismi sia di tipo mutualistico (Tremblay, 1981; Gadhavé et al., 2019). In altri casi, invece, le alterazioni possono essere di tipo indiretto, mediate ad esempio dalla pianta ospite condivisa da vettore e patogeno: attraverso la manipolazione delle emissioni ormonali della pianta o l'inibizione della comunicazione fito-mediata, una pianta infetta viene resa più attrattiva (Eigenbrode et al., 2018; Wu et al., 2019).

Nell'attuale momento storico, le malattie trasmesse dai vettori costituiscono un serio problema, soprattutto a causa del coinvolgimento globale a cui stiamo assistendo. I viaggi, il commercio a livello globale e l'urbanizzazione non pianificata stanno avendo un impatto notevole sulla trasmissione degli agenti patogeni, rendendo l'originaria stagione di trasmissione più lunga o più intensa, e causando l'insorgenza di malattie anche in paesi in

cui prima non erano mai state registrate (Chaves and Koenraadt, 2010). A questo si aggiungono i cambiamenti nelle pratiche agricole, dovuti alla variazione della temperatura e delle precipitazioni, che possono ulteriormente favorire la diffusione di malattie a trasmissione vettoriale. Al fine di arginare tali problematiche, constatata l'impossibilità di controllare la diffusione delle patologie mirando direttamente all'agente eziologico su vasta scala, poiché spesso non sono disponibili vaccini, lo strumento più efficace di cui si dispone rimane tutt'ora il controllo della densità del vettore.

## 1.2 Controllo degli insetti dannosi

Il controllo degli *insect pest* è un elemento fondamentale ed imprescindibile per prevenire o arginare la diffusione degli agenti eziologici e delle malattie ad essi correlate. Tenendo in considerazione, infatti, che gli insetti-vettori hanno una capacità di moltiplicazione molto rapida sia "indoors", che "outdoors", risulta indispensabile mettere in atto piani di controllo ed eradicazione efficienti, che agiscano miratamente al presentarsi dei primi "sintomi" o in modo preventivo nelle zone di maggior rischio (Nelson and Bushe, 2006). I metodi e i protocolli utilizzati per il controllo di tali vettori possono essere di varia natura e possono essere raggruppati in tre categorie:

Metodi chimici: prevedono l'impiego di specifici composti chimici, pesticidi e insetticidi, di origine naturale o sintetica (es. repellenti, attrattori, ferormoni, fagodeterrenti). Questi vengono solitamente applicati in modo complementare, in seguito a necessari accertamenti sulla loro efficacia biologica (inclusa l'attività residua), sulla suscettibilità dell'organismo target, sulle dosi di applicazione e sulla tossicità verso l'uomo e l'ambiente (WHO, 2012);

Metodi biologici: sono basati sull'introduzione di nemici naturali o di altri insetti alloctoni e/o sulla dispersione di patogeni o tossine prodotte da patogeni (Can Ulu et al., 2016), tra cui i batteri, es. *Bacillus thuringensis*; virus, es. Baculovirus (D'Amico et al., 2016); e funghi, es. *Beauveria bassiana* (Mahr, 2008) o *Metarhizium spp*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Purpureocillium lilacinus* (Fry, 2012).

Metodi fisici: possono essere attivi (shock termico, radiazioni elettromagnetiche, shock meccanico e pneumatico) e passivi (trappole, immagazzinamento ermetico dei prodotti alimentari, zanzariere) (Vincent et al., 2008).

I metodi chimici, basati sull'utilizzo d'insetticidi, sono ad oggi l'approccio più utilizzato per il controllo di *pests* di varia natura, poiché permettono di ridurre o eliminare totalmente la popolazione di organismi nocivi anche su vasta scala. Riferendoci agli insetti, in commercio sono disponibili più di 1000 formulazioni differenti d'insetticidi, che possono dividersi in sei gruppi, in base alla loro composizione chimica: Organofosforici, Policlorinati, Carbammati, Neonicotinoidi, Piretroidi e altri. La maggior parte degli insetticidi sintetici oggi in uso sono neurotossici, dunque in grado di penetrare negli organismi bersaglio tramite contatto o ingestione e colpire il sistema nervoso, provocando il rapido abbattimento e morte del *pest target*. I composti più comunemente utilizzati si basano sull'attività inibitoria della colinesterasi (organofosfati e carbammati), seguiti dai composti piretroidi e da sostanze chimiche di più recente utilizzo, come i neonicotinoidi (Zalom et al., 2005).

In molti casi, per diversi anni, l'impatto d'interventi basati sull'uso massiccio d'insetticidi di sintesi ha riscosso un successo straordinario. Un esempio è il dimezzamento tra il 2000 e il 2015 del numero di decessi a causa della malaria (Roser and Ritchie, 2019), trasmessa da zanzare anopheline; l'80% di questo risultato è da attribuirsi agli interventi di controllo chimico del vettore, attuati su vasta scala (WHO, 2017). Tuttavia, i notevoli progressi sperimentali nello sviluppo di nuovi prodotti e servizi, fruibili per la lotta chimica, sono da controbilanciare con un preoccupante aumento dell'inquinamento ambientale e con la difficile identificazione di un composto che presenti un'elevatissima specificità per il bersaglio, tale da non nuocere a organismi non target o da non danneggiare l'ambiente.

A oggi, l'introduzione sul mercato di un elevato numero di nuovi composti chimici sembra non essere andata di pari passo con lo studio della tossicologia ambientale. Tale fenomeno è dovuto sicuramente anche all'impatto "ritardato" che alcune sostanze hanno sull'ambiente e dunque all'insorgenza di conseguenze negative, dovute al loro rilascio, solo dopo anni dalla loro somministrazione (Aktar et al., 2009; Ansari et al., 2014). Un chiaro esempio di questo fenomeno è costituito da i composti organoclorurati (es. DDT) che, utilizzati come cavallo di battaglia nella lotta contro insetti vettori d'importanti malattie fino alla metà degli anni '70, sono stati successivamente vietati e ritirati dal commercio a causa della loro elevata tossicità per l'uomo e per gli animali domestici. Nonostante la loro rimozione, vi è tuttora una parziale esposizione della popolazione a questi composti tossici, data la loro elevata persistenza ambientale e dato l'attuale impiego di alcuni composti derivati in quei paesi in cui rappresentano ancora l'unica arma efficace per prevenire l'insorgenza di malattie (Costa et al., 2008).



Come ripiego, negli ultimi decenni, le aziende chimiche hanno abbandonato la produzione di sostanze lipofile, facilmente accumulabili negli organismi, per lasciare il posto a composti sintetici idrofili. L'introduzione di tali pesticidi sintetici "sistemici" ha apportato notevoli vantaggi, tra cui un assorbimento facilitato da parte delle piante e degli animali, una distribuzione più efficiente attraverso i tessuti, senza portare però all'accumulo della sostanza tossica in organi o tessuti (es. tessuto adiposo) (Sánchez-Bayo and Ortega, 2012). Recentemente, inoltre, sostanze di tipo ormonale, quali regolatori di crescita e del metabolismo degli insetti, si stanno gradualmente sostituendo ai tradizionali insetticidi neurotossici, al fine di eliminare l'effetto ad ampio spettro di questi ultimi che risulta potenzialmente nocivo per la fauna selvatica (Konradsen et al., 2003, Mineau and Whiteside, 2006). Con la stessa finalità, nell'ultimo decennio, sono stati introdotti anche pesticidi a base vegetale, sia in forma grezza sia attraverso la trasformazione in diverse formulazioni (Horowitz and Ishaaya, 2004). Questi vengono chiamati insetticidi "botanici" o "naturali" ed hanno la caratteristica di sfruttare alcune proprietà repellenti, *antifeedant*, e di regolazione della crescita di alcune piante (come il Neem dalla *Azadirachta indica*, il Nicotin-solfato dal Tabacco, il Piretrio o Piretrine dal crisantemo, il Rotenone dalle leguminose e Ryania, estratti del giglio di Sabadilla). Questi composti hanno il vantaggio di garantire una più facile degradabilità, nessun bio-accumulo nel terreno o nell'acqua, e una tossicità quasi nulla per l'uomo. L'unico aspetto negativo è rappresentato dall'azione più lenta, nonostante le dosi più elevate, e dunque dall'aumento dei costi, senza la garanzia di un'immediata risoluzione del problema (Sarwar et al., 2015).

In generale, si può affermare che, nonostante il primo passo per il controllo delle malattie trasmesse dai vettori si basi su un'eliminazione drastica dell'insetto tramite sostanze tossiche insetticide, tale metodo dovrebbe tuttavia essere applicato in accordo con i principi di una gestione di tipo integrato dei vettori (IVM). Con il termine "programma di gestione integrata" s'intende un approccio sostenibile che include componenti chimiche, fisiche e biologiche, implementato da un programma di sorveglianza ben strutturato, in grado di razionalizzare l'uso dei metodi e delle risorse per il controllo dei vettori, adattandosi ai contesti locali e coinvolgendo le comunità interessate (WHO, 2006; WHO, 2012). Un esempio potrebbe essere fornito da una necessaria sorveglianza per l'individuazione rapida di specie esotiche invasive (IAS), per evitare l'insediamento della specie o per valutare l'efficacia delle misure di controllo messe in atto e il rischio di trasmissione di agenti patogeni a essa correlata, con conseguente comparsa di nuove malattie infettive (Emerging Infectious Diseases, EID) (Ogden et al., 2019). Con

l'applicazione di questi programmi integrati sarebbe possibile rendere più organizzato e dunque mirato ed efficace il piano di eradicazione di certe malattie, grazie ad una calibrazione ponderata delle dosi d'insetticida da somministrare in un'area circoscritta, ottenendo di conseguenza una riduzione dell'insorgenza di forme di resistenza nel vettore target e non solo. Come ampiamente dimostrato, infatti, l'abuso di pesticidi chimici ha portato negli anni alla comparsa di diffuse forme di resistenza, con conseguente collasso dei programmi di controllo sostenibili di un gran numero di insetti nocivi, e dunque diffusione di nuove malattie trasmesse da vettori e/o re-emergenza di vecchie patologie. Per fronteggiare questo problema emergente, l'unica soluzione è comprendere l'origine, la diffusione e il persistere della resistenza e i relativi meccanismi di base che la inducono (Naqqash et al., 2016).

Tra le componenti fondamentali per un efficace programma IVM o IPM (*integrated pests management*) sono sicuramente da integrare le conoscenze sui meccanismi molecolari alla base della resistenza agli insetticidi, all'interno di programmi che prevenano, rallentino o consentano di superare l'insorgenza stessa della malattia. L'identificazione e la convalida di quei geni o di quelle mutazioni specifiche associate alla resistenza consentirebbero di sviluppare tecniche di diagnostica molecolare da impiegare per il monitoraggio della distribuzione e della frequenza degli alleli resistenti in popolazioni naturali (Hsu et al., 2006; Ranson et al., 2011).

### 1.3 Resistenza agli insetticidi

La resistenza agli insetticidi è un fenomeno che può essere determinato dall'azione di diversi meccanismi molecolari. In virtù del meccanismo che ne determina l'insorgenza è possibile classificare la resistenza in:

**Resistenza metabolica:** tale forma è legata a una maggiore efficienza nel processo di detossificazione, che consente agli individui resistenti di espellere o degradare/modificare chimicamente la tossina più rapidamente degli individui sensibili. Quest'attività è svolta da un elevato numero di enzimi che, nell'insieme, rappresentano un efficace sistema di difesa a livello cellulare, noto come "defensoma chimico". I ceppi resistenti possono avere un numero più elevato di enzimi o forme più efficienti, che, il più delle volte, sono in grado di agire nei confronti di un ampio spettro d'insetticidi.

**Resistenza nel sito target:** è legata a mutazioni puntiformi non sinonime che insorgono all'interno del sito-target dell'insetticida, a seguito delle quali viene impedito il legame

“molecola-recettore”. Negli individui resistenti, dunque, l’azione tossica della molecola insetticida subisce una perdita in termini di spettro di efficacia per l’organismo.

**Resistenza alla penetrazione:** è una forma di resistenza dovuta allo sviluppo di barriere a livello della cuticola esterna, che rallentano l’ingresso delle molecole tossiche nelle cellule. Spesso questo tipo di resistenza si osserva in combinazione con le altre forme di resistenza.

**Resistenza comportamentale:** si basa sullo sviluppo di un sistema di riconoscimento del pericolo. Questo fenomeno di difesa porta l’insetto a smettere di nutrirsi o ad allontanarsi dalla zona di somministrazione (ad esempio, possono spostarsi verso la parte non irrorata della foglia, spostarsi più all’interno della chioma della pianta o volare via dall’area soggetta a trattamenti).

#### 1.4 Resistenza metabolica: il ruolo del defensoma chimico

Tutti gli organismi possiedono un complesso sistema di difesa cellulare, noto come “defensoma chimico” (Goldstone et al., 2006) (Fig.1), evolutosi in risposta ai composti xenobiotici naturali a cui gli organismi sono costantemente esposti, quali prodotti microbici, metalli pesanti, fitotossine, composti naturali policiclici di derivazione biogenica, idrocarburi aromatici e composti organici alogenati. Il defensoma è costituito da una rete integrata di geni e *pathways* biochimici, che costituiscono il 2-3% del genoma delle specie, e tra le quali mostrano un elevato grado di conservazione (Steinberg et al., 2012).

Al suo interno si distinguono recettori solubili e altri fattori di trascrizione ligando-dipendenti, che agiscono come sensori di sostanze tossiche o di danni cellulari; enzimi di riduzione, coniugazione o biotrasformazione, che trasformano le sostanze chimiche in prodotti/metaboliti meno tossici e di facile escrezione; pompe ad efflusso in grado di trasportare attivamente i substrati all’esterno della cellula; enzimi antiossidanti di protezione contro specie reattive dell’ossigeno (ROS) esogeni ed endogeni o contro altri radicali.

Nel processo di detossificazione, l’azione del defensoma si articola in quattro fasi (0-III), classificate in base al differente processo metabolico e agli enzimi coinvolti. Nella prima fase (fase I), il composto xenobiotico penetrato nella cellula a livello del citoplasma viene ridotto ed idrolizzato da complessi enzimatici al fine di, renderlo idrofilico e pronto per l’inattivazione o l’eliminazione. Gli enzimi coinvolti in questa fase sono flavo-proteine

monossigenasi (FMO) e diversi membri delle famiglie del Citocromo P450 (famiglia CYP1, CYP2, CYP3, CYP4). Nella seconda fase, definita come fase II, entrano in gioco enzimi quali le glutathione-S-transferasi (GSTs), le sulfotransferasi (SULTs), l'UDP-glucuronosyl transferasi (UGTs), la N-acetyl transferasi (NATs), che provvedono a una reazione di prima o seconda coniugazione con il glutathione o altre molecole idrofiliche; le aldo-keto rettasi (AKRs), le epossido idrolasi (EPHXs) e le NAD(P)H-quinone ossidoreduttasi (NQOs) sono responsabili della riduzione ed idrolizzazione del tossico (Goldstone et al., 2006).

All'estremità del processo di detossificazione, dunque nelle fasi 0 e III, l'azione detossificante principale è a carico dei trasportatori di membrana ABC (ATP Binding Cassette), particolari pompe di efflusso *multidrug* ATP-dipendenti, che costituiscono la "prima linea di difesa cellulare" (Dean et al., 2001). L'importanza di questi trasportatori di membrana, scoperti solo successivamente agli altri componenti del defensoma, nel 1990, è data dalla loro duplice azione sia di immediata espulsione delle sostanze tossiche che penetrano nella cellula, al fine di ridurre la loro concentrazione intra-citoplasmatica (fase 0), sia di eliminazione di quelle sostanze che, penetrando e perdurando nella cellula, sono state processate dagli enzimi di detossificazione che agiscono nelle fasi I e II (fase III) (Dermaw et al., 2014). Il processo di detossificazione si presenta dunque con un complesso *interplay* di diverse famiglie enzimatiche, ognuna delle quali svolge una precisa azione nel metabolismo delle sostanze tossiche. All'interno di tale metabolismo si aggiunge l'azione di enzimi anti-ossidanti quali, superossido dismutasi (SODs), catalasi (CATs) e perossidi, incluso glutathione perossidasi (GPXs) e tioredossina (TXNs), il cui compito critico è quello di difendere i componenti lipidici, proteiche e nucleotidiche cellulari, dall'azione nociva dei ROS esogeni ed endogeni.

Studi di trascrittomici hanno messo in evidenza il ruolo che il defensoma esercita nella difesa ai composti tossici e nell'insorgenza della resistenza. Tramite l'analisi dell'intero trascritto di alcuni *insect-pests* è stato possibile osservare, sotto induzione con diversi insetticidi, i pattern di attivazione e disattivazione di migliaia di geni che costituiscono il defensoma, mettendo in luce anche l'importanza di alcune famiglie, fino a quel momento considerate di secondo piano, quali Heat Shock Proteins (HSPs) e le Cuticular Proteins (CPs) (Steinberg et al., 2012, Lv et al., 2016).

La resistenza metabolica, che comporta la sovraespressione, o l'aumento della capacità catalitica degli enzimi metabolici, è un meccanismo complesso da trattare a causa delle numerose interazioni geniche che lo regolano. Al contempo, recentemente è stato

possibile associare numerose forme di resistenza per diverse classi di insetticidi a membri di diverse famiglie genetiche del defensoma in numerose specie di vettori. Tale associazione ad esempio è stata resa possibile per le carbossi/colinesterasi, glutatione S-transferasi (GSTs) e citocromo P450 monossigenasi (P450s) in diverse specie di zanzare, vettori di importanti malattie (Hemingway et al., 2004; David et al., 2013; Pavlidi et al., 2018).

Queste analisi, se pur precise, vengono spesso effettuate a singolo time-point e dunque forniscono una visione riduttiva del processo di detossificazione dell'organismo e non chiariscono come l'espressione dei diversi enzimi venga "orchestrata" o modulata sia nel tempo, sia in seguito a molteplici somministrazioni del tossico. Un'analisi della dinamica temporale dell'espressione dei diversi *defensome genes* aiuterebbe a comprendere le loro interazioni e a valutare se la loro attività si può inserire nel contesto di una rete con regolazione incrociata, dove ogni membro risponderebbe alla presenza e all'attivazione del partner della stessa famiglia di geni o di altre famiglie (Epis et al., 2014b).

Allo stesso modo, alcune indagini effettuate su profili di espressione durante lassi di tempo prolungati sono state effettuate sempre su limitati sottoinsiemi di geni: per la zanzara *Culex quinquefasciatus*, ad esempio, sono stati tracciati i profili di espressione a 12, 24, 48 e 72 ore di esposizione alla permetrina, per molteplici geni Citocromo P450, evidenziando una co-regolazione nei ceppi resistenti (Liu et al., 2011, Gong et al., 2013).

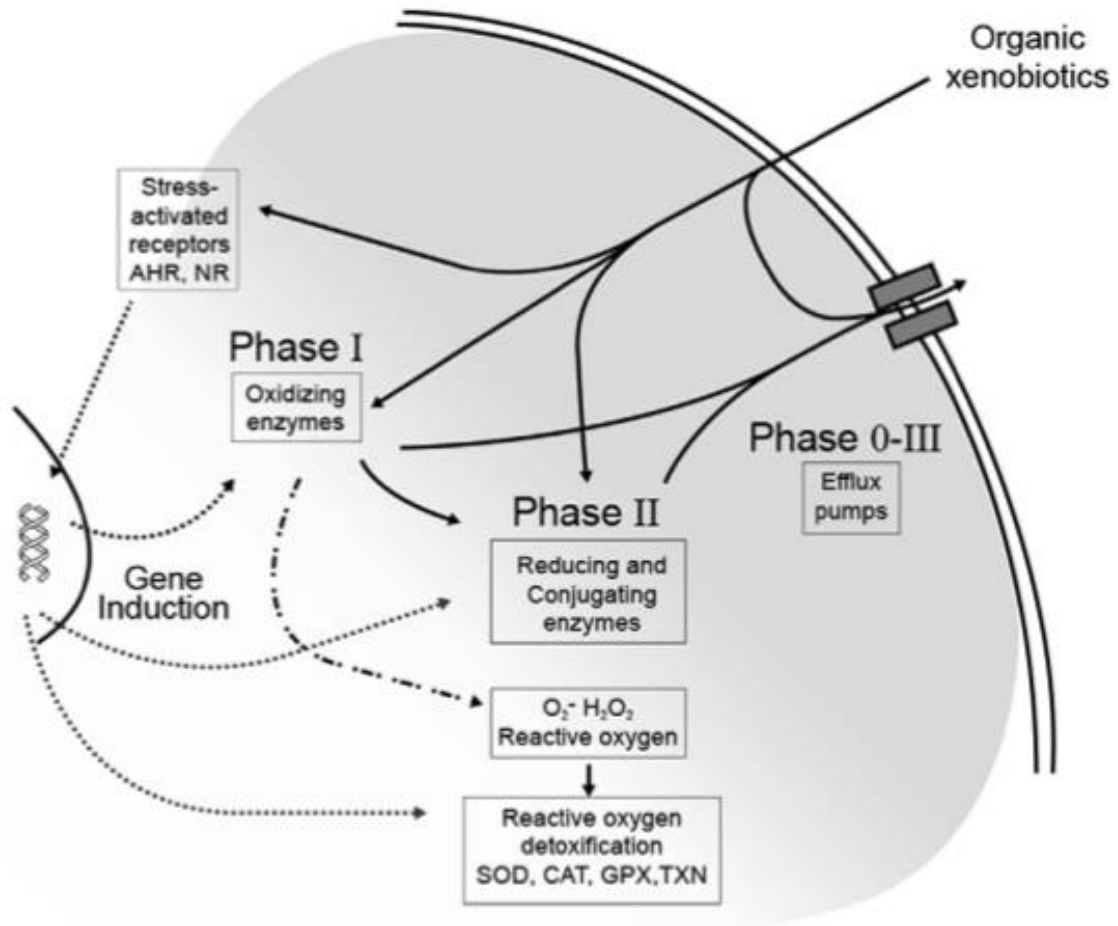
Come viene messo in chiaro nella review di K. Narayanan (2004) bisogna considerare che le popolazioni di *pests*, sottoposte in passato all'azione di organoclorurati, organofosfati, carbammati, piretroidi e regolatori di crescita: i) saranno sempre in grado evolvere in nuove forme di resistenza e di superare l'azione inizialmente devastante del tossico sulla popolazione, ii) alcune specie di insetti vettori sono particolarmente inclini a sviluppare tali forme di resistenza, iii) l'uso di nuove tecniche di controllo, che parrebbero rivoluzionarie in un primo momento, andrebbero sempre applicate in un programma che si affidi a più metodiche combinate tra loro (es. azione sinergica dei tossici) al fine di "depistare" l'azione metabolica difensiva del *pest target*. Questo vale anche per biopesticidi come il *Bacillus thuringiensis* (Bt) che, usato ad alte dosi singolarmente, ha indotto rapidamente la resistenza in diverse specie d'insetto (*Plutella xylostella*; "Indian meal moth", *Plodia interpunctella*; "American boll worm of cotton", *Heliothis virescens*; "Oriental boll worm of cotton", *H. armigera*; "beet army worm", *Spodoptera exigua*; "tobacco caterpillar", *S. litura*).

## 1.5 I trasportatori di membrana ABC

I trasportatori di membrana ABC rappresentano, come accennato sopra, uno dei meccanismi di difesa cellulare più importanti che possiedono gli organismi per metabolizzare le sostanze xenobiotiche. Dal punto di vista strutturale, queste proteine sono costituite da un dominio nucleotidico citosolico di legame (NBDs) altamente conservato, che idrolizza l'ATP, e un dominio integrale transmembrana (TMDs) variabile, che determina la specificità per il substrato. In base al numero di dominio nucleotidico citosolico di legame e dei domini trans-membrana, i trasportatori ABC possono essere distinti in *half transporters* (HTs), se contengono solo un NBD e un TMD, e *full transporters* (FTs), se contengono due copie di ciascuno di essi, a formare omo- o eterodimeri.

Scoperti nell'uomo, a seguito di studi relativi alla resistenza ai farmaci nelle cellule tumorali, tali proteine sono presenti in tutti gli organismi viventi, dai batteri all'uomo (El-Awady et al., 2017). Da un punto di vista funzionale, essi agiscono come pompe di efflusso ATP-dipendenti, in grado dunque di trasportare una grande varietà di substrati attraverso la membrana contro gradiente di concentrazione (Driessen et al., 2000). Questa capacità conferisce loro un importante ruolo in svariate e precise attività cellulari come: il trasporto di pigmenti oculari (Mackenzie et al., 1999), lo sviluppo della pigmentazione nell'epidermide (Wang et al., 2014), il trasferimento lipidico nella cuticola (Broehan et al., 2013), il controllo della biosintesi delle proteine (Dean et al., 2001), oltre che la detossificazione da xenobiotici. Negli artropodi, generalmente, si osservano dalle 50 alle 100 diverse proteine ABC, incluse quelle sia a trasporto *half*, che a trasporto *full* (HTs e FTs), suddivise in otto sottofamiglie (ABCA-ABCH) (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Tra le diverse sottofamiglie di trasportatori ABC, tre sono quelle coinvolte nella detossificazione dei composti xenobiotici: la sottofamiglia ABCB (o p-glicoproteine, PGP) (Ambudkar et al., 1999), la sottofamiglia ABCC (o proteine di resistenza ai farmaci, MRP) (Cole e Deeley, 1998) e la sottofamiglia ABCG (o proteine di resistenza multixenobiotica, MXR) (Sarkadi et al., 2004). Negli artropodi il loro coinvolgimento nella difesa/resistenza agli insetticidi è stato messo in evidenza in alcune specie, quali *Drosophila melanogaster* (Dean et al., 2001), *Anopheles gambiae* (Liu et al., 2011), *Bombyx mori* (Liu et al., 2011), *Tribolium castaneum* (Broehan et al., 2013), *Acyrtosiphon pisum* (Wang et al., 2014), e *Locusta migratoria* (Wang et al., 2014). Tuttavia, ancora oggi, è raro trovare confronti tra le specie tassonomicamente affini riguardo i trasportatori ABC, motivo per cui sarebbe anche importante confrontare le informazioni derivanti dalle banche dati dei genomi a disposizione per analizzare le posizioni comparative e le relazioni filogenetiche dei geni

trasportatori ABC tra le diverse specie *pests*/vettori e comprenderne più a fondo le funzioni.



**Fig.1:** Rappresentazione grafica del defensoma chimico. Nella figura vengono rappresentati tutti gli enzimi metabolici di detossificazione e le vie coinvolte (Goldstone et al., 2006).

## 2. Gli insetti vettori: zanzare Anophelinae

### 2.1 Vettori e *Vector Borne Diseases* (VBD)

Tra gli *insect-pests* più infestanti e dannosi a livello di salute pubblica, le zanzare rivestono un ruolo di notevole importanza, tanto da essere considerate fra gli organismi più letali per l'uomo (WHO 2017). Secondo alcune stime, questi artropodi sarebbero responsabili di oltre un milione di morti l'anno, a causa della loro capacità di trasportare e diffondere patogeni di diversa natura. Tra le malattie trasmesse da zanzare e causate da agenti quali batteri, virus o parassiti, si possono ricordare dengue, febbre gialla, West-Nile, chikungunya, zika, filariosi e malaria (WHO 2017). La trasmissione dei patogeni non si limita solo all'uomo ma include anche diversi animali come il cane, soggetto a filariosi, e il cavallo, sensibile a West Nile virus (WNV) e ad encefalite equina orientale (EEE). Per entrambe le ultime viriosi, i patogeni possono essere trasmessi facilmente anche all'uomo: nell'ultimo anno 34 stati hanno riportato infezioni da West Nile virus (WNV, famiglia *Flaviviridae*) nell'uomo, in uccelli o zanzare (nel 2018 sono stati segnalati 2.647 casi di WNV nell'uomo e di questi, 167 (6,3%) hanno portato al decesso degli individui); mentre per la EEE la letalità del 90% riscontrata nei cavalli si traduce in un 33% circa di mortalità nell'uomo, rappresentando il tasso più alto tra i casi d'infezione da arbovirus nell'uomo. Si può osservare come la EEE sia una patologia meno comune nell'uomo rispetto all'animale, per il semplice fatto che il vettore, *Culiseta melanura*, non è solito alimentarsi sull'uomo ma predilige volatili ed equini, diversamente da WNV che ha come vettori "antropofagi" *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, e *Culex quinquefasciatus*.

La zanzara vettore, pur trasmettendo la malattia, in diversi casi non viene danneggiata dalla presenza del patogeno all'interno dell'organismo; come ad esempio avviene nelle zanzare vettrici di alcuni arbovirus. Gli arbovirus (arthropod-borne viruses) rappresentano il vasto insieme di patogeni che comprendono Dengue virus (DENV, famiglia *Flaviviridae*), West Nile virus (WNV) e chikungunya virus (CHIKV, famiglia *Togaviridae*), di cui è stata dimostrata non solo la trasmissione orizzontale ma anche quella verticale dalla femmina infetta alla progenie (Lequime and Lambrechts, 2014). E' stato osservato come la zanzara sia in grado di difendersi dai virus grazie: (i) alla presenza di un microbioma vettoriale che, essendo stato progressivamente alterato dalla presenza del virus, è in grado di alterare/influenzare il processo d'infezione degli arbovirus (Dennison et al., 2014), (ii) all'attivazione del sistema immunitario innato della zanzara (Huang et al., 2019). In particolare, sistema immunitario della zanzara è in grado di rendere il virus inerte,

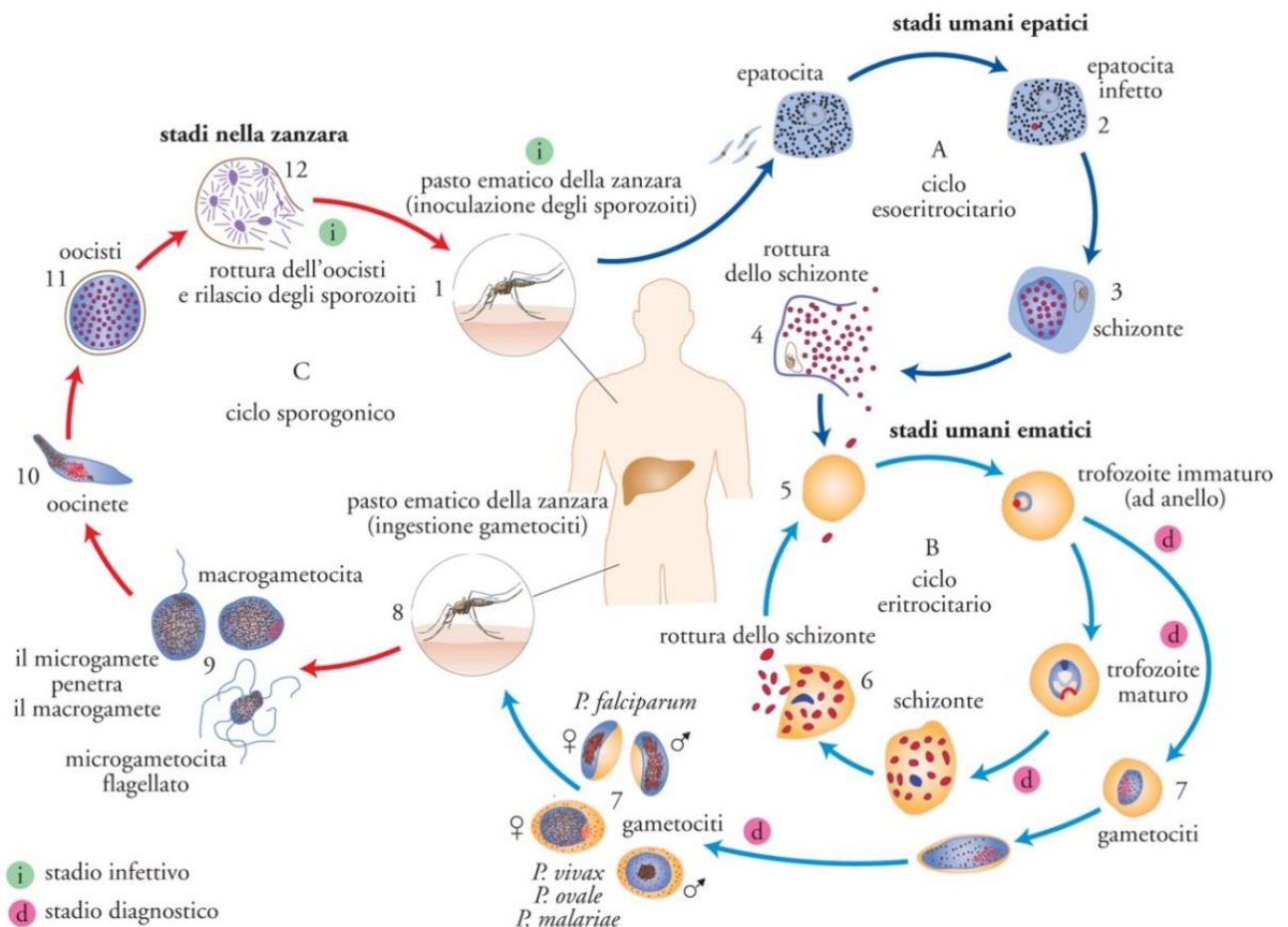


riconoscendo i virioni come materiale non-self e inducendone il taglio, attraverso l'attivazione di specifici pathway (es. RNAi). L'infezione nell'uomo dunque avviene quando la femmina compie il pasto di sangue mentre il suo sistema immunitario è ancora in procinto di distruggere la porzione codificante e dannosa del virus (Locke, 2008). Per quanto riguarda invece la trasmissione di patogeni eucarioti, i meccanismi che permettono alle zanzare di sopravvivere all'infezione, e quindi di determinare la trasmissione del patogeno, in generale sono poco noti. D'altra parte diversi studi hanno dimostrato che il parassita eucariota della malaria, *Plasmodium falciparum*, è in grado di alterare il normale comportamento alimentare del vettore, inducendo un aumento della frequenza di punture nelle zanzare infette e incrementando così la possibilità di trasmissione del parassita (Koella et al., 1998). A maggior ragione, a livello sanitario, le malattie trasmesse da zanzare (*Mosquito-borne diseases o mosquito-borne illnesses*) hanno assunto una priorità globale a causa anche della frequente recrudescenza di grandi epidemie e della loro espansione geografica senza precedenti, avvenuta negli ultimi decenni (WHO 2017). A dimostrazione di ciò, la malaria, trasmessa da zanzare esclusivamente del genere *Anopheles*, è stata la causa di 435.000 morti e più di 219 milioni di casi nel 2017; la dengue ha aumentato la sua incidenza di 30 volte solo negli ultimi 30 anni ed in diversi paesi sono stati segnalati anomali focolai di malattie trasmesse dalla zanzara *Aedes*, quali zika, dengue, chikungunya e febbre gialla (Gubler et al., 2002).

## 2.2. Malaria

Tra le malattie trasmesse da vettori più preoccupanti a livello sanitario spicca la malaria, una parassitosi provocata da protozoi appartenenti al genere *Plasmodium*, che viene trasmessa da zanzare del genere *Anopheles* ed è presente, in forma endemica, in più di 55 paesi nel mondo. Attualmente si conoscono quasi 200 specie di *Plasmodium* in grado di infettare diverse tipologie di ospiti, tra cui roditori, uccelli e rettili. Le quattro specie note come parassiti dell'uomo (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*) hanno cicli sostanzialmente simili; tuttavia le principali differenze si riferiscono alla velocità dei processi moltiplicativi, al numero di parassiti prodotti nelle diverse fasi di replicazione e alla patogenicità per l'uomo. Si tratta di specie che infettano solo l'uomo, o per le quali l'uomo rappresenta comunque il serbatoio. Non si tratta quindi di zoonosi. Un'eccezione è rappresentata dalla specie *P. knowlesi*, l'unica in grado di causare la malaria zoonotica, che ha il suo serbatoio nei macachi, ma che può essere anche trasmessa all'uomo.

La trasmissione del parassita all'uomo viene effettuata da femmine di zanzare del genere *Anopheles*, tramite inoculo degli sporozoitii durante il pasto di sangue. Occasionalmente, può avvenire una trasmissione per trasfusione di sangue, trapianto di organi, condivisione degli aghi, o congenita da madre a feto. Il ciclo vitale del *Plasmodium* (Fig. 2) è molto complesso e si svolge in due fasi, una asessuata e una sessuata, in base all'ospite in cui avviene la replicazione. Nell'uomo lo sporozoite va incontro a una duplice riproduzione asessuata, una esoeritrocitaria a livello epatico, clinicamente silente, ed una eritrocitaria all'interno delle cellule ematiche, causa dei regolari picchi febbrili. La riproduzione sessuata o sporogonica avviene invece a livello dell'intestino del vettore, in seguito alla quale vengono prodotti e rilasciati nuovi sporozoiti che, raggiungendo le ghiandole salivari dell'insetto, sono pronti per essere inoculati in un nuovo ospite (Ashley et al., 2018).



**Fig. 2:** Ciclo biologico del protozoo plasmodio nell'uomo e nel vettore (CDC) <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>

La malaria è la malattia infettiva acuta o subacuta più comune in Africa e in alcuni paesi del sud-est asiatico, con il maggior numero di “casi indigeni”. Nonostante gli sforzi di controllo e di eradicazione della malattia, tuttora il tasso di mortalità varia tra lo 0.3 e il 2.2% globalmente e tra l'11 e il 30% in regioni con clima tropicale (White et al., 2014). Nelle zone endemiche, le categorie di persone a più elevato rischio di riscontrare la forma più grave di malaria sono i bambini al di sotto dei cinque anni e le donne in gravidanza. Nelle aree instabili o a bassa endemicità, così come per i viaggiatori provenienti da regioni non malariche, tutte le età possono essere a rischio. Per quanto riguarda il quadro clinico, esso è molto variabile in base a diversi fattori concatenati: al pattern e all'intensità della trasmissione nella zona di residenza che, a sua volta, determina il livello di immunità protettiva acquisita e dunque il profilo clinico della malattia che ne deriva. Ha un periodo d'incubazione di 7-15 giorni, anche se non sono rari i casi d'incubazione di diversi mesi, condizionati dall'immunità del paziente e dalla specie di *Plasmodium* riscontrata (Baird et al., 2005). Il sintomo caratteristico della malaria sono i picchi febbrili dovuti alla fase di rottura dei globuli rossi durante il ciclo eritrocitario. Gli altri sintomi sono simili a quelli influenzali, come brividi, cefalea, mialgia e malessere, che possono ripresentarsi ad intervalli regolari ed aggravarsi, se associati ad anemia ed ittero, fino a sfociare in convulsioni, confusione mentale, insufficienza renale, coma e anche morte (Shanks et al., 2005).

La malaria, nel corso del Novecento è stata efficacemente eradicata da molte zone temperate, compresa l'intero continente europeo, Di conseguenza, la malattia risulterebbe essenzialmente confinata nei paesi tropicali ad eccezione dei “casi importati” e del fenomeno di "malaria aeroportuale", sporadicamente segnalata in seguito al trasporto involontario di anopheline infette da zone endemiche.

Tuttavia, negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato come, inaspettatamente, si sia assistito ad una recrudescenza della malaria, con incremento nei valori di incidenza partire dal 2015 (Dhiman et al.,2019). Nonostante i decenni di ricerca per lo sviluppo di vaccini antimalarici di nuova generazione, economicamente accessibili, ancora non è stato identificato un candidato che dimostri un'efficacia preventiva superiore al 50% a livello della popolazione (Mahmoudi et al., 2017; Rénia et al., 2018; Draper et al., 2018). Il parassita malarico è un organismo complesso, con un ciclo di vita molto articolato, con diversi stadi di sviluppo, cambiamenti morfologici e variazioni antigeniche, che possono permettergli di evadere le difese del sistema immunitario, rendendo molto difficile la realizzazione di un vaccino efficace.

I farmaci antimalarici “classici” si sono evoluti dal chinino; i più utilizzati attualmente sono derivati dell'artemisinina (Vuk et al., 2008; Arama et al., 2014). Evidenze sconcertanti però dimostrano come anche terapie combinate con artemisinina (ACTs), o trattamenti antimalarici di prima linea (cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina) stiano perdendo la loro efficacia a causa della diffusione (in sud-est asiatico e Africa) di forme di resistenza (Ashley et al., 2018). Di conseguenza, una strategia importante per il controllo della malaria, pur in presenza di forme di resistenza ai farmaci antimalarici, consiste nell'interruzione della trasmissione del plasmodio, perseguibile attraverso il controllo della popolazione delle zanzare anopheline.

### 2.3. *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae*

All'interno dell'ampia famiglia dei Culicidi si possono distinguere due principali sottofamiglie: Culicinae (a cui appartengono i generi *Culex* e *Aedes*) ed Anophelinae (a cui appartiene il genere *Anopheles*). All'interno di quest'ultimo genere, le due specie su cui si è concentrata la nostra attenzione sono *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae*, entrambe vettori malarici del “Vecchio Mondo”, ad ampia diffusione geografica ed appartenenti al sottogenere *Cellia* (Kamali et al., 2014) (Fig. 3).

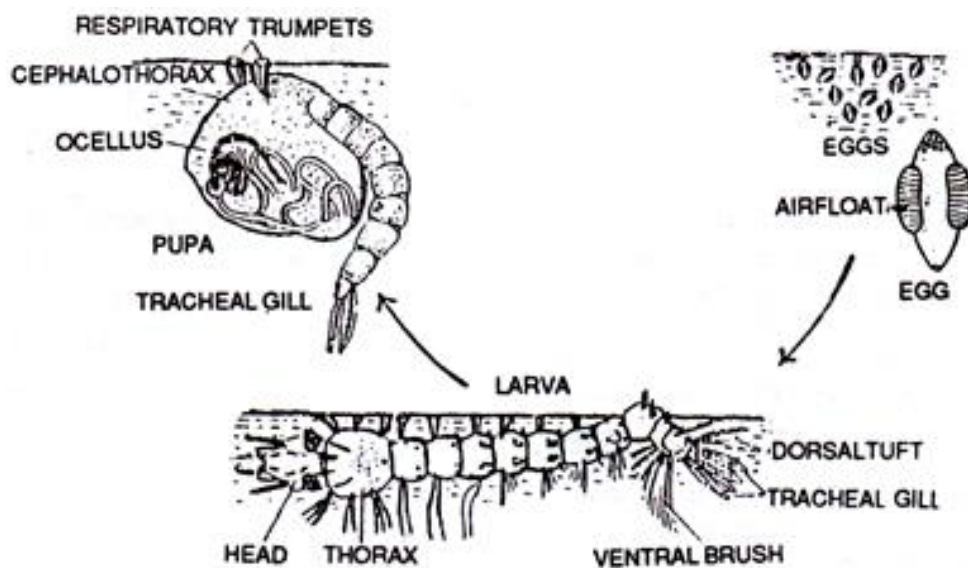


Fig. 3: Esempio di ciclo vitale di *Anopheles spp.* (Biology Discussion.com)

Queste due specie, se pur molto simili morfologicamente, presentano alcune caratteristiche fisiologiche, comportamentali e immunitarie che vanno a influire sulla loro differente competenza vettoriale (Jaramillo-Gutierrez et al., 2009; Hume et al., 2007, Eldering et al., 2017).

In generale, si può affermare che la ricerca dell'ospite, per questi ditteri, si basi su un'attrazione di tipo chemiotropica e termotropica; una volta localizzato l'ospite, si verifica il pasto, solitamente a spese dei fluidi corporei di mammiferi, uccelli, rettili ed anfibi. Fatte salve alcune eccezioni, entrambe le specie di zanzara sembrano avere un rapporto trofico con l'ospite pressoché privo di una specializzazione biologica obbligata (Tremblay et al., 1991).

- *Anopheles stephensi* presenta una distribuzione che va dal Medio Oriente, al subcontinente indiano fino alla Cina (presente in Afghanistan, Bangladesh, Cina, India, Indocina, Iran, Iraq, Myanmar, Pakistan, Taiwan e Thailandia). E' un efficiente ed importante vettore di *Plasmodium falciparum* e di *Plasmodium vivax* ed è ritenuto il principale responsabile della diffusione della malaria urbana in India, Pakistan, Iran e Iraq. A esso sono stati attribuiti nel 2005 più del 12% dei casi di malaria in India (Adak et al.; 2005). Questa specie viene comunemente distinta in tre varianti ecologiche, "type", "intermediate", "mysoriensis", che differiscono sia nella predilezione per la zona di colonizzazione, sia per alcune caratteristiche morfologiche diversificate (nelle creste delle uova, nelle aperture tracheali dell'adulto). Gli habitat ideali per le varianti "mysoriensis" e "intermedio" (Subbarao et al., 1987; Subbarao et al., 1998) sono prevalentemente rurali, comprese pozze d'acqua dolce, margini e letti dei ruscelli, bacini di raccolta, canali d'infiltrazione, pozzi e contenitori per lo stoccaggio dell'acqua domestica. Quest'abitudine di occupare le nicchie esterne durante le stagioni monsoniche e post-monsoniche le rende delle zanzare con scarse capacità vettoriali, unica eccezione fatta per le "mysoriensis" in Iran (Mehravaran et al., 2012). Al contrario, vengono riconosciute come efficienti vettori le forme "type" che si comportano da endofile e dimostrano una predilezione per gli ambienti domestici, in qualsiasi stagione. La tendenza delle forme "type" a nutrirsi nelle aree urbane sull'uomo, piuttosto che su altri animali, attribuisce loro una antropofilia variabile.
- *Anopheles gambiae sensu stricto* è ritenuto il principale responsabile della diffusione del *Plasmodium* in tutta l'Africa subsahariana, oltre ad essere riconosciuto come uno dei più efficienti e dunque studiati vettori della malaria nel mondo (Coetze et al., 2004).

Questa reputazione è dovuta alla sua elevata antropofilia e dunque alla sua dimostrata preferenza per l'uomo, anche in presenza di altre specie animali (Magesa et al., 1991; Githeko et al., 1994; Githeko et al., 1996). La sua capacità di occupare un ampio spettro geografico ha portato questa specie a essere estremamente plastica e a diversificarsi in cinque forme cromosomiche (*Foresta*, *Bamako*, *Savanna*, *Mopti* e *Bissau*) e due forme molecolari ("M" e "S"). In base alle forme si possono osservare diversi adattamenti ecologici: le forme Mopti e "M" popolano habitat larvali semipermanenti, facilmente di origine umana, come le risaie o le aree allagate, mentre le forme Savanna/Bamako e "S" risultano più comuni in siti temporanei dipendenti dalla pioggia, come le pozze sotterranee (Della Torre et al., 2005; Diabate et al., 2005; Caputo et al., 2008). Gli habitat ideali per gli stadi larvali di *An. gambiae* genericamente sono corsi/pozze d'acqua dolce, privi di vegetazione, poco profondi e parzialmente esposti al sole (depressioni del terreno, pozzanghere, piccole raccolte d'acqua). La natura effimera dell'habitat naturale in cui si sviluppano, le ha rese in grado di svilupparsi molto rapidamente (solo sei giorni intercorrono tra l'uovo e l'adulto) e dunque di sfuggire più facilmente ai predatori. Le femmine si nutrono tipicamente in tarda notte e sono descritte come più facilmente endofagiche ed endofile. Tuttavia, non mancano casi di minore discriminazione e maggiore opportunismo in carenza dell'ospite d'elezione o in presenza di componenti genetiche che condizionano le abitudini trofiche della zanzara (esofilia per la forma Forestale, endofilia per la forma Savanna).

Entrambi i vettori sono stati sottoposti a un controllo massivo tramite l'utilizzo degli insetticidi sopracitati e, inevitabilmente, ciò ha rappresentato un "tallone d'Achille evolutivo" nei programmi di controllo (Denholm et al., 2002; Donnelly et al., 2016). La comparsa di popolazioni resistenti contro i piretroidi è risultata, a maggior ragione, problematica a causa del diffuso impiego di tali composti xenobiotici per il controllo in zone rurali e poco urbanizzate, facilmente riscontrabili nel sud-est asiatico e in Africa (Ranson and Lissenden, 2016). Ne sono derivati studi accurati sui geni responsabili di tale resistenza in entrambe le specie, al fine di comprendere meglio come contrastare l'attivazione dei meccanismi molecolari che annullano/riducono gli sforzi di controllo delle malattie trasmesse da tali specie.

## 2.4. Controllo delle zanzare Anophelinae

Le metodiche ad oggi disponibili per contrastare la diffusione dei patogeni trasmessi da *An. stephensi* ed *An. gambiae*, come da altre specie, si affidano al controllo fisico (e.g. zanzariere), biologico e chimico del vettore stesso, piuttosto che a tentativi di debellazione dell'agente eziologico.

Il controllo fisico del vettore include diverse tecniche che mirano ai diversi stadi di sviluppo: il controllo delle acque quale sito di breeding (riduzione delle acque stagnanti); l'uso di "ovitrap" nei siti di breeding (combinazione di colle e insetticidi chimici o biologici); l'interruzione del contatto vettore-uomo (trattamento personale con DEET o icaridina per l'impregnazione di reti e protezioni o vaporizzazioni) (Becker et al. 2015). Il controllo a livello degli stadi larvali si è dimostrato fondamentale nei piani di controllo della malattia, consentendo non solo di abbassare gli indici di trasmissione della malaria, ma persino di avvicinarsi all'eradicazione del vettore (Killeen et al., 2002). La gestione delle popolazioni larvali (LSM), comprese la variazione dell'habitat, la gestione e l'uso di larvicidi di diversa natura, è stata l'obiettivo storico principale dei programmi di controllo delle zanzare in molte parti del mondo, come gli Stati Uniti, il Canada, alcuni paesi europei e il Brasile (Afrane et al., 2016). Le larve, rispetto agli adulti, hanno dimostrato una maggiore incapacità di attuare variazioni nel comportamento, al fine di eludere gli interventi di controllo mirati agli habitat di breeding; senza contare la circoscrizione di tali habitat che forniscono scarse possibilità di fuga agli stadi larvali (Killeen et al., 2002).

Per quanto riguarda il controllo tramite larvicidi biologici, i più utilizzati negli ultimi decenni sono quelli di origine microbica come *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs), in grado di uccidere selettivamente le larve di zanzara, con effetto quasi trascurabile per gli organismi non target e filogeneticamente lontani, come i mammiferi (Walker and Lynch, 2007) (Becker et al., 2010). La loro azione di "killing" è dovuta al fatto che, a differenza di altri animali, le larve di zanzara presentano condizioni intestinali alcaline, oltre a recettori ed enzimi specifici, che consentono il legame e l'attivazione delle protossine batteriche (cristalli proteici PSB) a tossine di *Bti* e *Bs* (Dadd et al., 1975; Nicolas et al., 1990; Baumann, et al., 1991; Bravo et al., 2007). Nonostante l'efficacia dimostrata da questi prodotti, il fattore che ne limita le potenzialità di applicazione è rappresentato dalla loro bassa attività residua e dunque dalla necessità di applicazioni ripetute con l'aggravante d'interventi dai costi molto elevati (Majambere et al., 2007; Majambere et al., 2010). D'altra parte, i recenti tentativi d'impiego di formulazioni

microbiche a lunga durata sono risultate controproducenti a causa della loro imprevedibile ed eccessiva persistenza in ambiente e degli effetti nocivi diretti o indiretti su organismi non target che convivono con le larve del vettore (Boisvert and Boisvert 2000; Afrane et al., 2016; Zhou et al., 2016). Come conseguenza di questa inestricabile situazione, tali metodiche biologiche vanno tuttora combinate con un approccio di tipo chimico-sintetico.

Il controllo chimico rappresenta il metodo oggi più utilizzato. Per quanto riguarda gli stadi larvali, esso viene attuato attraverso l'utilizzo di composti quali di temefos, fention o di primifos-metile. Il primo è un organofosforico e, non essendo tossico per l'uomo, può essere utilizzato nell'acqua potabile (a patto che il dosaggio non ecceda i 56-112 g/ha = 5.6-11,2 mg/m<sup>2</sup> o 1 mg/l); gli altri due, invece, sono organofosforosi, a lungo effetto residuo e fortemente tossici, tanto da legalizzarne l'impiego solo in acque inquinate. Tra gli insetticidi chimici classici vengono inclusi anche i regolatori di crescita degli insetti come il methoprene, che è specifico per le zanzare, e che garantisce limitati effetti su organismi non target filogeneticamente lontani. Un'alternativa, o un "rafforzativo", alla lotta biologico-chimica è rappresentato dagli oli, che vengono applicati sulla superficie dell'acqua, determinando una condizione di anossia per gli stadi immaturi (larve e pupe). La maggior parte degli oli oggi in uso sono rapidamente biodegradabili. I trattamenti larvicidi chimici classici sono ritenuti utili (Walker and Lynch, 2007; Afrane et al., 2016), ma non sono raccomandati per le aree rurali (WHO, 2013; Tesfazghi et al., 2016) e dunque sono necessariamente da combinare con il controllo degli adulti per la protezione diretta dell'uomo.

Il controllo chimico degli stadi adulti si basa essenzialmente su due strategie: l'interruzione del contatto vettore-uomo, mediante zanzariere impregnate d'insetticida (*Insecticide Treated mosquito Nets*, ITNs o *long lasting insecticide nets*, Llin), e l'allontanamento dei vettori endofili, tramite vaporizzazione d'insetticidi ad azione residua (*Indoor residual spraying*, Irs) (Marini et al., 2015). Gli insetticidi maggiormente utilizzati per entrambi i trattamenti appartengono alla classe dei Piretroidi ed in particolare Deltametrina, Permetrina, e Cipermetrina. Questi prodotti sintetici, emersi dagli sforzi per migliorare la stabilità chimica e l'attività biologica dalle piretrine naturali, hanno dimostrato una buona efficacia sugli insetti e una più limitata tossicità sui mammiferi (Zaim et al., 2000). La loro azione è di tipo neurotossica: blocco dei canali del sodio sulla membrana delle cellule eccitabili. Tali composti hanno manifestato anche un evidente effetto repellente nei confronti degli adulti di zanzara, tanto da provocare un'azione "anti-feeding" (Becker et al.,



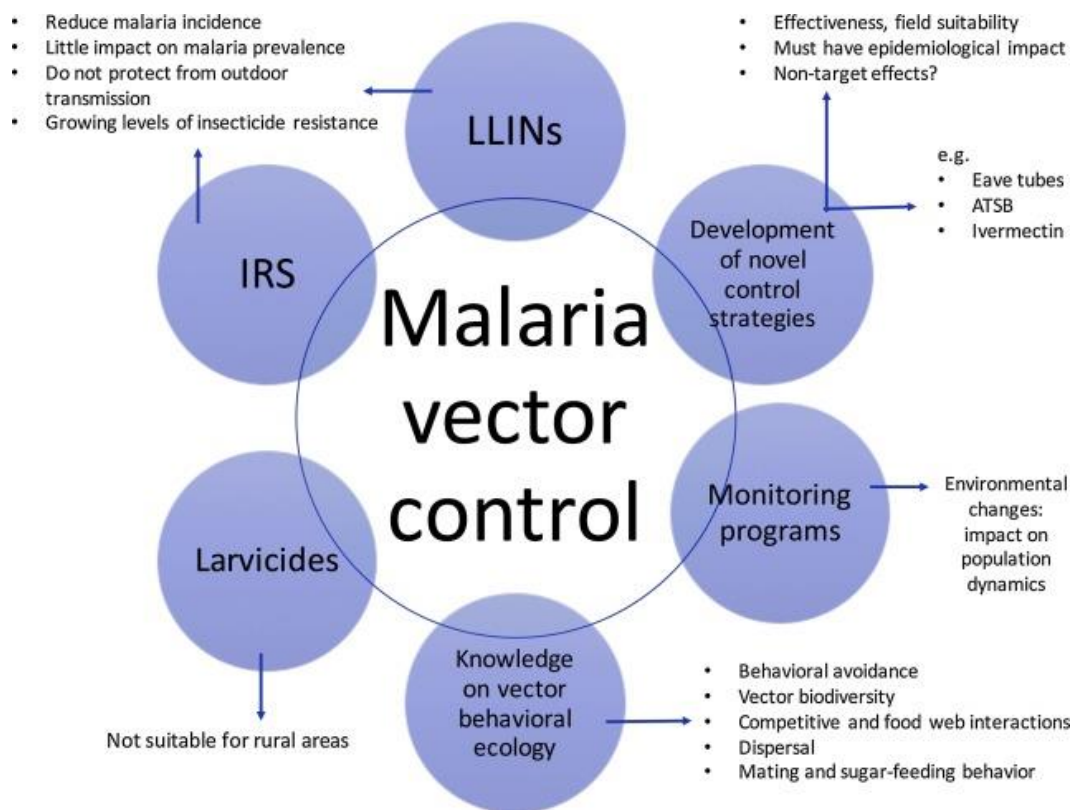
2015). Questi presentano una caratteristica lipofilità che permette loro di attraversare più rapidamente le membrane, senza incrementare il grado di tossicità risultante, grazie al loro rapido metabolismo in organismi più complessi come i mammiferi (WHO, 2006). Si può parlare di un fenomeno reversibile di parestesia piuttosto che di un effetto tossico vero e proprio; quest'azione risulta letale, con effetto immediato, per artropodi come gli adulti anophelini, mentre non dovrebbe arrecare danno all'uomo. Nonostante queste buone premesse, il loro impiego è stato limitato solo all'uso circoscritto/domestico a causa di alcune complicanze emerse negli ultimi decenni. In primo luogo, è stato dimostrato come, a lungo termine, si possa verificare la comparsa di effetti su organismi non target, come insetti innocui e benefici (entomofagi e organismi pronubi, quali le api), nonché di predatori naturali delle zanzare, che possono contribuire al controllo delle popolazioni delle stesse zanzare. È emersa, infatti, una preoccupante vulnerabilità degli ecosistemi acquatici sottoposti a massicce e costanti dosi di piretroidi. Nonostante i bassi valori di persistenza in acqua, l'uso di questi composti chimici nei corsi d'acqua o in prossimità di bacini è sconsigliato a causa della loro tossicità a lungo termine per la fauna ittica. Infatti, l'uso di questi insetticidi potrebbe avere un effetto tossico su diverse specie di pesci che, per giunta, rientrano fra gli utili nemici biologici del vettore, nei siti di somministrazione (Becker et al., 2015).

Il bioaccumulo nell'ambiente e nelle reti trofiche di tali composti chimici, seppur in basse concentrazioni, induce uno stress continuo negli organismi, tale da portare all'attivazione costante di sistemi di difesa/detossificazione cellulari e dunque all'insorgenza di resistenza anche nelle zanzare target. Nonostante le prime forme di resistenza siano state documentate per la prima volta negli anni '80, i trattamenti basati sui soli piretroidi continuano a dominare a livello mondiale le attuali strategie di controllo secondo le raccomandazioni del WHO (non attuabili però in Europa). Di conseguenza, la continua pressione selettiva a cui sono sottoposti i vettori li ha portati a sviluppare nel tempo forme di resistenza tramite due meccanismi molecolari: la mutazione del sito target dell'insetticida e l'incremento delle capacità di detossificazione dall'insetticida (Donnelly et al., 2016). Per il primo caso, si possono portare come esempio le mutazioni puntiformi, non silenti, che sono state individuate nel gene del canale del sodio (voltage-gated sodium channel, NaV) e associate alla resistenza ai piretroidi, definite 'kdr' (knockdown resistance), in almeno 13 specie diverse di zanzare Anophelinae (*Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. sinensis*, *An. stephensi*, *An. subpictus*, *An. sacharovi*, *An. culicifacies*, *An. sundaicus*, *An. aconitus*, *An. vagus*, *An. paraliae*, *An. peditaeniatus* e *An. albimanus*). Di

questo gene *kdr*, inoltre, sono state descritte sette varianti mutazionali (L1014F, L1014S, L1014C, L1014W, N1013S, N1575Y e V1010L) (Ranson et al., 2000, Silva et al., 2014).

A differenza della limitata gamma di cambiamenti nucleotidici, che portano ad un'insensibilità del sito target attraverso mutazioni puntiformi, vi è invece una molteplicità di meccanismi molecolari che portano a migliorare/incrementare il metabolismo dell'insetticida. Tali meccanismi sono imputabili a un aumento dei valori espressione dei tre principali gruppi genici del complesso del defensoma, codificanti per enzimi metabolici come, la citocromo P450 monossigenasi (P450s), l'esterasi e la glutatione-S-transferasi (GSTs) (Li et al., 2007). Le mutazioni che si realizzano in questo complesso scenario di "enzimi metaboliti", messe in atto per contrastare un singolo e specifico insetticida, come ad esempio la permetrina, possono facilmente compromettere l'azione di altri xenobiotici a causa di noti fenomeni di cross-resistenza agli insetticidi (Davari et al., 2007, Mitchell et al., 2012).

In fine, nonostante l'utilizzo degli insetticidi di sintesi abbia permesso di ridurre l'incidenza della malaria in zone urbane e periurbane, o comunque fortemente antropizzate, non ha garantito il blocco della trasmissione "outdoor" e dunque ha permesso alla "malaria residua", trasmessa da adulti che pungono all'esterno delle abitazioni, di mantenere la sua prevalenza. Le problematiche che si sono riscontrate nel controllo della malaria negli ultimi decenni hanno determinato un rinnovato interesse per lo studio della malattia e dei suoi vettori, in relazione ai diversi aspetti della biologia degli stadi sia larvali, sia adulti degli anophelini, ma anche per ciò che riguarda le conseguenze ecologiche dei programmi di controllo. Molte ricerche si sono concentrate sull'identificazione dell'anello debole dei meccanismi cellulari di difesa/resistenza messi in atto da tali vettori, al fine di sviluppare programmi di gestione su misura del vettore target (Charlwood et al. 2002; Cabrera and Jaffe 2007; Diabate et al. 2011; Dabiré et al. 2014; Oliva et al. 2014; Diabate and Tripet 2015) (Fig. 4).



**Fig. 4:** Principali sfide e prospettive dell'attuale ricerca sul controllo dei vettori della malaria (Benelli et al., 2017)

## 2.5. ABC trasportatori nei vettori anophelini

Le indagini svolte sull'attivazione cellulare e genica in risposta agli insetticidi, coreografata nel complesso sistema del defensoma chimico, sono state possibili grazie all'introduzione di approfondite analisi di sequenziamento del genoma in *An. gambiae* (Holt et al., 2002; Roth et al., 2003); il numero di trasportatori identificati è aumentato negli anni; studi di genomica comparata sui trasportatori hanno portato a stimare oltre 50 geni (Roth et al., 2003; Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Successivamente, tramite sequenziamento genomico in altre tre importanti specie di zanzare vettrici ed analisi filogenetica, le proteine ABC evidenziate sono risultate 55 in *An. gambiae*, 69 in *Aedes aegypti* e 70 in *Culex quinquefasciatus* (Lu et al., 2016), (incluso alcune sequenze geniche parziali o pseudogeni). Tuttavia, resta ancora da chiarire il meccanismo con cui l'azione di queste sub-famiglie di proteine si moduli nel tempo tra le sopracitate specie di zanzare, rappresentanti dei tre diversi generi *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*.

La sovra-espressione degli ABC trasportatori è stata osservata in ceppi di *An stephensi* e *An. gambiae* e *Ae. aegypti* resistenti ai piretroidi (Bonizzoni et al., 2012; Bariami et al., 2012), così come è stata osservata l'attivazione trascrizionale in ceppi sensibili esposti agli stessi insetticidi (Pignatelli et al., 2018). Nello specifico, è stata evidenziata, grazie ad analisi microarray e confermata poi da PCR real time, una forte up-regolazione di quattro geni ABC in ceppi piretroidi resistenti di *Ae. aegypti*, a confronto con quelli sensibili (ABCB4 sette volte più espresso nelle forme resistenti) (Bariami et al., 2012). Similmente, in una delle specie di nostro interesse, *An. gambiae*, il gene AGAPOOO8436 (sottofamiglia ABCC) si è palesato come gene maggiormente espresso in ceppi deltamentrina resistenti, tramite un'analisi di RNA-seq (Bonizzoni et al., 2012).

D'altra parte, in ceppi sensibili, è stato osservato come il trattamento con molecole inibitorie aspecifiche, tra cui il verapamil (inibizione per competizione), possa agire in sinergia con l'insetticida, down-regolando l'espressione degli ABC e rendendo le zanzare target maggiormente sensibili al trattamento xenobiotico (Figueira-Mansur et al., 2013; Lima et al., 2014).

Un ulteriore studio a supporto della loro up- e down-regolazione temporale è quello effettuato su larve di un ceppo sensibile (Liston) della zanzara *An. stephensi*, esposte alla permetrina, in cui si evidenziava il modello di espressione di sei geni trasportatore ABC a sette time point, da 30 minuti a 48 ore dopo l'esposizione all'insetticida (Epis et al., 2014 a,b). I risultati ottenuti hanno mostrato una risposta trascrizionale fortemente modulata nel tempo, seppure costantemente differente rispetto all'espressione delle larve non trattate, e con un picco di attivazione alle sei ore dal trattamento.

Oltre ad analisi volte ad indagare l'efficienza di tali meccanismi di trasporto, vi sono anche lavori che ne hanno osservato la distribuzione a livello tissutale. In un lavoro di Pignatelli del 2018 si è giunti a restringere a livello di determinati tessuti l'espressione di specifici sottoinsiemi di trasportatori ABC in zanzare *An. gambiae*, in parte analizzando la modalità d'azione con cui il tossico agisce sul vettore target. Infatti, per la maggior parte degli insetticidi impiegati nel controllo sanitario, l'azione neurotossica si concretizza tramite attraversamento della cuticola per arrivare alla BBBs (barriera ematoencefalica) neuronale e ai tubuli malpighiani, come già evidenziato in alcune specie di lepidotteri (Murray et al., 1994; Petschenka et al., 2013). Pertanto, viene giustificata la maggiore attivazione dei trasportatori in questi comparti in cui l'azione di pompe ad efflusso risulta fondamentale per l'elevata concentrazione di tossico con cui entrano in contatto le cellule. Tale studio andrebbe ovviamente approfondito su più specie e su più xenobiotici poiché, come spesso

accade, in base al variare dell'organismo target le interazioni recettore-substrato variano anch'esse, in certi casi a seconda della specificità di tessuto (Petschenka et al., 2013).

Uno dei quadri al momento più completi sulla risposta dinamica di difesa in larve di *An. stephensi* contro l'insetticida permetrina risulta uno studio di De Marco (2017), in cui è stato possibile analizzare, tramite RNA-Seq, l'up- e down-regolazione dei geni del defensoma, quantificandoli a più time point (dalle sei alle 48 ore) e dunque descrivendo la risposta trascrizionale nel tempo di tali famiglie di "defence genes". Tramite analisi trascrittomiche è stato confermato che l'induzione enzimatica da stress chimico non è dovuta all'attivazione di molecole o di enzimi preesistenti o al blocco del tasso di degradazione, ma piuttosto alla sintesi di nuove molecole dell'enzima (Feyereisen, 2005). Questi enzimi sono stati identificati e suddivisi in base alla fase del processo di detossificazione a cui partecipano: in particolare per i trasportatori ABC sono stati osservati lievi differenze di espressione tra 6 e 48 ore, coerentemente con il loro ruolo di difesa agli estremi del processo. La messa in luce dei più importanti fattori di tale processo (vedi ABCG4 e ABCBmember6, in base alla sovra-espressione) ha permesso di ipotizzare l'inibizione genica (tramite metodiche antisense) di questi geni ABC, al fine di facilitare l'azione dell'insetticida sul vettore target.

E' interessante osservare come alcuni di questi geni risultino attivati in più specie contro svariati derivati dei piretroidi. AnstABCG4, uno dei geni maggiormente espressi in larve ed adulti di *An. stephensi* (Epis et al., 2014, Mastrantonio et al., 2017), ha mostrato un pattern di espressione simile all'ortologo AsABCG28 in adulti di *An. sinensis*, dopo trattamento per 12 e 24 ore con deltametrina. Quest'ultimo inoltre, tramite analisi RNA-seq e qPCR a diverse tempistiche, è risultato associato alla fase di trasporto di xenobiotici già modificati (fase III), successiva al processo di detossificazione enzimatica (fase II) (Buss et al., 2008; Dermauw et al., 2014). Anche questo risultato potrebbe essere funzionale alla realizzazione di un metodo d'inibizione, avente come target un gene che sia in grado di svolgere le stesse funzioni di protezione in specie diverse, nell'ottica di downregolarlo e rendere più specie vettrici nuovamente sensibili al tossico.



## ARTICOLO 1

---

Gene expression modulation of ABC transporter genes in response to permethrin in adults of the mosquito malaria vector *Anopheles stephensi*.





## Gene expression modulation of ABC transporter genes in response to permethrin in adults of the mosquito malaria vector *Anopheles stephensi*

Valentina Mastrantonio<sup>a,1</sup>, Marco Ferrari<sup>b,1</sup>, Sara Epis<sup>b,e,\*</sup>, Agata Negri<sup>a</sup>, Giulia Scuccimarra<sup>a</sup>, Matteo Montagna<sup>c</sup>, Guido Favia<sup>d</sup>, Daniele Porretta<sup>a</sup>, Sandra Urbanelli<sup>a</sup>, Claudio Bandi<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Biology, Sapienza University of Rome, Via dei Sardi 70, 00185 Rome, Italy

<sup>b</sup> Department of Biosciences, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy

<sup>c</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Milan, Via Celoria 2, 20133 Milan, Italy

<sup>d</sup> School of Bioscience and Veterinary Medicine, University of Camerino, Via Gentile III da Varano, 62032 Camerino, Italy

<sup>e</sup> Pediatric Clinical Research Center Romeo and Enrica Invernizzi, Ospedale “Luigi Sacco”, Via Giovanni Battista Grassi, 74, 20157 Milan, Italy

\*Corresponding author at: Department of Biosciences, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy. E-mail address: [sara.epis@unimi.it](mailto:sara.epis@unimi.it) (S. Epis).

<sup>1</sup> Co-primary authorship.

### Article history:

Received 5 January 2017

Received in revised form 10 March 2017

Accepted 11 March 2017

Available online 14 March 2017

**Keywords:** Vector control, Mosquitoes, Detoxifying enzymes, Insecticides, Pyrethroids



## ABSTRACT

Living organisms have evolved an array of genes coding for detoxifying enzymes and efflux protein pumps, to cope with endogenous and xenobiotic toxic compounds. The study of the genes activated during toxic exposure is relevant to the area of arthropod vector control, since these genes are one of the targets upon which natural selection acts for the evolution of insecticide resistance. ATP-binding cassette (ABC) transporters participate to insecticide detoxification acting as efflux pumps, that reduce the intracellular concentration of toxic compounds, or of their metabolic derivatives. Here we analyzed the modulation of the expression of six genes coding for ABC transporters, after the exposure of adult females and males of the mosquito *Anopheles stephensi*, a major malaria vector in Asia, to permethrin. Male and female mosquitoes were exposed to insecticide for one hour, then the expression profiles of the ABC transporter genes AnstABCB2, AnstABCB3, AnstABCB4, AnstABCBmember6, AnstABCC11, and AnstABCG4 were analysed after one and 24 h. Our results showed that three genes (AnstABCB2, AnstABCBmember6, AnstABCG4) were up-regulated in both sexes; two of these (AnstABCBmember6 and AnstABCG4) have previously been shown to be up-regulated also in larval stages of *An. stephensi*, supporting a role for these genes in permethrin defence in larvae as well as in adults. Finally, the same ABC transporter genes were activated both in females and males; however, the timing of gene induction was different, with a prompter induction in females than in males.

## 1. INTRODUCTION

Arthropods defend themselves from physiological metabolites and from both natural (e.g. plant and microbial toxins) and anthropic exogenous toxicants (e.g. organic pollutants and pesticides) by detoxifying protein systems, encoded by an array of genes and gene families; these systems, composed by detoxifying enzymes and efflux pumps, transform the toxic chemicals and/or eliminate them from cells (Goldstone, 2008; Steinberg, 2012). Identifying which genes and gene-family members are activated during the detoxification response is relevant to the control of arthropod vectors, as genes coding for detoxifying proteins are one of the substrates upon which natural selection acts for the evolution of insecticide resistance. In addition, detoxifying enzymes and transporters have the potential to be exploited as targets for the development of novel insecticides (Buss and Callaghan, 2008; LeGoff et al., 2006; Steinberg, 2012).

In recent years, ATP-binding cassette (ABC) transporters, integral membrane proteins belonging to the ABC family, have attracted a great deal of attention (Dermauw and Van Leeuwen, 2014; Merzendorfer, 2014). Differently from detoxifying enzymes (e.g. cytochrome-P450, or glutathione-S transferases), ABC transporters participate to cell defence not by modifying toxic substrates, but reducing their intracellular concentration, by extruding toxicants out of the cells once they have entered into them, or after that they have been modified by detoxifying enzymes (Dermauw and VanLeeuwen, 2014; Merzendorfer, 2014). Among the ABC transporter families, particularly important are the ABC transporters belonging to the ABCB (also called MDRs or P-gps), ABCC and ABCG subfamilies (Dermauw and Van Leeuwen, 2014) that are considered the “first line of cellular defence” against a wide range of xenobiotics, including insecticides (Buss and Callaghan, 2008).

As already emphasized, the interest about ABC transporters in arthropods derives on one hand from the need to understand the molecular basis of insecticide defence, on the other hand from the perspective to discover new molecular targets for novel insecticides. In addition, these transporters could be exploited to improve the efficacy of ‘conventional’ insecticides, thanks to the synergistic effects with ABC transporters inhibitors (Buss and Callaghan, 2008; Cafarchia et al., 2015; Dermauw and Van Leeuwen, 2014; Pohl et al., 2011; Porretta et al., 2016). Indeed, sequence-specific gene silencing by RNA interference (RNAi), in different blood-sucking insect species, has shown the possibility to specifically suppress the ABC transporter gene expression, increasing the susceptibility of tested

individuals (Dalla Bona et al., 2016; Figueira-Mansur et al., 2013; Yoon et al., 2011; Zhu et al., 2013).

In mosquitoes, ABC transporters have been shown to be involved in defence against several insecticide classes (Dermauw and VanLeeuwen, 2014). Bioassays using insecticides and ABC transporter inhibitors (e.g. verapamil or cyclosporin A) have shown that insecticide toxicity increased after the inhibition of these transporters. For example, increased larval mortality was observed in larvae of susceptible populations of the mosquitoes *Aedes caspius* and *Aedes aegypti* exposed to temephos or in *Culex pipiens* larvae exposed to endosulfan, ivermectin and cypermethrin (Buss et al., 2002; Figueira-Mansur et al., 2013; Lima et al., 2014; Porretta et al., 2008). Likewise, in both *Anopheles* and *Aedes* species, up-regulation of ABC transporter genes has been observed in mosquito larvae from susceptible populations after insecticide exposure, supporting the view that ABC transporters play an important role in mosquito defence against chemicals (Epis et al., 2014a,b; Figueira-Mansur et al., 2013). For example, in *Ae. aegypti* larvae exposed to temephos, the authors observed a significant increase of the expression of the ABCB transporter Aaeg P-gp, up to eight-fold after 48 h (Figueira-Mansur et al., 2013).

*Anopheles stephensi* is the main malaria vector in the Middle East and South Asian regions (Sinka et al., 2010; WHO, 2016a). In this species, ABC transporters have been implicated in the defence against the pyrethroid insecticide permethrin, in larvae belonging to an insecticide-susceptible strain (Epis et al., 2014a). Furthermore, the analysis of the transcriptional response of six ABC transporter genes, identified in the larval transcriptome, showed both up- and down-regulation at different time points, which suggests the occurrence of a modulated response of ABC transporter genes during permethrin exposure.

To date, despite pyrethroids occupy a prominent position in adult control, studies focused on ABC transporters and pyrethroid insecticides in *An. stephensi* adults are limited (Vontas et al., 2007). Mosquito larvae and adults are naturally exposed to different endogenous and xenobiotic compounds (Clements, 2000). The modulation of ABC transporter gene expression, in response to toxicants exposure, can thus be expected to differ in different life stages of the mosquito, as observed in other insect species. For example, the overexpression of an ABCG gene was observed in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*, while no overexpression was observed in eggs and nymphae (Yang et al., 2013), which agrees with the idea that ABC transporter response to insecticides varies during insect

development. On the other hand, in the salmon louse *Caligus roger-cresseyi* the ABC transporter gene Cr-Pgp was found up-regulated in females after deltamethrin exposure, but not in males, suggesting that differential responses are possible not only relative to the developmental stage, but also to sex (Valenzuela-Muñoz et al., 2014).

The aim of this work was to investigate the transcriptional response of ABC transporter genes to permethrin in adults of *An. stephensi*. Male and female mosquitoes were exposed to permethrin separately; then the expression profiles of six ABC transporter genes were determined, at two time-points after insecticide exposure (one and 24 h). Gene expression data were analysed to assess the possible occurrence of differences across time and/or between sexes, and discussed in relation with the results obtained on larvae of *An. stephensi* in previous studies (Epis et al., 2014a, b).

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Mosquitoes**

All mosquitoes used in this study derived from the *Anopheles stephensi* Liston colony of the insectary of the University of Camerino, Italy. Mosquitoes were reared at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  with a relative humidity of 85–90%, and a 12:12 Light-Dark photoperiod. All experiments were conducted separately on adult males and females. At this aim, the eggs were kept in spring water until hatching; larvae were fed daily with fish food (Tetra, Melle, Germany) and sex-separated as pupae; groups of 25 male and female adults were maintained in different cages and fed with a 5% sucrose solution until laboratory bioassays.

### **2.2. Mosquitoes exposure to permethrin**

In order to analyse the expression profile of ABC transporter genes after permethrin exposure, male and female adults were treated with permethrin following the WHO tube protocol (WHO, 2016b) with some modifications. All experiments were carried out separately for male and female mosquitoes using 3–4 day-old unfed individuals, maintained at the same temperature, humidity and photoperiod conditions of the reared colony. Permethrin (PES-TANAL, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) was diluted in acetone to have a final concentration of 0.45% that, accordingly to WHO (2016b) and our preliminary treatments, leads to about 50–80% mortality rate after 24 h. Twenty-five males or females were gently placed into separate tubes and exposed for one hour to papers (12

× 15 cm) (Whatman®No. 1, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) impregnated with 2 ml of permethrin solution mixed with the silicon oil non-volatile carrier (Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy), accordingly to WHO (2016b). Papers impregnated with the silicone oil carrier and acetone (i.e. without insecticide) were used as controls. Seven replicates were conducted for permethrin treatments and four for controls.

ABC transporter gene expression was analysed at two time points (one and 24 h). In a first experiment we exposed adult males and females to permethrin for one hour as described above, then the number of dead mosquitoes was recorded in both the exposure and control tubes. A mosquito was considered dead if it was immobile or unable to stand or fly in a coordinated way. The survived individuals in both the exposure and the control tubes were collected, divided into three pools of 10 individuals for controls and three for exposed individuals and stored in RNA later at  $-80^{\circ}\text{C}$  for RNA extraction and molecular analysis. In the second experiment, we exposed adult males and females to permethrin for one hour. Then, the survived individuals were transferred in recovery tubes and supplied with sucrose solution. After 24 h, the number of dead mosquitoes in the recovery tubes was recorded and the survived individuals were collected for treatment and control (three pools of 10 individuals for treatment and three for control) and stored in RNA later at  $-80^{\circ}\text{C}$  until molecular analysis. Shapiro-Wilk test was performed to check the normality of the data, then the Student's t-test was used to assess the occurrence of significant differences in mortality rates between females and males at the two time-point after permethrin exposure. All tests were performed using the software IBM SPSS Statistics (IBM Corp. Released, 2013).

**Table 1.** Primer sequences used to amplify ABC transporter genes in *Anopheles stephensi*.

| Gene                  | Forward primer (3'-5')  | Reverse primer (3'-5') | Size (base pairs) | Source                               |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| <i>AnstABC2</i>       | TATCAAGTTCACGGATGTAGAGT | TATCCACCTTGCCACTGTC    | 185               | <a href="#">Epis et al. (2014a)</a>  |
| <i>AnstABC3</i>       | CAACCGTTCCGTAATACTACC   | ACTGGTAGCCCAATGTGAAG   | 133               | <a href="#">Epis et al. (2014a)</a>  |
| <i>AnstABC4</i>       | GGACAAAACATTCGGGAGG     | CGTAGTGAATGTTGTGGCG    | 109               | <a href="#">Epis et al. (2014a)</a>  |
| <i>AnstABCmember6</i> | CTGGAGACGCTGAGAGATA     | TACTCCTCGGTGAAGTGG     | 125               | <a href="#">Epis et al. (2014a)</a>  |
| <i>AnstABCG4</i>      | ATGAGCCCATTCTCCTG       | AGCGTGGAGAAGAAGCAG     | 158               | <a href="#">Epis et al. (2014a)</a>  |
| <i>AnstABCC11</i>     | GGTTGGATTGGCTTTCGTG     | ATAACCGACTCCCGTTTCG    | 156               | <a href="#">Epis et al. (2014b)</a>  |
| <i>Rps7</i>           | AGCAGCAGCAGCACTTGATTG   | TAAACGGCTTCTGCCGCACCC  | 90                | <a href="#">Capone et al. (2013)</a> |

**Table 2.** Univariate ANOVA analysis on relative gene expression in relation to sex and time.

| Gene               | df | MS     | F       | P                    |
|--------------------|----|--------|---------|----------------------|
| <b>ABCG4</b>       |    |        |         |                      |
| Sex                | 1  | 3.876  | 285.527 | 0.000 <sup>***</sup> |
| Time               | 1  | 8.841  | 651.258 | 0.000 <sup>***</sup> |
| Sex × Time         | 1  | 0.087  | 6.387   | 0.035 <sup>*</sup>   |
| <b>ABCB2</b>       |    |        |         |                      |
| Sex                | 1  | 25.172 | 33.164  | 0.000 <sup>***</sup> |
| Time               | 1  | 30.528 | 40.221  | 0.000 <sup>***</sup> |
| Sex × Time         | 1  | 20.593 | 27.131  | 0.001 <sup>***</sup> |
| <b>ABCBmember6</b> |    |        |         |                      |
| Sex                | 1  | 15.413 | 14.608  | 0.005 <sup>**</sup>  |
| Time               | 1  | 6.660  | 6.312   | 0.036 <sup>*</sup>   |
| Sex × Time         | 1  | 44.545 | 42.216  | 0.000 <sup>***</sup> |

<sup>\*</sup> P < 0.05.

<sup>\*\*</sup> P < 0.01.

<sup>\*\*\*</sup> P < 0.001.

### 2.3. Gene expression profiles after permethrin exposure

The expression profiles of six genes encoding for ABC transporters (AnstABCB2, AnstABCB3, AnstABCB4, AnstABCBmember6, AnstABCC11, AnstABCG4) were analysed by Quantitative RT-PCRs in adult males and females at two time-points after permethrin exposure (one and 24 h). These genes have been identified in the larval transcriptome of *An. stephensi* and were found differentially expressed in larvae exposed to the LD<sub>50</sub> dose of permethrin by Epis et al. (2014a, b). RNA was extracted from each pool of treated and untreated males and females using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Then the total RNA was eluted into nuclease-free water and the concentration of RNA was determined at 260 nm using Qubit<sup>TM</sup> fluorometric quantitation (Thermo Scientific, Delaware, USA). cDNAs were synthesized from 150 ng of total RNA using a Quanti Tect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with random hexamers. The cDNA was used as template in Quantitative RT-PCRs using the primers designed on *An. stephensi* by Epis et al. (2014a, b) (Table 1). Quantitative RT-PCRs on target genes were performed using a BioRad CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, California, USA) and the conditions were as follows: 50 ng cDNA; 300 nM of forward and reverse primers; 98°C for 30 s, 40cycles of 98°C for 15 s, 59°C for 30 s; fluorescence acquisition at the end of each cycle; melting curve analysis after the last cycle. In order to calculate the expression of the target genes, cycle threshold

(Ct) values were determined for each gene and normalized according to the endogenous reference gene rps7. The expression of ABC transporters genes in the controls was considered as the basal level (equal to 1). The estimates of the expression level of each gene in treated males and females are relative to the control groups, and reported as fold change mean  $\pm$  standard deviation (SD). Significant differences in expression between treated and controls were estimated using a two-sided t-test, as implemented in the CFX Manager software (Bio-Rad). The normality of the expression data was tested by Shapiro-Wilk test (Royston, 1995), then the univariate ANOVA was performed to compare differences in relative expression between sexes and time points for each gene that was found differentially expressed in both males and females after insecticide exposure. Subsequent pairwise comparisons were performed using the Student t-test. For multiple tests, the significance threshold (5%) was corrected by applying the Bonferroni correction. All analyses were performed using the software IBM SPSS Statistics (IBM Corp. Released, 2013).

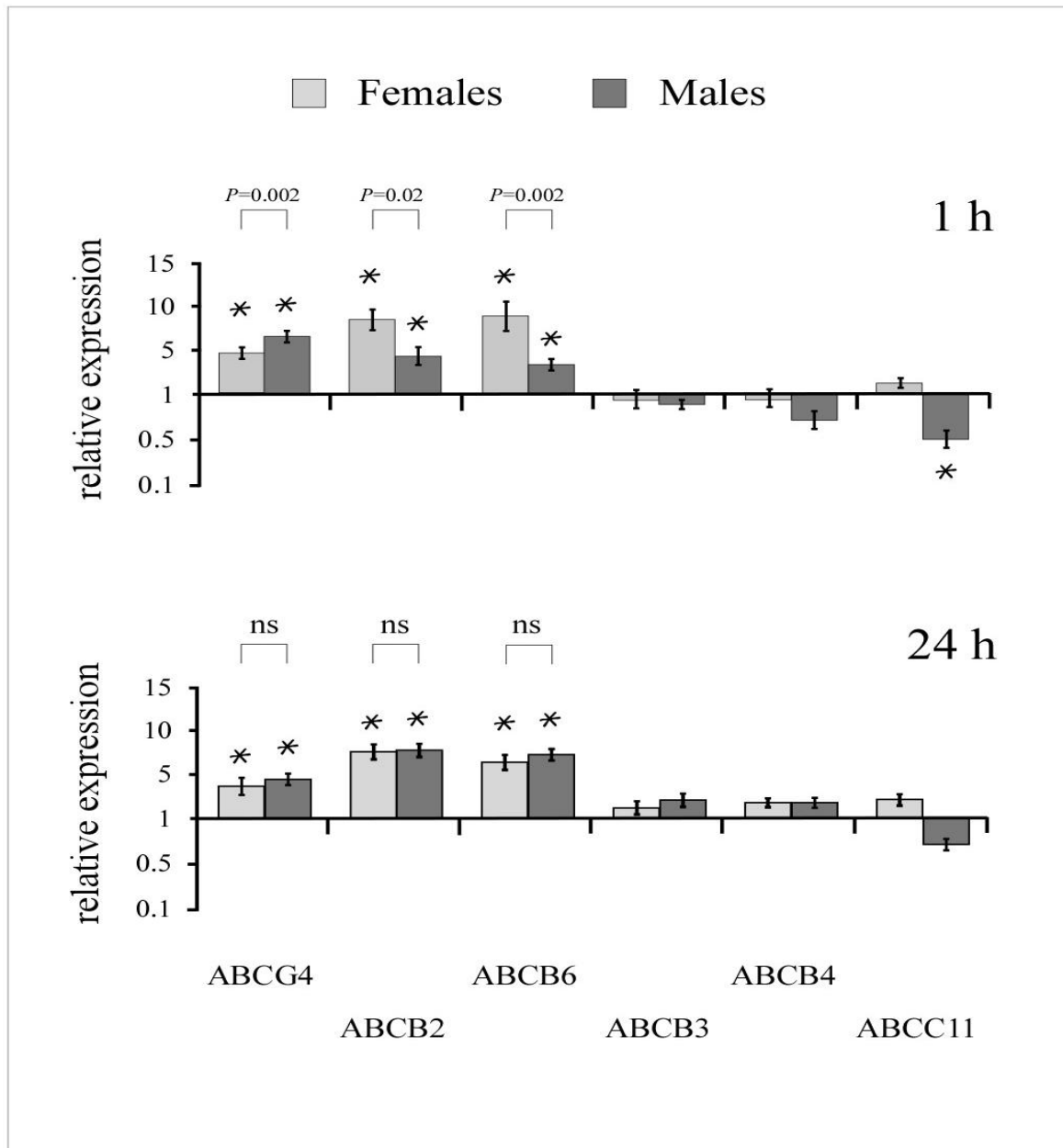
### 3. RESULTS

The results of the bioassays revealed a higher sensitivity to permethrin of adult males of *An. stephensi*, compared to females. Indeed, mortality in males was 70% ( $\pm 11\%$ ) and 82% ( $\pm 7\%$ ), respectively at one and at 24 h after permethrin exposure, while mortality in females was 40% ( $\pm 8\%$ ) and 55% ( $\pm 12$ ) at the two time-points. In the control tests, a mortality rate of 2% ( $\pm 1$ ) and 3% ( $\pm 2$ ) was found at one and 24 h, respectively. The Shapiro-Wilk test supported anormal distribution of the data (all tests  $P > 0.05$ ) and the Student's t-test showed significant differences in mortality rate between males and females at one and 24 h (Student's t-tests  $P < 0.05$ ) (TableS1).

The expression profiles of the analysed ABC transporter genes in adult males and females, at one and 24 h, are shown in Fig. 1 and in Table S2. The AnstABCB3, AnstABCB4 and AnstABCC11 genes were not differentially expressed or down-regulated compared to controls in both sexes after permethrin exposure. On the contrary, the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes were up-regulated in both females and males at one and 24 h (Fig. 1). The Shapiro-Wilk test showed normal distribution of the data (all tests  $P > 0.05$ ). The ANOVA analysis performed on the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes showed that gene expression level was affected by time, sex and the combination of these two factors (Table 2). Pairwise comparisons between females and males showed significant differences in the expression of AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes in the two sexes at one hour (Student t-tests  $P = 0.002$ ,  $P = 0.02$  and  $P = 0.002$ , respectively), while no differences were observed at 24 h (Fig. 1).

In treated females, the relative expression of the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes at one hour were increased  $4.93 \pm 0.08$ ,  $8.51 \pm 1.17$  and  $8.75 \pm 1.69$  fold, respectively (mean  $\pm$  standard deviation), with AnstABCG4 showing the lowest increase in expression compared to control. At 24 h, the three genes showed an up-regulation of  $3.38 \pm 0.18$  (AnstABCG4),  $9.15 \pm 0.15$  (AnstABCB2) and  $6.45 \pm 0.15$  (AnstABCBmember6) fold (Fig. 1).





**Fig. 1.** Relative expression of *Anopheles stephensi* ABC transporter genes in female and male adults measured by Quantitative RT-PCR. The expression level in non-treated individuals was considered to be the basal level (equal 1). The internal reference gene *rps7* for *An. stephensi* was used to normalize the expression levels. The values are expressed as fold-change compared to control and reported as mean of three values plus standard deviation. Light grey: females; dark grey: males. ABCG4: AnstABCG4; ABCB2: AnstABCB2; ABCB6: AnstABCBmember6; ABCB3: AnstABCB3; ABCB4: AnstABCB4; ABCC11: AnstABCC11 (Table 1). Asterisks show significant differences in over-expression between treated and control groups ( $P$ -value  $< 0.05$ ). Letters refer to comparison of the expression levels observed at one and 24 h for each gene in females and males.  $P$ -values of Student- $t$ -tests between expression levels of females and males at one and 24 h are also shown. NS = no significant differences.

The relative expression value of the AnstABCG4 gene significantly decreased from one to 24 h (Student t-test  $P < 0.0002$ ), while no significant differences were observed between the expression values of the AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes at the two time-points (Student t-tests  $P > 0.05$ ).

In males, at one hour, the relative expression of the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes was  $6.27 \pm 0.09$ ,  $3.2 \pm 0.17$  and  $2.7 \pm 0.08$  fold, respectively, with the AnstABCG4 showing the highest expression value. At 24 h, the relative expression values of the three genes were  $4.4 \pm 0.08$ ,  $8.99 \pm 0.15$  and  $7.98 \pm 0.09$  fold (Fig. 1). The relative expression value of the AnstABCG4 gene significantly decreased from one to 24 h (Student t-test  $P < 0.0001$ ), while the expression values of the AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes significantly increased (Student t-tests  $P < 0.0001$ ).

#### 4. Discussion

In our previous works, by analysing the expression profile of ABC transporter genes in larvae of *An. stephensi* exposed to permethrin, we showed that two genes (AnstABCG4 and AnstABCBmember6) were up-regulated after insecticide exposure, supporting a role of ABC transporters in defence against this pyrethroid insecticide. Furthermore, by analysing the expression profiles at different time-points after permethrin exposure, we showed the occurrence of a modulated transcriptional response, where single genes were up- or down-regulated at different time-points after permethrin exposure, as well as multiple genes were co-regulated at each time-point (Epis et al., 2014 a, b). In this study, we focused on adults of *An. stephensi* and the results obtained integrated and extended the results obtained on the larvae.

Here, we exposed adult females and males to permethrin for one hour, and analysed the expression profiles of the same set of genes analysed in larval stages, at two time-points after exposure (one and 24 h). Three out of the six genes analysed (AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6) were up-regulated in both sexes after one and 24 h, while the remaining three (AnstABCB3, AnstABCB4 and AnstABCC11) were not differentially expressed or downregulated after insecticide treatment (Fig. 1). These results (i.e. only some genes among those analysed exhibit up-regulation) are concordant to what has been recently described about ABC transporters and, more in general, in genes

involved in the detoxification process (e.g. Cytochrome P450, Cuticular proteins) (Epis et al., 2014b; Fang et al., 2015; Gong et al., 2013; Liu et al., 2011). Because of the detoxification process is energetically costly, this pattern could be due to a general reallocation of the energetic resources, as recently suggested by some authors (De Marco et al., 2017).

The upregulation of the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6, here observed after permethrin exposure, supports the involvement of ABC transporters in defence against this insecticide not only in larval stages of *An. stephensi*, but also in adults. Notably, we found not only evidences of permethrin-induction of ABC transporters genes in both larvae and adults, but also we observed that five out of the six genes analysed showed similar expression profiles between larvae and adults after permethrin exposure: the AnstABCB3, AnstABCB4 and AnstABCC11 genes were indeed not differentially expressed or downregulated after permethrin exposure in both life-stages, while the AnstABCG4 and AnstABCBmember6 genes were upregulated in both adults and larvae (Fig. 1) (Epis et al., 2014a,b). The AnstABCB2 gene was found upregulated in adults at both one and 24 h (Fig. 1), while this gene was not differentially expressed or downregulated in *An. stephensi* larvae (Epis et al., 2014a, b). Although different experimental conditions (e.g. insecticide concentration or time of insecticide exposure) can affect gene expression induction, the results reported in Epis et al. (2014a, b) and in this study show that part of the ABC transporter genes investigated display a similar expression pattern after permethrin exposure in adult mosquitoes and larvae, while other genes are characterized by a stage-specific response.

The discovery that mosquito larvae and adults share ABC transporter genes that display a similar induction response after insecticide exposure is relevant to insect vector and pest control programmes, for at least two reasons. First, pyrethroids occupy a prominent position in malaria vector control as they are used to control adult mosquitoes on long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying programmes (IRS) (WHO, 2016a). However, pyrethroids are also widely used in crop pest control, so that also larval stages of anopheline mosquitoes can be exposed to pyrethroids in the developing sites near crop fields, which could increase the risk of insecticide resistance development (Bigoga et al., 2012; Gnankiné et al., 2013; Yadouleton et al., 2011).

Therefore, the presence of genes displaying the same induction pattern in larval and adult stage would add a further critical factor for insecticide resistance insurgence, as these

'coregulated' genes offer a common target for mutational events that can lead to resistance development (e.g. point mutations, duplications, mutations in promoter/regulatory regions) (Le Goffet et al., 2006; Liu, 2015; Nkya et al., 2013). Second, the inhibition of ABC transporter gene expression by RNAi technologies has shown the possibility to increase the susceptibility of individuals to insecticides by specifically targeting detoxifying genes (Figueira-Mansur et al., 2013; Yoon et al., 2011; Zhu et al., 2013). In perspective, this approach could allow to reduce the dose and frequency of insecticide applications (Buss and Callaghan, 2008; Porretta et al., 2008). It is interesting to note that dsRNA-based gene silencing in mosquito larvae can determine a long-lasting down-regulation of target genes, up to the adult stage (e.g. Dalla Bona et al., 2016). The occurrence of genes displaying the same induction pattern in larvae and adults, after insecticide treatment, thus adds further appeal to control strategies based on sequence-specific suppression of ABC transporter gene expression, as well as highlights the need to assess which genes are induced in the different life stages to implement such control strategies.

When we look at the expression profiles of ABC transporters in female and male adults some similarities can be observed: in both sexes, among the six genes analysed, the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes were up-regulated at both one and 24 h after permethrin exposure. Furthermore, in both sexes the relative expression of the AnstABCG4 significantly decreased from one to 24 h. Finally, at 24 h, females and males showed a similar pattern of gene expression, where the genes AnstABCB2 and AnstABCBmember6 were the most up-regulated. However, differences can also be observed between the two sexes, in particular in terms of the temporal dynamics of the gene induction. In females, the relative expression of the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes was similar at one and 24 h and no significant differences were found between the relative expression values of the AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes at the two time points. In males, on the contrary, the AnstABCG4, AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes showed a modulated up-regulation across time and significant differences were observed in the relative expression of each gene at the two time-points: the induction of the AnstABCB2 and AnstABCBmember6 genes significantly increased from one to 24 h after exposure, while the opposite was observed in the AnstABCG4 gene (Fig. 1). Females, therefore, seem to have a prompter induction response than males and show high gene upregulation since one hour after exposure (Fig. 1). Notably, we also found that females had a higher percentage of survival than males after insecticide treatment at both one and 24 h (Table S1), which could suggest an important role of the

temporal dynamics of ABC transporter gene expression in the efficiency of defence response. Future studies, aimed to investigate the full set of ABC transporter genes recently identified in *An. stephensi* (De Marco et al., 2017), could allow to further investigate the occurrence of temporal shift in gene expression between females and males and the possible factors underlying it. Interestingly, ABC transporters have been shown to mediate both HEME and pesticide detoxification in the tick *Rhipicephalus microplus* (Lara et al., 2015). We might hypothesize that the need for females to detoxify the heme released during blood digestion determines a condition of pre-adaptation in terms of the expression of proteins involved in detoxification, making them more resistant to insecticides. It would thus be interesting to analyse the expression profiles of ABC transporter genes in *An. stephensi* during and after the blood meal.

## **5. Conclusions**

This study presents novel results on the expression of ABC transporter genes in response to insecticide treatment in the malaria vector *An. stephensi*, throughout experiments on adult mosquitoes of the two sexes. Three genes were shown to be induced in both females and males after permethrin exposure, among which two of them have previously been shown to be up-regulated also in larvae of the same *An. stephensi* Liston colony. Furthermore, the analysis of the expression profiles at two time points allowed us to detect sex-based differences in gene regulation, with a prompter gene induction in female mosquitoes.

## References

Bigoga, J.D., Ndangoh, D.N., Awono-Ambene, P.H., Patchoke, S., Fondjo, E., Leke, R.G.F., 2012. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* from the rubber cultivated area of Niete, South Region of Cameroon. *Acta Trop.* 124, 210–214.

doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.010

Buss, D.S., Callaghan, A., 2008. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* doi:10.1016/j.pestbp.2007.12.001

Buss, D.S., McCaffery, A.R., Callaghan, A., 2002. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *Med. Vet. Entomol.* 16, 218–222. doi:10.1046/j.1365-2915.2002.00365.x

Cafarchia, C., Porretta, D., Mastrantonio, V., Epis, S., Sasser, D., Iatta, R., Immediato, D., Ramos, R.A.N., Lia, R.P., Dantas-Torres, F., Kramer, L., Urbanelli, S., Otranto, D., 2015. Potential role of ATP-binding cassette transporters against acaricides in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Med. Vet. Entomol.* 29, 88–93. doi:10.1111/mve.12093

Capone, A., Ricci, I., Damiani, C., Mosca, M., Rossi, P., Scuppa, P., Crotti, E., Epis, S., Angeletti, M., Valzano, M., Sacchi, L., Bandi, C., Daffonchio, D., Mandrioli, M., Favia, G., 2013. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit. Vectors* 6, 182. doi:10.1186/1756-3305-6-182

Clements, A.N., 2000. The biology of mosquitoes, volume 2: Sensory reception and behaviour, in: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* p. 82. doi:10.1016/S0035-9203(00)90448-6

Dalla Bona, A.C., Faitta Chitolina, R., Lopes Fermino, M., de Castro Poncio, L., Weiss, A., Perreira Lima, J.B., Paldi, N., Soares Bernardes, E., Henen, J., Maori, E., 2016. Larval application of sodium channel homologous dsRNA restores pyrethroid insecticide susceptibility in a resistant adult mosquito population. *Parasit. Vectors* 9, 397.

doi:10.1186/s13071-016-1634-y

De Marco, L., Sassera, D., Epis, S., Mastrantonio, V., Ferrari, M., Ricci, I., Comandatore, F., Bandi, C., Porretta, D., Urbanelli, S., 2017. The choreography of the chemical defensome response to insecticide stress: insights into the *Anopheles stephensi* transcriptome using RNA-Seq. *Sci Rep.* 7, 41312–41323. doi:10.1038/srep41312

Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.ibmb.2013.11.001

Epis, S., Porretta, D., Mastrantonio, V., Comandatore, F., Sassera, D., Rossi, P., Cafarchia, C., Otranto, D., Favia, G., Genchi, C., Bandi, C., Urbanelli, S., 2014a. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasit. Vectors* 7, 349. doi:10.1186/1756-3305-7-349

Epis, S., Porretta, D., Mastrantonio, V., Urbanelli, S., Sassera, D., De Marco, L., Mereghetti, V., Montagna, M., Ricci, I., Favia, G., Bandi, C., 2014b. Temporal dynamics of the ABC transporter response to insecticide treatment: insights from the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Sci Rep.* 4, 7435–7439. doi: 10.1038/srep07435

Fang, F., Wang, W., Zhang, D., Lv, Y., Zhou, D., 2015. The cuticle proteins : a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitol Res.* 114, 4421–4429. doi:10.1007/s00436-015-4683-9

Figueira-Mansur, J., Ferreira-Pereira, A., Mansur, J.F., Franco, T.A., Alvarenga, E.S.L., Sorgine, M.H.F., Neves, B.C., Melo, A.C.A., Leal, W.S., Masuda, H., Moreira, M.F., 2013. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Mol. Biol.* 22, 648–658. doi:10.1111/imb.12052

Gnankiné, O., Bassolé, I.H.N., Chandre, F., Glitho, I., Akogbeto, M., Dabiré, R.K., Martin, T., 2013. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci Gennadius* (Homoptera: Aleyrodidae) and *Anopheles gambiae Giles* (Diptera: Culicidae) could compromise the sustainability of malaria vector control strategies in West Africa. *Acta Trop.* doi:10.1016/j.actatropica.2013.06.004

Goldstone, J.V., 2008. Environmental sensing and response genes in cnidaria: The chemical defensome in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Cell Biol. Toxicol.* 24, 483–502. doi:10.1007/s10565-008-9107-5

Gong, Y., Li, T., Gao, X. & Liu, N., 2013. Permethrin induction of multiple cytochrome P450 genes in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Biol. Sci. 9, 863–871. doi:10.7150/ijbs.6744

Lara, F.A., Pohl, P.C., Gandara, A.C., Ferreira, J.D.S., Nascimento-Silva, M.C., Bechara, G.H., Sorgine, M.H.F., Almeida, I.C., Vaz, I.D.S., Oliveira, P.L., 2015. ATP binding cassette transporter mediates both HEME and pesticide detoxification in tick midgut cells. PLoS One 10. doi:10.1371/journal.pone.0134779

Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R., 2006. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 674–682. doi:10.1016/j.ibmb.2006.05.009

Lima, E.P., Goulart, M.O.F., Rolim-Neto, M.L., 2014. Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporter as a defence mechanism against temephos in populations of *Aedes aegypti*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 109, 964–966. doi: 10.1590/0074-0276140164

Liu, N., Li, T., Reid, W. R., Yang, T. & Zhang, L., 2011. Multiple cytochrome P450 Genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PLoS ONE 6, e23403. doi:10.1371/journal.pone.0023403 6, e23403

Liu, N., 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. Annu. Rev. Entomol. 60, 537–559. doi:10.1146/annurev-ento-010814-020828

Merzendorfer, H., 2014. ABC Transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites, in: Cohen, E., (Ed.), Advances in Insect physiology. Target receptors in the control of the Insect pests: Part II. Academic Press, London, pp. 1-73.

Nkya, T.E., Akhouayri, I., Kisinza, W., David, J.P., 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. Insect Biochem Mol Biol. 43, 407-416. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.10.006



Royston, P. 1995. Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: The *W* test for normality. *App. Stat.*, 44, 547–551. doi:10.2307/2986146

Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2011. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 1323–1333. doi:10.1016/j.ijpara.2011.08.004

Porretta, D., Epis, S., Mastrantonio, V., Ferrari, M., Bellini, R., Favia, G., Urbanelli, S., 2016. How heterogeneous is the involvement of ABC transporters against insecticides? *Acta Trop.* 157, 131–135. doi:10.1016/j.actatropica.2016.02.002

Porretta, D., Gargani, M., Bellini, R., Medici, A., Punelli, F., Urbanelli, S., 2008. Defence mechanism against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med Vet Entomol.* 22, 48–54. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00712.x.

Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Okara, R.M., Van Boeckel, T., Godfray, H.C.J., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors* 3, 117. doi:10.1186/1756-3305-3-117

Steinberg, C.E.W., 2012. Arms race between plants and animals: biotransformation system, in: Steinberg C.E.W. (Eds.), *Stress ecology: environmental stress as ecological driving force and key player in evolution*. Springer, New York, pp 61-105

Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Gallardo-Escárate, C., 2014. Molecular characterization and transcription analysis of P-glycoprotein gene from the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *J Aquac Res Development* 5, 236–242. doi:10.4172/2155-9546.1000236

Vontas, J., David, J.P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G.K., Louis, C., Ranson, H., 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Mol. Biol.* 16, 315–324. doi:10.1111/j.1365-2583.2007.00728.x

WHO, 2016a. Eliminating malaria. Geneva

WHO, 2016b: Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva

Yadouleton, A., Martin, T., Padonou, G., Chandre, F., Asidi, A., Djogbenou, L., Dabiré, R., Aïkpon, R., Boko, M., Glitho, I., Akogbeto, M., 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit. Vectors* 4, 60. doi:10.1186/1756-3305-4-60

Yang, N., Xie, W., Jones, C.M., Bass, C., Jiao, X., Yang, X., Liu, B., Li, R., Zhang, Y., 2013. Transcriptome profiling of the whitefly *Bemisia tabaci* reveals stage-specific gene expression signatures for thiamethoxam resistance. *Insect Mol. Biol.* 22, 485–496. doi:10.1111/imb.12038

Yoon, K.S., Strycharz, J.P., Baek, J.H., Sun, W., Kim, J.H., Kang, J.S., Pittendrigh, B.R., Lee, S.H., Clark, J.M., 2011. Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance. *Insect Mol. Biol.* 20, 687–699. doi:10.1111/j.1365-2583.2011.01097.x

Zhu, F., Gujar, H., Gordon, J.R., Haynes, K.F., Potter, M.F., Palli, S.R., 2013. Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Sci. Rep.* 3, 1456. doi:10.1038/srep01456





## **ARTICOLO 2**

---

Insecticide exposure triggers a modulated expression of ABC transporter genes in larvae of *Anopheles gambiae* s.s.



# Insecticide exposure triggers a modulated expression of ABC transporter genes in larvae of *Anopheles gambiae* s.s.

Valentina Mastrantonio<sup>1,†</sup>, Marco Ferrari<sup>2,3,†</sup>, Agata Negri<sup>1,2</sup>, Tommaso Sturmo<sup>1</sup>, Guido Favia<sup>4</sup>, Daniele Porretta<sup>1</sup>, Sara Epis<sup>2,\*</sup>, and Sandra Urbanelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental Biology, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy;

<sup>2</sup> Department of Biosciences and Pediatric Clinical Research Center, University of Milan, 20133 Milan, Italy;

<sup>3</sup> Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, TX 78227, USA

<sup>4</sup> School of Bioscience and Veterinary Medicine, University of Camerino, 62032 Macerata, Italy;

\* Correspondence: sara.epis@unimi.it; Tel.: +39-02-503-14710

† These authors contributed equally to this work.

Received: 22 January 2019;

Accepted: 28 February 2019;

Published: 5 March 2019

**Keywords:** insecticide stress; mosquitoes; vector-control; chemical defensome; ABC transporters; pyrethroids

---

**Abstract:** Insecticides remain a main tool for the control of arthropod vectors. The urgency to prevent the insurgence of insecticide resistance and the perspective to find new target sites, for the development of novel molecules, are fuelling the study of the molecular mechanisms involved in insect defence against xenobiotic compounds. In this study, we have investigated if ATP-binding cassette (ABC) transporters, a major component of the defensible machinery, are involved in defence against the insecticide permethrin, in susceptible larvae of the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto. Bioassays were performed with permethrin alone, or in combination with an ABC transporter inhibitor. Then we have investigated the expression profiles of five ABC transporter genes at different time points following permethrin exposure, to assess their expression patterns across time. The inhibition of ABC transporters increased the larval mortality by about 15-fold. Likewise, three genes were up-regulated after exposure to permethrin, showing different patterns of expression across the 48 h. Our results provide the first evidences of ABC transporters involvement in defence against a toxic in larvae of *An. gambiae* s.s. and show that the gene expression response is modulated across time, being continuous, but stronger at the earliest and latest times after exposure.

## 1. INTRODUCTION

Vector-borne diseases, caused by pathogens and parasites transmitted by bloodsucking arthropods, such as mosquitoes, sandflies, ticks, and tse-tse flies, are a major threat to human health and well-being [1]. Among them, malaria, transmitted by *Anopheles* mosquitoes, is undoubtedly one of the most serious life-threatening diseases for humans [1]. Vector control through insecticides remains a main tool for malaria prevention, although progress toward the development of alternative or complementary vector control strategies has been made [2,3]. However, environmental pollution and the increasing insecticide resistance are seriously hampering the use of insecticides and their efficacy. Resistant mosquitoes, belonging to different species, have indeed been recorded in 64 countries with ongoing malaria transmission, with resistance to pyrethroids, being the most common [4–6].

Chemical detoxification is likely to play an important role in the development of insecticide resistance. Detoxification in insects is achieved through an array of protein systems, including detoxifying enzymes and efflux pump transporters [7–11]. Natural selection can act on the genes coding for detoxifying proteins, promoting the evolution of metabolic resistance. In susceptible strains, the assessment of the expression of detoxifying genes in response to insecticides could contribute to the comprehension of the molecular mechanisms underlying insecticide detoxification. Furthermore, detoxifying genes could be exploited as targets for novel classes of insecticide compounds. For example, the inhibition of detoxifying efflux pumps has been shown to increase the susceptibility to insecticides in several arthropod species, including malaria vectors [7–10]. Combined treatments of insecticides with inhibitors of efflux pump transporters could therefore allow to reduce the dose and frequency of insecticide applications and to generate a cascade of positive effects (e.g., reduction of the risk of resistance development, minor pesticide pollution and reduced damage to non-target fauna) [12,13]. In this context, a major goal is to identify the genes encoding for the detoxifying proteins in order to achieve species- and gene-specific inhibition [7–10].

ATP-binding cassette (ABC) transporters are ATP-dependent efflux pumps, located in the cellular membrane of prokaryotic and eukaryotic organisms, belonging to the ATP-binding cassette (ABC) transporter family. Among the eight sub-families (i.e., ABCB-ABCH) included in the ABC family, three of them, ABCB, ABCC and ABCG, are involved in xenobiotic detoxification. ABC transporters are part of a wider defence system



comprising several gene families and pathways that allow an organism to transform and eliminate toxic chemicals (chemical defenses) [12–19].

In recent years, several studies have documented that ABC transporters play an important role in insecticide detoxification in a variety of arthropod species, ranging from ticks, to bed bugs, to body lice and mosquitoes [9,13,19–25]. On the other hand, the pattern of ABC transporter involvement in insecticide detoxification is different in different strains (resistant vs. susceptible), life-stages (adults vs. larvae) and sexes of the same species [8, 26, 27]. In addition, even though ABC transporters can act against all major insecticide classes, including organochlorines, organophosphates, pyrethroids and even *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins, some heterogeneity can be observed within and between species [14,28]. For example in the mosquito *Culex pipiens*, ABC transporters have been shown to be involved against endosulfan, ivermectin and cypermethrin, but not against chlorpyrifos [24]. Likewise, ABC transporters were shown to be involved against temephos in the mosquitoes *Aedes caspius* [13] and *Ae. aegypti* [10], but not in *Anopheles stephensi* [15]. Further studies are thus required to determine the occurrence of common patterns in ABC transporter engagement, in relation with taxa or insecticide classes.

This study is focused on the mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto, the principal malaria vector in sub-Saharan African regions, and on the pyrethroid insecticide permethrin. Pyrethroids, among the different classes of insecticides recommended by the World Health Organization (WHO), still occupy a prominent position in malaria vector control. They are indeed widely used on approved long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spraying programmes (IRS) to control adult mosquitoes [1].

In the case of *An. gambiae* s.s., there are circumstantial evidences for the involvement of ABC transporters in pyrethroid resistance, i.e., the results from a whole genome-transcriptomic study, showing a constitutive over-expression of one ABCC member in adult deltamethrin-resistant individuals [29]. More recently, ABC transporters have been shown to be involved in the resistance against pyrethroids in adult individuals [20]. In addition, due to the wide use of pyrethroids in crop pest control, also larval stages of *An. gambiae* can be exposed to these insecticides in the developing sites near crop fields, which would lead to a further risk of insecticide resistance insurgence [30–32]. To date, however, no studies have been focused on the role of ABC transporters against pyrethroids in larval stages of this species. Here, we investigated the potential association between ABC

transporters. and permethrin using both laboratory bioassays and gene induction experiments. We conducted laboratory bioassays with permethrin alone or in combination with an ABC transporters inhibitor, to assess if these efflux pumps are a mechanism of defence against this insecticide in the larval stage. In the genome of *An. gambiae*, 34 ABC transporter genes have been identified [14]. Among them, we investigated the expression profiles of five genes encoding for ABC transporters that were previously found involved in insecticide detoxification in other arthropod species [10, 33–38].

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Mosquitoes

All mosquito larvae used in this study derived from an *An. gambiae* s.s. colony from the University of Camerino (Camerino, Italy), previously tested for its susceptibility to permethrin ( $2 < \text{ratio RR50} < 5$ , according to Fossog and coworkers [39]). This colony was obtained in 2008 from the Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP) in Ouagadougou (Burkina Faso, West Africa), and descended from wild mosquitoes collected in Burkina Faso. Mosquitoes have then been reared for about 9 years in the Camerino insectary, where they were maintained at standard lighting conditions of 12 h light and 12 h dark, a relative humidity of  $80 \pm 5\%$  and temperature of  $30^\circ\text{C}$ , in aseptic conditions during both the immature and adult stages. The larvae were grown in tanks filled with culture water containing sterile minced commercial mouse food.

### 2.2. Bioassays

In order to assess if ABC transporters are involved against permethrin in larvae of *An. gambiae* s.s., bioassays with insecticide, alone or in combination with a sub-lethal dose of the ABC inhibitor verapamil, were carried out, according to standard protocols [32]. Groups of 25 third-instar larvae were placed into 250 mL plastic cups with 100 mL of spring water, and then insecticide or insecticide plus inhibitor were added. In the bioassays with insecticide alone, six concentrations of permethrin (PESTANAL, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) were used, ranging from 15 to 700 ppb (i.e., 15, 47, 92, 230, 350 and 700 ppb), leading to a mortality from 1 to 99%. In the bioassays with insecticide and insecticide plus verapamil, four concentrations were tested: 4.8, 15, 47 and 92 ppb. To determine the sub-lethal dose of verapamil (i.e., the highest dose at which no dead larvae were observed) six concentrations were used (20, 40, 80, 100, 160 and 240 ppm). Larvae treated only with acetone (the solvent of permethrin, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) and water were also included as controls. All experiments were performed in quadruplicate. Mortality data were registered at 24 h after treatment and analysed by Probit regression analysis to estimate  $\text{LD}_{50}$  dose and their 95% confidence intervals (CIs) using the Poloplus software [40].

The synergistic ratio was then calculated from the  $\text{LD}_{50}$  doses estimated from the treatments using permethrin and permethrin plus verapamil to assess the effect of the ABC

transporters inhibition on the *An. gambiae* s.s. larvae. The hypotheses of equality (equal slopes and intercepts) and parallelism (equal slopes) of the regression lines of the two treatments were also tested using the likelihood-ratio test, as implemented in the software Poloplus.

### **2.3. Induction of ABC Transporter Gene Expression**

Five genes encoding for ABC transporters were analyzed for their expression profiles in treated or untreated larvae of *An. gambiae* s.s: three members of the ABCB sub-family (i.e., AGAP005639, AGAP006273, AGAP002278); one member of the ABCC sub-family (AGAP006427); and one member of sub-family ABCG (AGAP001333). They were selected in order to investigate members of all ABC transporter sub-families involved in insecticide defence (ABCB, ABCC and ABCG), and on the basis of previous studies showing their involvement against insecticides in susceptible and resistant insect species [10,33–38]. Oligonucleotide primers were designed from the sequences of each gene using the Primer3, Beacon Designer<sup>TM</sup> and mFold softwares [41] and used for standard and quantitative RT-PCRs. In order to confirm the specificity of the amplifications, the amplicons obtained using standard PCR conditions (see below) were sequenced and the obtained sequences blasted into the Genbank database. In order to analyze the expression profile of ABC transporter genes after permethrin exposure, mosquito larvae were treated with the insecticide following the protocol described above. The LD<sub>50</sub> dose of permethrin (297.84 ppb), estimated by the above bioassays, was used to treat the larvae; larvae at five time-points after exposure (2, 4, 6, 24 and 48 h) were collected and analyzed. Six replicas were effected for each time point. Three pools of 10 individuals, each pool from two plastic vessels, were collected at the five time-points, and stored in RNA later at -80 °C until subsequent molecular analysis. Negative controls (larvae treated only with acetone and water), were also collected for each time of exposure. RNA was extracted from each pool of individuals using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Then, total RNA was eluted into nuclease-free water and the concentration of RNA was determined at 260 nm using a NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). cDNAs were synthesized from 150 ng of total RNA using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with random hexamers. The cDNA was used as template in reverse transcription (RT)-PCR reactions using the primers reported in Table 1.

**Table 1.** Primer sequences used to amplify fragments of ATP-binding cassette (ABC) transporters genes in *Anopheles gambiae* s.s.

| Vector Base Sequence ID | ABC Sub-Family | Forward 3'-5'            | Reverse 3'-5'             | PCR Product Size (bp) |
|-------------------------|----------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| AGAP005639              | ABCB           | TTCATCACGAAACTACCGAAC    | GTCCCTTACTTGCTCGCT        | 204                   |
| AGAP006273              | ABCB           | CACGCTGGGCTATCAGTA       | AAAACCTCCACCAATCGAAACG    | 118                   |
| AGAP002278              | ABCB           | AAAGGTGACAGAGAGGTGTAGGAA | ACGCCATGCACTAAACTATCACATT | 104                   |
| AGAP006427              | ABCC           | AAAGTGTCTACGGCATGGTGAAG  | CAGCCTCCTTAATCGGTTTCAGTTT | 108                   |
| AGAP001333              | ABCG           | GICTCCTGTCGTTGTAGITTT    | CGTAACAGAAACATCGTCCATT    | 174                   |
| AGAP010592              | <i>rps7</i>    | GGCGATCATCATCTACGTGC     | GTAGCTGCTGCAAACCTTCGG     | 459                   |
| AGAP000651              | <i>act 5C</i>  | TCTGGCACCACACGTTCTAC     | CAGGTAGTCGGTGAGATCGC      | 313                   |

RT-PCRs on target genes were performed using a BioRad CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with the following conditions: 50 ng of cDNA; 250 nM of forward and reverse primers; 98 °C for 30 s, 40 cycles of 98 °C for 15 sec, 57–59 °C for 30 sec; fluorescence acquisition at the end of each cycle; melting curve analysis after the last cycle. In order to analyze the expression of the target genes, the efficiency of the new primer pairs was assessed through the analysis of the standard curves, then the cycle threshold (Ct) values were determined for each gene and normalized according to two endogenous reference genes: the ribosomal protein S7 (*rps7*) gene and the actin gene (*act 5C*) (Table 1). The expression of ABC transporters genes in the control group was considered as the basal level. Shapiro–Wilk test was performed to check normality of the normalized expression data. For each gene, univariate two-way ANOVA was performed to compare differences in relative expression between treated and control larvae and among time points. Subsequent post-hoc Tukey tests were performed for pairwise comparisons among time points. All analyses were performed using the software IBM SPSS Statistics (IBM Corp. Released 2013, Armonk, NY, USA).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Laboratory Bioassays

The sub-lethal dose of the inhibitor verapamil was 80 ppm, as no mortality was observed at this concentration, while dead larvae were observed from the 100 ppm concentration (Figure S1). Mortality data of the bioassays with insecticide and insecticide plus verapamil recorded at 24 h were well described by the probit dose–response model (chi-squared goodness-of-fit test,  $p > 0.05$ ). Both the hypotheses of the regression line equality and parallelism between treatments were rejected, showing significant differences between the two treatments (Table 2).

**Table 2.** Toxicity of insecticide and insecticide + ABC transporters inhibitor. LD<sub>50</sub>, 95% Confidence Intervals (95% CI) and slopes estimated from mortality data by probit analysis are shown. SR, synergistic ratio.

| Insecticide               | Slope ( $\pm$ SE) | LD <sub>50</sub> (95% CI)    | SR (95% CI)            | $\chi^2$ (df)   |          |             |
|---------------------------|-------------------|------------------------------|------------------------|-----------------|----------|-------------|
|                           |                   |                              |                        | Goodness-of-Fit | Equality | Parallelism |
| permethrin                | 1.514 (0.131)     | 297.84 ppb<br>(248.5–368.18) |                        | 2.467 (4)       | 317(2) * | 11.40(1) *  |
| permethrin +<br>verapamil | 2.259 (0.181)     | 18.69 ppb (15.89–<br>21.81)  | 15.94<br>(12.37–20.53) | 13.37(5)        |          |             |

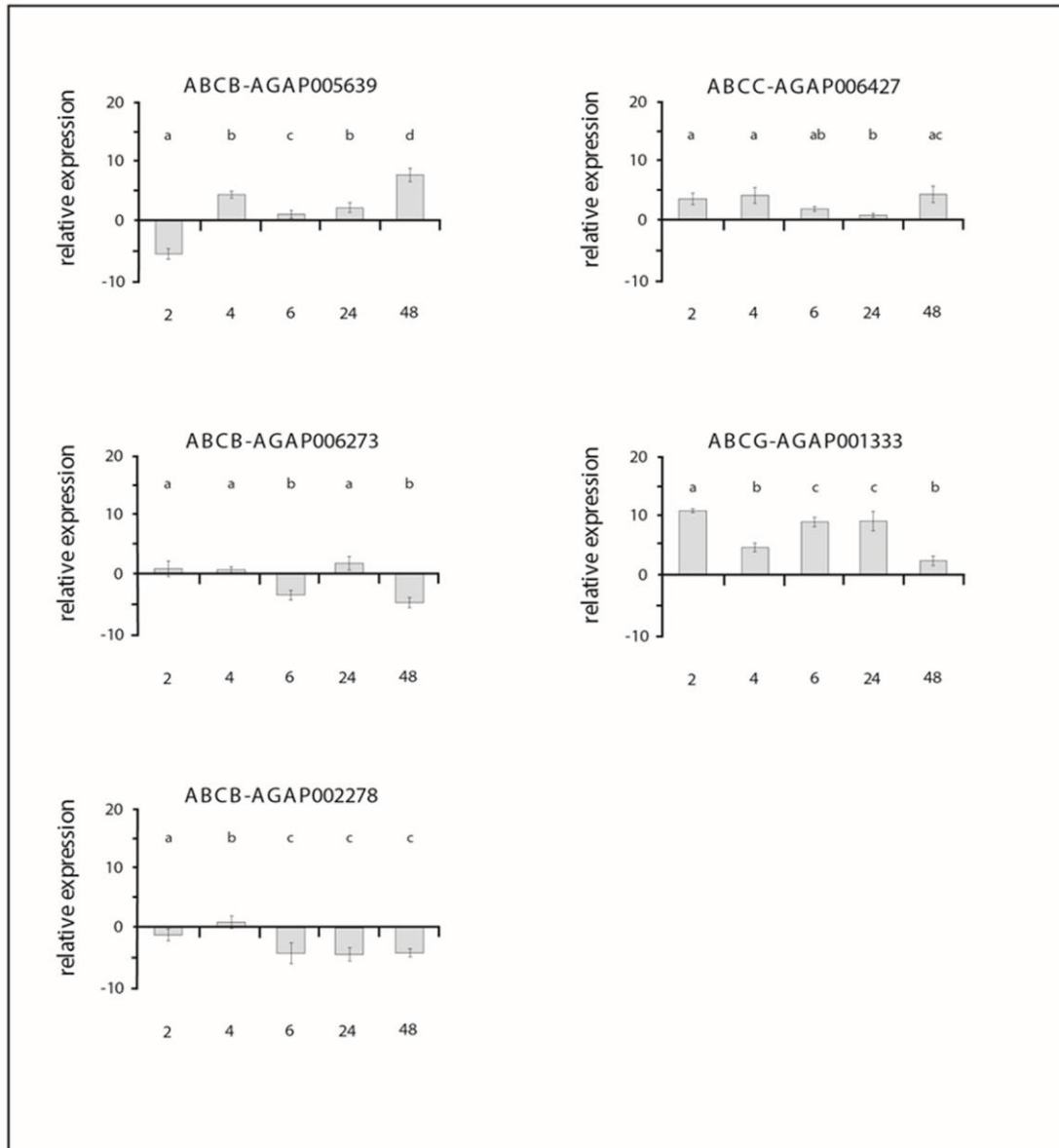
\* Chi-Square probability  $p < 0.05$ .

The LD<sub>50</sub> dose and 95% Confidence Intervals (CIs) estimated was 297.84 ppb (248.5–368.18) for the treatment with permethrin alone, and 18.69 ppb (15.89–21.81) for treatment with insecticide plus verapamil. A synergistic factor of 15.94 (12.37–20.53) was estimated between the LD<sub>50</sub> of the two treatments (Table 2, near here)

#### 3.2. Expression Profiles of ABC Transporter Genes after Permethrin Exposure

The sequencing of the amplicons obtained by conventional PCRs confirmed the specificity of the amplification for each selected ABC transporter gene, with an identity of 100% with the sequences of the ABC transporter genes of *An. gambiae* s.s. available in the databases.

All primer pairs used to amplify ABC transporter genes showed an efficiency ranging from 95% to 105%. The results obtained from gene expression analyses for each gene in treated larvae, in comparison with the untreated larvae, are shown in Figure 1 and Table S1.



**Figure 1.** Relative expression of *Anopheles gambiae* s.s. ABC genes measured by quantitative PCR after different times of permethrin exposure. The expression level in non-treated larvae was considered to be the basal level. The internal reference genes *rps7* and *act5C* for *An. gambiae* s.s. were used to normalize the expression levels. The values are expressed as means  $\pm$  standard deviations. In x-axes: time of permethrin exposure: 2, 4, 6, 24 and 48 h. For each gene, equal letter means post-hoc Tukey tests  $p > 0.05$ ; different letter means post-hoc Tukey tests  $p < 0.05$

The Shapiro–Wilk test showed normal distribution of the data (all tests  $p > 0.05$ ). The ANOVA analysis showed that the expression levels of all ABC genes analysed were significantly affected by permethrin treatment, by the time of larval exposure and by the combination of these two factors (Table S2). For each gene, post-hoc Tukey tests showed significant differences among the expression levels across time (Figure 1).



## 4. DISCUSSION

### 4.1. Involvement of ABC Transporters in Permethrin Detoxification

The use of ABC transporter inhibitors has greatly contributed to document the involvement of these efflux pumps in defence/resistance against insecticides in arthropod vectors [14]. More recently, transcriptional studies allowed not only to further support the detoxifying role of ABC transporters, but also to identify which genes encoding for ABC transporters are mainly involved [12,14,15]. In this study, using both of the above experimental approaches, we have provided evidence for the involvement of ABC transporters in the defence against permethrin in larvae of *An. gambiae* s.s. By exposing third-instar larvae to the LD<sub>50</sub> dose of permethrin, indeed, we observed that mortality was about 15-fold greater after the treatment with insecticide plus ABC inhibitor, than after treatment with insecticide alone (Table 2). Likewise, the exposure of larvae to the insecticide led to transcriptional induction of three out of the five ABC transporter genes analyzed (Figure 1), which further supports the involvement of ABC transporters in the defence against permethrin [14].

Among the ABC transporter genes analyzed in *An. gambiae* s.s., some of them showed an activation pattern similar to that observed in other insect species. For example, genes orthologues to the ABCG-AGAP001333 gene here examined have been shown to be over-transcribed in *Anopheles arabiensis* and in *An. stephensi* mosquitoes exposed to Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and permethrin, respectively [19,33–35]. These results indicate that this ABCG transporter is likely to play an important role in different mosquito species (as well as in other insects, e.g., in *Bemisia tabaci* exposed to neonicotinoids [38]) as a defence system against different insecticides. Notably, the *AnstABCG4* transporter gene (ASTE008861) of *An. stephensi* was found over-expressed after 2, 4, 6, 24 and 48 h of exposure to the LD<sub>50</sub> dose of permethrin [34], which is the same pattern that we observed in *An. gambiae* s.s. larvae. The comparison of the expression profiles in *An. gambiae* s.s. and *An. stephensi* susceptible larvae, exposed to LD<sub>50</sub> permethrin dose, not only suggests that the ABCG4 transporter is involved in defence against permethrin in both species, but also shows that the induction pattern is similar. Similarity between the two species can also be observed in the transcriptional response of the orthologous genes ABCB-AGAP006273 and ASTE000608/*AnstABCB3*: in the larvae of both species, no-differential expression or up-regulation were observed during the 2–48 h of permethrin exposure. The other ABC transporters analysed in *An. gambiae* s.s. showed a more heterogeneous involvement among species and insecticides. This is the case of

the ABCB AGAP002278 gene that showed no transcriptional induction by permethrin in *An. gambiae* s.s. larvae (Figure1), while its orthologous in *An. stephensi* (ASTE003466/*AnstABCBmember6*) was found up-regulated in larvae exposed to this insecticide [33,34]. Similarly, the ABCB-AGAP005639 gene, that we found up-regulated in *An. gambiae* s.s. after 4 and 48 h of exposure, was found down-regulated in previous studies on *An. stephensi* (ASTE009548/*AnstABCB2*) [33,34]. Interestingly, in susceptible larvae of the mosquito *Aedes aegypti*, the transporter *AegP-gp*–AAEL010379-PA, orthologous to the *An. gambiae* s.s. ABCB-AGAP005639, showed an increased expression of about eight-fold compared to control after 48 h of exposure to the LD<sub>50</sub> dose of the organophosphate temephos, which supports its involvement in temephos defence [10]. In summary, although some similarities exist between species in the response to insecticides, more studies are needed to assess if there are conserved patterns.

Regarding *An. gambiae* s.s, future studies addressing the gene expression of other ABC transporter genes during insecticide exposure are needed to gain a more comprehensive picture of how many ABC transporter genes are involved in the defense against permethrin. Furthermore, mRNA expression studies could also be addressed to analyse the ABC transporter gene expression, not only after the exposure to the toxic, but also after treatment with ABC transporter inhibitors or after treatment with inhibitors in combination with insecticides. For example, the exposure to verapamil of MCF-7 human mammary carcinoma cell lines and hepatocellular carcinoma has been shown to reduce the expression levels the MDR1 ABC transporter gene [42,43]. Likewise, a significant decrease in P-gp expression and transport activity has been observed when L1210/VCR neoplastic cells were treated with trans retinoic acid (ATRA) and verapamil [44]. Although the mechanism of down-regulation of ABC transporter genes by verapamil is not known, these data suggest that it might influence the ABC transporters at both protein and mRNA levels. In arthropods, at our best knowledge, verapamil has been used only as synergist and no data are available about the expression levels of ABC transporter genes under verapamil exposure, alone or in combination with an insecticide [14]. If a down-regulation effect of ABC transporter genes by verapamil would exist, as in human cancer cell lines, it could in part explain the lethal effect on exposed larvae to permethrin plus verapamil. Furthermore, the analyses of the expression patterns in larvae exposed to verapamil or in association with permethrin could contribute to describe the possible involvement of ABC transporter genes in cellular defense.

#### **4.2. Dynamics of Gene Transcriptional Induction during Permethrin Exposure**

The dynamics of the detoxifying gene activation during insecticide exposure is currently poorly investigated in arthropods [19,27,33,34]. Most of the studies that analysed the transcriptional response of defensome genes [19] after insecticide exposure have indeed been focused on a single time point [14]. Some studies that have recently investigated the expression profiles of detoxifying genes at different time points during insecticide exposure, are showing that defence response to insecticide stress is a dynamic process where the genes involved in the cellular defence can turn on and off at different time points during insecticide exposure [19,34,45–48].

With respect to the ABC transporters, this pattern can be due to the specificity between insecticide substrate and the transporter. Different ABC transporter genes have been indeed shown to be up regulated against different insecticides within the same species [8,15,26,27]. Furthermore, the high cost of detoxification can lead to a reallocation of the energetic resources and, consequently, to the turn off of some genes during insecticide exposure. Two out the five ABC transporter genes analysed in *An. gambiae* s.s. were down-regulated or not significantly up-regulated during the permethrin exposure, which supports the above view (Figure 1).

The analysis of gene expression profiles across time allowed us to show not only which genes encoding for ABC transporters were up-regulated, but also the dynamics of their transcriptional response during permethrin exposure. The three genes that were found up-regulated in *An. gambiae* s.s., showed different patterns of expression across the 48 h of permethrin exposure. The ABCB-AGAP005639 was found up-regulated only at 4 and 48 h with a peak of expression registered at 48 h post-exposure (i.e., about eight-fold compared to control). The ABCG-AGAP001333 gene was up-regulated since 2 hours after treatment and its up-regulation persisted until 48 h maintaining similar values across time, similarly to the ABCC-AGAP006427 gene (with the exception of 24 h) (Figure 1). These results showed therefore the occurrence of a modulated response of the ABC transporter genes across time, where each single gene is up- or down-regulated during insecticide exposure at different time-points, and up-regulation of multiple genes occurs at different time-points. By considering the profiles of all up-regulated genes during permethrin exposure, a more general expression pattern can be observed that is consistent with the role of ABC transporters in the Phases 0 and III during the detoxification process [17–19]. Consistently, it can be observed that some genes were up-regulated across all time points from 6 to 48 h (ABCC-AGAP006427 and ABCG-AGAP001333) as well as that the ABCB-AGAP005639 gene was up-regulated at early or late time-points (e.g., 4 and 48 h), which depicts a

continuous action of ABC transporters across time and would suggest a stronger response at the earliest and latest times after exposure as observed also in the *An. stephensi* mosquito [19].

## 5. CONCLUSIONS

The urgency to protect the current chemical weapons used to control arthropod vectors from resistance insurgence and the perspective to find new target sites are fuelling the study of the molecular defence mechanisms against insecticides. In this study, we provide evidences for the involvement of ABC transporter efflux pumps in defence against permethrin in *An. gambiae* s.s. larvae. By analysing the expression profiles of ABC transporter genes at several time points, moreover, we found three genes up-regulated throughout the time of permethrin exposure (48 h). Although exposure time and insecticide dose can affect gene induction, as well as only a subset of the ABC transporter genes has been analysed, our results clearly support the occurrence of a modulated transcriptional response during insecticide exposure in *An. gambiae* s.s. This is consistent with the patterns observed for ABC transporters in the mosquito *An. stephensi* [19,33,34], or in other gene families involved in xenobiotic defence, such as CYP450 [45,46] and Cuticular Proteins (CPs) [48]. Future studies should be directed toward the analysis of induction of all defensome genes to understand how they work together during insecticide stress and to find key genes that could be potential targets for the development of gene-silencing based control tools.

## References

1. WHO. Eliminating Malaria; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2016.
2. McGraw, E.A.; O'Neill, S.L. Beyond insecticides: New thinking on an ancient problem. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 181–193. [CrossRef] [PubMed]
3. Wilke, A.B.; Marrelli, M.T. Paratransgenesis: A promising new strategy for mosquito vector control. *Parasit. Vectors* 2015, 8, 342. [CrossRef] [PubMed]
4. WHO. Global Plan for Insecticide Resistance Management; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2012; p. 130.
5. Liu, N. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 2015, 60, 537–559. [CrossRef] [PubMed]
6. Ranson, H.; Lissenden, N. Insecticide resistance in african *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol.* 2016, 32, 187–196. [CrossRef] [PubMed]
7. Chouaïbou, M.; Zivanovic, G.B.; Knox, T.B.; Jamet, H.P.; Bonfoh, B. Synergist bioassays: A simple method for initial metabolic resistance investigation of field *Anopheles gambiae* s.l. populations. *Acta Trop.* 2014, 130, 108–111. [CrossRef] [PubMed]
8. Pohl, P.C.; Klafke, G.M.; Carvalho, D.D.; Martins, J.R.; Daffre, S.; da Silva Vaz, I. Jr.; Masuda, A. ABC transporter efflux pumps: A defence mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int. J. Parasitol.* 2011, 41, 1323–1333. [CrossRef] [PubMed]
9. Yoon, K.S.; Strycharz, J.P.; Baek, J.H.; Sun, W.; Kim, J.H.; Kang, J.S.; Pittendrigh, B.R.; Lee, S.H.; Clarck, J.M. Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance. *Insect Mol. Biol.* 2011, 20, 687–699. [CrossRef] [PubMed]
10. Figueira-Mansur, J.; Ferreira-Pereira, A.; Mansur, J.F.; Franco, T.A.; Alvarenga, E.S.; Sorgine, M.H.; Neves, B.C.; Melo, A.C.; Leal, W.S.; Masuda, H.; et al. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Mol. Biol.* 2013, 226, 648–658. [CrossRef] [PubMed]

11. Bona, A.C.; Chitolina, R.F.; Fermino, M.L.; de Castro Poncio, L.; Weiss, A.; Lima, J.B.; Paldi, N.; Bernardes, E.S.; Henen, J.; Maori, E. Larval application of sodium channel homologous dsRNA restores pyrethroid insecticide susceptibility in a resistant adult mosquito population. *Parasit. Vectors* 2016, 14, 397. [CrossRef] [PubMed]
12. Buss, D.S.; Callaghan, A. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide: Herbicide and fungicide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2008, 90, 141–153. [CrossRef]
13. Porretta, D.; Gargani, M.; Bellini, R.; Medici, A.; Punelli, F.; Urbanelli, S. Defence mechanism against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: The P-glycoprotein efflux pumps. *Med. Vet. Entomol.* 2008, 22, 48–54. [CrossRef] [PubMed]
14. Dermauw, W.; van Leeuwen, T. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2014, 45, 89–110. [CrossRef] [PubMed]
15. Porretta, D.; Epis, S.; Mastrantonio, V.; Ferrari, M.; Bellini, R.; Favia, G.; Urbanelli, S. How heterogeneous is the involvement of ABC transporters against insecticides? *Acta Trop.* 2016, 157, 131–135. [CrossRef] [PubMed]
16. Goldstone, J.; Hamdoun, A.M.; Cole, B.; Ashby, M.H.; Scally, M.; Dean, M.; Epel, D.; Hahn, M.E.; Stegeman, J.J. The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev. Biol.* 2006, 300, 366–384. [CrossRef] [PubMed]
17. Goldstone, J. Environmental sensing and response genes in cnidaria: the chemical defensome in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Cell. Biol. Toxicol.* 2008, 24, 483–502. [CrossRef] [PubMed]
18. Steinberg, C.E.W. Arms race between plants and animals: biotransformation system. In *stress ecology: environmental stress as ecological driving force and key player in evolution*; Steinberg, C.E.W., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012; pp. 61–105. [CrossRef]
19. De Marco, L.; Sassera, D.; Epis, S.; Mastrantonio, V.; Ferrari, M.; Ricci, I.; Comandatore, F.; Bandi, C.; Porretta, D.; Urbanelli, S. The choreography of the chemical

- defensome response to insecticide stress: Insights into the *Anopheles stephensi* transcriptome using RNA-Seq. *Scien. Rep.* 2017, 7, 41312. [CrossRef] [PubMed]
20. Pignatelli, P.; Ingham, V.A.; Balabanidou, V.; Vontas, J.; Lycett, G.; Ranson, H. The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: Phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 2018, 27, 110–122. [CrossRef] [PubMed]
21. Pohl, P.C.; Klafke, G.M.; Júnior, J.R.; Martins, J.R.; da Silva Vaz, I., Jr.; Masuda, A. ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Paras. Res.* 2012, 111, 2345–2351. [CrossRef] [PubMed]
22. Cafarchia, C.; Porretta, D.; Mastrantonio, V.; Epis, S.; Sasser, D.; Iatta, R.; Immediato, D.; Ramos, R.A.; Lia, R.P.; Dantas-Torres, F.; et al. Potential role of ATP-binding cassette transporters against acaricides in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. *Med. Vet. Entomol.* 2015, 29, 88–93. [CrossRef] [PubMed]
23. Zhu, F.; Gujar, H.; Gordon, J.R.; Haynes, K.F.; Potter, M.F.; Palli, S.R. Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Sci. Rep.* 2013, 3, 1456. [CrossRef] [PubMed]
24. Buss, D.S.; McCaffery, A.R.; Callaghan, A. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *Med. Vet. Entomol.* 2002, 16, 218–222. [CrossRef] [PubMed]
25. Lima, E.P.; Goulart, M.O.F.; Neto, M.L.R. Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporters as a defence mechanism against temephos in populations of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2014, 109, 964–966. [CrossRef] [PubMed]
26. Valenzuela-Muñoz, V.; Nuñez-Acuña, G.; Gallardo-Escárate, C. Molecular characterization and transcription analysis of P-glycoprotein gene from the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *J. Aquacult. Res. Dev.* 2014, 5, 4. [CrossRef]
27. Mastrantonio, V.; Ferrari, M.; Epis, S.; Negri, A.; Scuccimarra, G.; Montagna, M.; Favia, G.; Porretta, D.; Urbanelli, S.; Bandi, C. Gene expression modulation of ABC transporter genes in response to permethrin in adults of the mosquito malaria vector *Anopheles stephensi*. *Acta Trop.* 2017, 171, 37–43. [CrossRef] [PubMed]

28. Heckel, D.G. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2012, 104, 103–110. [CrossRef]
29. Bonizzoni, M.; Afrane, Y.; Dunn, W.A.; Atieli, F.K.; Zhou, G.; Zhong, D. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. *PLoS ONE* 2012, 7, e44607. [CrossRef] [PubMed]
30. Yadouleton, A.; Martin, T.; Padonou, G.; Chandre, F.; Asidi, A.; Djogbenou, L.; Dabiré, R.; Aïkpon, R.; Boko, M.; Glitho, I.; et al. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in Northern Benin. *Parasit. Vectors* 2011, 4, 60. [CrossRef] [PubMed]
31. Bigoga, J.D.; Ndangoh, D.N.; Ambene, P.H.A.; Patchoké, S.; Fondjo, E.; Leke, R.G. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* from the rubber cultivated area of Niete, South Region of Cameroon. *Acta Trop.* 2012, 124, 210–214. [CrossRef] [PubMed]
32. Gnankiné, O.; Bassolé, I.H.N.; Chandre, F.; Glitho, I.; Akogbeto, M.; Dabiré, R.; Martin, T. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) could compromise the sustainability of malaria vector control strategies in West Africa. *Acta Trop.* 2013, 128, 7–17. [CrossRef] [PubMed]
33. Epis, S.; Porretta, D.; Mastrantonio, V.; Urbanelli, S.; Sasser, D.; Rossi, P. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasit. Vectors* 2014, 7, 349. [CrossRef] [PubMed]
34. Epis, S.; Porretta, D.; Mastrantonio, V.; Comandatore, F.; Sasser, D.; de Marco, L. Temporal dynamics of the ABC transporter response to insecticide treatment: Insights from the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Sci. Rep.* 2014, 4, 7435. [CrossRef] [PubMed]
35. Jones, C.M.; Toé, H.K.; Sanou, A.; Namountougou, M.; Hughes, A.; Diabaté, A.; Dabiré, R.; Simard, F.; Ranson, H. Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS ONE* 2012, 7, e45995. [CrossRef] [PubMed]
36. Merzendorfer, H. ABC Transporters and their role in protecting insects from pesticides and their metabolites. In *Advances in Insect Physiology. Target Receptors in*



the Control of the Insect Pests: Part II; Cohen, E., Ed.; Academic Press: London, UK, 2014; pp. 1–73. [CrossRef]

37. Tribble, N.D.; Burka, J.F.; Kibenge, F.S.B. Evidence for changes in the transcription levels of two putative P-glycoprotein genes in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in response to emamectin benzoate exposure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007, 153, 59–65. [CrossRef] [PubMed]

38. Yang, N.; Xie, W.; Yang, X.; Wang, S.; Wu, Q.; Li, R.; Pan, H.; Liu, B.; Shi, X.; Fang, Y.; et al. Transcriptomic and proteomic responses of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, to thiamethoxam. *PLoS ONE* 2013, 8, e61820. [CrossRef] [PubMed]

39. Fossog, T.B.; Kopya, E.; Ndo, C.; Menze-Djantio, B.; Costantini, C.; Njiokou, F.; Awono-Ambene, P.; Nkondjio, A.C. Water quality and *Anopheles gambiae* larval tolerance to pyrethroids in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon). *J. Trop. Med.* 2012, 429817. [CrossRef]

40. Robertson, J.A.; Preisler, H.K.; Russell, R.M. *Polo Plus: Probit and Logit Analysis*; LeOra Software: Petaluma, CA, USA, 2003.

41. Thornton, B.; Basu, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2011, 39, 145–154. [CrossRef] [PubMed]

42. Dönmez, Y.; Akhmetova, L.; İ'seri, Ö.D.; Kars, M.D.; Gündüz, U. Effect of MDR modulators verapamil and promethazine on gene expression levels of MDR1 and MRP1 in doxorubicin-resistant MCF-7 cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011, 67, 823–828. [CrossRef] [PubMed]

43. Jalali, A.; Ghasemian, S.; Najafzadeh, H.; Galehdari, H.; Seifi, M.R.; Zangene, F.; Dehdardargahi, S. Verapamil and rifampin effect on p-glycoprotein expression in hepatocellular carcinoma. *J. Nat. Pharm. Prod.* 2014, 10, e17741. [CrossRef]

44. Sulová, Z.; Macejová, D.; Seres, M.; Sedlák, J.; Brtko, J.; Breier, A. Combined treatment of P-gp-positive L1210/VCR cells by verapamil and all-trans retinoic acid induces down-regulation of P-glycoprotein expression and transport activity. *Toxicol. In Vitro* 2008, 22, 96–105. [CrossRef] [PubMed]

45. Liu, N.; Li, T.; Reid, W.R.; Yang, T.; Zhang, L. Multiple cytochrome P450 genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PLoS ONE 2011, 6, e23403. [CrossRef] [PubMed]
46. Gong, Y.; Li, T.; Zhang, L.; Gao, X.; Liu, N. Permethrin induction of multiple cytochrome P450 genes in insecticide-resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Biol. Sci. 2013, 9, 863–871. [CrossRef] [PubMed]
47. Doganlar, O.; Doganlar, Z.B. Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in *Drosophila* to treatment with a pesticide mixture. Arch. Biol. Sci. Belgrade 2015, 67, 869–876. [CrossRef]
48. Fang, F.; Wang, W.; Zhang, D.; Lv, Y.; Zhou, D.; Ma, L.; Shen, B.; Sun, Y.; Zhu, C. The cuticle proteins: A putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. Parasitol. Res. 2015, 114, 4421–4429. [CrossRef] [PubMed]





## **ARTICOLO 3**

---

Gene silencing through RNAi and antisense Vivo-Morpholino increases the efficacy of pyrethroids on larvae of *Anopheles stephensi*.



RESEARCH

Open Access

# Gene silencing through RNAi and antisense Vivo-Morpholino increases the efficacy of pyrethroids on larvae of *Anopheles stephensi*

Agata Negri<sup>1,2,5</sup>, Marco Ferrari<sup>2,3</sup>, Riccardo Nodari<sup>2,5</sup>, Edoardo Coppa<sup>2</sup>, Valentina Mastrantonio<sup>1</sup>, Sergio Zanzani<sup>4</sup>, Daniele Porretta<sup>1</sup>, Claudio Bandi<sup>2,5</sup>, Sandra Urbanelli<sup>1</sup> and Sara Epis<sup>2,5\*</sup>

1 Department of Environmental Biology, Sapienza University of Rome, Via dei Sardi 70, 00185 Rome, Italy.

2 Department of Biosciences and Pediatric Clinical Research Center “Romeo ed Enrica Invernizzi”, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.

3 Texas Biomedical Research Institute, San Antonio, 7620 NW Loop 410, San Antonio, TX 78227-5301, USA.

4 Department of Veterinary Medicine-DIMEVET, Università degli Studi di Milano, Via Celoria, 10, 20133 Milan, Italy.

5 Centro Interuniversitario di Ricerca sulla Malaria/Italian Malaria Network, Via del Giochetto, 06126 Perugia, Italy.

\*Correspondence: sara.epis@unimi.it

Received: 4 June 2019

Accepted: 17 August 2019

## Keywords

Insecticide detoxification, ABC-transporter inhibition, mosquito control, siRNA, Vivo-MO.



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## ABSTRACT

**Background:** insecticides are still at the core of insect pest and vector control programs. Several lines of evidence indicate that ABC transporters are involved in detoxification processes against insecticides, including permethrin and other pyrethroids. In particular, the ABCG4 gene, a member of the G subfamily, has consistently been shown to be up-regulated in response to insecticide treatments in the mosquito malaria vector *Anopheles stephensi* (both adults and larvae).

**Methods:** to verify the actual involvement of this transmembrane protein in the detoxification process of permethrin, we performed bioassays on larvae of *An. stephensi*, combining the insecticide with a siRNA, specifically designed for the inhibition of ABCG4 gene expression. Administration to larvae of the same siRNA, labeled with a fluorescent molecule, was effected to investigate the systemic distribution of the inhibitory RNA into the larval bodies. Based on siRNA results, we then effected similar experiments using antisense Vivo-Morpholinos (Vivo-MOs). These molecules, compared to siRNA, are expected to guarantee a higher stability in environmental conditions and in the insect gut, and present thus a higher potential for future in-field applications.

**Results:** bioassays using two different concentrations of siRNA, associated with permethrin, led to an increase of larval mortality, compared with results with permethrin alone. These outcomes confirm that ABCG4 transporter plays a role in the detoxification process against the selected insecticide. Moreover, after fluorescent labeling, we showed the systemic dissemination of siRNA in different body districts of *An. stephensi* larvae, which suggest a potential systemic effect of the molecule. At the same time, results of Vivo-MO experiments were congruent with those obtained using siRNA, thus confirming the potential of ABCG4 inhibition as a strategy to increase permethrin susceptibility in mosquitoes. For the first time, we administered Vivo-MOs in water to larvae, with evidence for a biological effect.

**Conclusions:** in summary, targeting ABCG4 gene for silencing through both techniques resulted in an increased pyrethroid efficacy. These results open the way toward the possibility to exploit ABCG4 inhibition in the context of integrated programmes for the control *An. stephensi* mosquitoes and malaria transmission.

## BACKGROUND

Vector-borne diseases are among the main public health threats in the world. According to the WHO, 216 million cases of malaria and 445000 deaths occurred in 2016 [1]. Although great results in malaria control have been achieved in the past decades, the insurgence of drug resistance in *Plasmodium falciparum*, in particular against artemisinin and other drugs [2-7], and insecticide resistance in mosquito populations [1, 8-11] are threatening the efforts for an effective control of the disease. Insecticides remain the core of all malaria control programs, despite the diffusion of resistant vector mosquitoes, caused by their heavy use. Pyrethroids, and permethrin in particular, are widely used for Internal Residual Spraying (IRS) and for the treatment of bed-nets. As such, it is of pivotal importance to understand the molecular mechanisms of detoxification in mosquitoes, both in sensitive and resistant populations/strains. This knowledge could lead to the development of strategies aimed to restore sensitivity in resistant populations and to avoid the evolution of resistances in sensitive ones [12-17].

Several studies, carried out over the years, have identified a number of genes involved in the detoxification of xenobiotics in mosquitoes, such as Glutathione-S-transferase (GSTs) [18-22], Epsilon glutathione transferase (GSTe) [23], Cytochromes P450 (CYPs) [22], Acetylcholinesterase (AChE1) [24] and ATP Binding Cassette (ABC) transporters [17, 25-29]. Among these, in particular, the ABCG4 transporter, belonging to the G subfamily of ABCs, has consistently been shown to be up-regulated in response to permethrin treatment, suggesting an important role in detoxification against this insecticide in *An. stephensi* larvae [22, 25, 26] and adults [28]. A first aim of this study was thus to verify whether the ABCG4 efflux pump plays a role in permethrin detoxification in *An. stephensi*. To this purpose, we performed assays using siRNAs targeted on the ABCG4 mRNA, to determine whether the inhibition of the expression of this gene increases susceptibility to permethrin.

We emphasize that down-regulation through RNA interference (RNAi) has been achieved for various detoxification genes, inducing an increase of mosquito sensitivity to different classes of insecticides [14, 30-31], but this technique has also been used for identifying new resistance candidate genes [32]. RNAi-based tools have also been tested for their biopesticide potential [33] and as sterility inducer [34]. These results highlight the potential of RNAi as a promising research tool towards the development of novel strategies in



vector control. Thus, RNAi-based tools hold potential for possible field applications as larvicides [35].

As stated by the WHO, the larval source management (LSM) still represents the backbone of integrated mosquito control programs, with a large-scale effectiveness, able to complement measures against adult mosquitoes and limit the residual transmission of malaria [36, 37]. In this backdrop, oligonucleotides for gene expression inhibition, like siRNA for RNAi, gained importance as a potential novel class of ecofriendly larvicides, which can target both insecticide-resistant and -sensible vectors [14, 30, 35]. However, the duration of activity of these molecules and their stability (persistence) in the field, such as the external water environment and the inner organism of the target larvae, has still to be checked [38, 39]. To our knowledge, the “oral delivery” of dsRNA to *Anopheles* mosquito larvae, while demonstrating also a systemic knockdown effect of target genes [30], implies a partial degradation of the RNA oligonucleotides in the insect gut [40] and a decrease in their effect [41].

Another antisense gene knockdown technology is the antisense Morpholino (MO), which is based on the action of uncharged molecules able to induce a complementary-based block mRNA translation into protein without degradation of mRNA [39, 42]. The use of these oligonucleotides has achieved excellent results in applications requiring an extreme specificity in complex systems (e.g. embryo development) [39]. These highly stable synthetic oligonucleotides can be also conjugated with a delivery moiety, allowing cell-penetration and the *in vivo*-uptake. These conjugated molecules, Vivo-Morpholinos (Vivo-MOs), have already been used in cell culture treatment, or in studies *in vivo* through microinjection [43, 44], electroporation and also through oral administration [45], and bath-immersion [46, 47]. A recent study performed on adult of *An. stephensi* underlined the suitability of Vivo-MO oral delivery as an efficient method for gene knockdown in mosquitoes [41]. For this reason, in the present work our second aim was to confirm the potential of Vivo-MO through administration in water to larvae, verifying the biological effects (larval mortality) and the effects on gene expression.

## METHODS

**Mosquito breeding.** Eggs derived from a colony of a susceptible strain of mosquitoes, *An. stephensi* Liston strain, are obtained from the insectarium of the University of Camerino, Italy. In this colony, adult and larvae of mosquitoes are reared with a 12:12 light-dark photoperiod, following standard condition of temperature and humidity: 28±1°C and 85-90% relative humidity, 5% sucrose solution feeding. Eggs are put into well water for hatching and larvae are fed daily with fish food (TetraFish, Melle, Germany), following the same standard conditions of the insectary.

**Specific siRNA design.** Two 25nt Stealth RNAi™ siRNA sequences (5' UCUACACACUGUACUGGCUCAUGUA 3'; 5' UUUAUCACUCAUCCGAUAUGCCAGG 3') were designed using the online software BLOCK-IT™ RNAi Designer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.), with high complementarity to the ABCG4 mRNA available sequence of *An. stephensi* (EMBL accession number: LK392617.1). A scrambled sequence of each siRNA (5' AUAGCCACAGUGUUAUCUCUUCACG 3'; 5' GGAAUACGUGUUACCGCAAUUAGAG 3') without homology to any *An. stephensi* gene has been used as control. Two different siRNAs were administered in order to determine which one was more effective, according to the supplier indications. 5' UCUACACACUGUACUGGCUCAUGUA 3' (and relative scramble) was identified as the most effective (data not shown), thus used for further experiments.

**ABCG4 gene silencing in larvae of mosquitoes using siRNA.** Treatments with siRNA through oral delivery were performed on the third instar larvae. Groups of 50 third instar larvae were soaked in a volume of 357 µl siRNA, or scrambled siRNA, at two different concentrations (0.03 µg/µl and 0.06 µg/µl) in RNase-free water, to prevent siRNA degradation. The lowest concentration was selected because previously used by Figueira-Mansur and colleagues (2013) [14] on *Aedes aegypti* larvae. Additional groups of 50 larvae were treated only with RNase-free water as a control. This step was performed for three hours, and fish food (TetraFish, Melle, Germany) was administered to all groups. The three hour exposure time was determined in a preliminary experiment, soaking *An. stephensi* third instar larvae in 0.5% bromophenol blue according to the protocol described in [31]. At the end of the treatment, each group of larvae was gently transferred in 100 ml of well water and an LD<sub>50</sub> dose of permethrin (0.072 mg/l) has been added to all groups, except the two control groups [48]. Before the administration, the powdered insecticide

was dissolved in acetone and then diluted in water to obtain the test solutions; the LD<sub>50</sub> and the sub-lethal dose of permethrin (i.e. the dose at which no dead larvae were observed) were determined using different concentrations, as reported in Epis et al., 2014a [25]. All the experiments were performed three times.

**Gene expression analysis in larvae treated with siRNA.** After six and 24 hours of permethrin exposure, pools of 5 surviving individuals (able to move through the water column) were put in extraction buffer+ $\beta$ -mercaptoethanol for immediate RNA extraction using the commercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with an additional on-column DNase I treatment (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). cDNAs were synthesized starting from 200 ng of total RNA, using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with random hexamers. cDNA was used as template in RT-qPCR reaction, using ABCG4 primers, already published in previous works [25, 26]. Two endogenous reference genes for *An. stephensi* were used to obtain a normalization of data: *rps7* [49] and GAPDH [50] (Tab. 1). Gene relative expression was determined using a BioRad iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, California, USA). The analysis was carried out in accordance with the following conditions: 50 ng cDNA; 300 nM of forward and reverse primers; 98°C for 30", 40 cycles of 98°C for 15", 59°C for 30", 72°C for 30"; fluorescence acquisition at the end of each cycle; melting curve analysis after the last cycle. Cq values were determined for each gene, in order to calculate gene expression levels of target gene using *rps7* and GAPDH as internal reference genes. The expression level of ABCG4 in the control group was considered as basal level, in order to evaluate the effect of permethrin induction and RNAi effect. The estimates of the expression level of ABCG4 in the siRNA-treated and scramble-treated larvae are reported as means between different pools  $\pm$  standard deviation (SD).

**Table 1:** Primer sequences of ABC transporters and housekeeping genes of *An. stephensi*.

| Gene              | Forward primer        | Reverse primer         | bp  | Source |
|-------------------|-----------------------|------------------------|-----|--------|
| <i>Anst</i> ABCG4 | ATGAGCCCATTCGTCCTG    | AGCGTGGAGAAGAAGCAG     | 158 | [25]   |
| <i>rps7</i>       | AGCAGCAGCAGCACTTGATTG | TAAACGGCTTTCTGCGTCACCC | 90  | [49]   |
| GAPDH             | GCCGTCGGCAAGGTCATCCC  | TTCATCGGTCCGTTGGCGGC   | 166 | [50]   |

**Mortality bioassay on larvae treated with ABCG4 siRNA.** In order to estimate the mortality of larvae, induced by the combined treatment of permethrin and siRNA, we performed specific bioassay. Briefly, groups of 25 larvae were soaked in 178  $\mu$ l of siRNA or scrambled siRNA at a concentration of 0.03  $\mu$ g/ $\mu$ l and 0.06  $\mu$ g/ $\mu$ l in RNase free water. Groups of larvae were treated with siRNA or scramble siRNA, while additional groups were treated only with water. After three hours of treatment each group was gently transferred into 100 ml of well water plus an LD<sub>50</sub> of permethrin (0.072 mg/l), previously determinate with other bioassays with different insecticide concentration. Groups of 25 larvae soaked in just water were used as control. Mortality was assessed after six hours and 24 hours of permethrin exposure and larvae were considered dead if static, even after a mechanical stimulus [48].

**Systemic dissemination of siRNA.** To verify if the ABCG4 siRNA was able to be absorbed into the larva (in particular into the midgut) we soaked third instar larvae for three hours in the higher concentration (0.06  $\mu$ g/ $\mu$ l) of the same ABCG4 siRNA, conjugated with Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). The diffusion of the fluorescent signal was analyzed by Zeiss Axio Zoom.V16 stereo microscope after three hours and 24 hours of siRNA exposure.

**Specific Vivo-Morpholino design.** An ABCG4 Vivo-Morpholino (*Anst*MO\_ABCG4; GeneTools LLC, Philomath, OR, USA) was designed using the Tool of GeneTools LLC company and it was comprised of a Morpholino conjugated to a transporter structure/delivery moiety, comprised of an octa-guanidine dendrimer, that improves uptake of the oligonucleotides by cells in tissues [51]. The sequence (5' ATGCTCTAGCTTCTCGCACACCAAA 3') of the Vivo-Morpholino *Anst*MO\_ABCG4 was

designed with high complementarity to the ABCG4 mRNA sequence of *An. stephensi* (accession number LK392617.1) following the suggestion of the manufacturers. As for the siRNA, the Vivo-Morpholino AnstMO\_ABCG4 was administered at the third instar larvae [48] in nuclease free water.

***ABCG4 gene silencing in larvae of mosquitoes using Morpholino.*** This is the first study where the Vivo-Morpholino oligonucleotides has been used against mosquito larvae; for this reason, the experimental procedure for oral administration through bath immersion were performed following the protocol previously reported for siRNA experiments. About the concentrations, we tested different doses of AnstMO\_ABCG4 (0.051 µg/µl; 0.101 µg/µl; 0.203 µg/µl; 0.406 µg/µl), in order to evaluate the necessary concentration to obtain the downregulation effect in larvae, through oral feeding. This pre-test (results not shown) led to the definition of two efficient concentrations, 0.203 µg/µl; 0.406 µg/µl. Following the previous protocol, groups of 50 third instar larvae were soaked for three hours in a volume of 357 µl of RNase-free water plus AnstMO\_ABCG4 at 0.203 µg/µl or 0.406 µg/µl. Control groups were treated only with RNase-free water. Thereafter, each group of larvae was treated, for six and 24 hours, with the LD<sub>20</sub> dose (0.030 mg/l) of permethrin in 100 ml of well water. The experiment was performed in three times.

***Gene expression analysis in larvae treated with Morpholino.*** Pools of five surviving larvae were collected at six and 24 hours and soaked in extraction buffer+β-mercaptoethanol for RNA extraction. The analyses of gene expression were carried out following the previously described procedure.

***Mortality bioassay on larvae treated with Morpholino.*** Mortality bioassay was performed to evaluate the phenotypic effect on larvae treated with the combination of permethrin and Vivo-Morpholino. The same protocol described for the siRNA-bioassays was applied using the AnstMO\_ABCG4 at two concentrations, 0.203 µg/µl and 0.406 µg/µl.

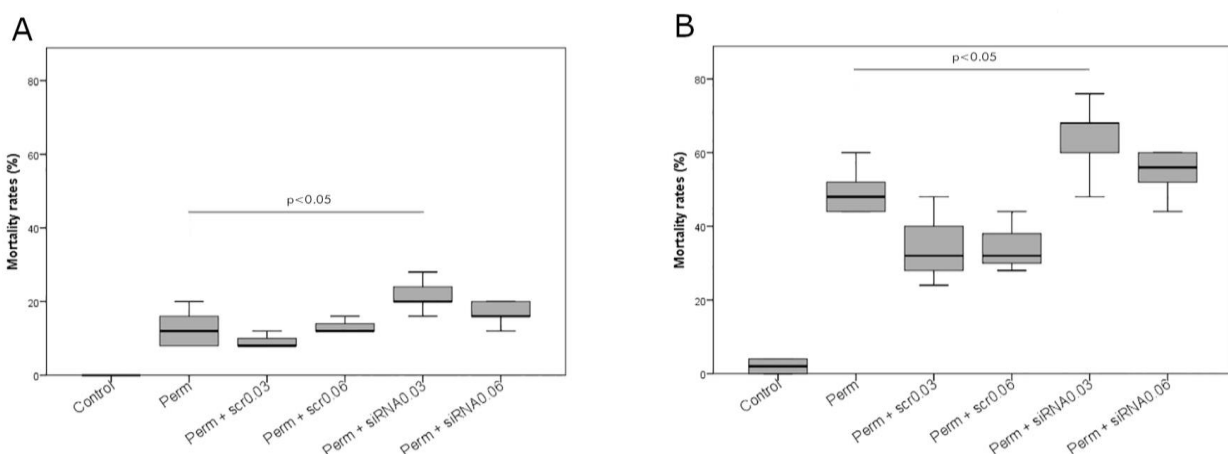
***Statistical analysis.*** In the bioassays (after six and 24 hours) effects of previously described treatments on mosquitoes' mortality and ABCG4 gene expression levels were compared by a one-way ANOVA; when analysis of variance resulted statistically significant ( $p < 0.05$ ), *Post Hoc* comparisons were performed by Least Significance Difference (LSD).

All analyses were implemented using the SPSS software (version 20.0; SPSS, Chicago, Illinois).

## RESULTS

### *Bioassays on larvae after siRNA treatment*

After determination of the LD<sub>50</sub> of permethrin (0.072 mg/l at 24 hours), the mortality of larvae was assessed at six and 24 hours. Using the LD<sub>50</sub> concentration, permethrin treatment induced a 12.8±5.21% (means±SD) mortality after six hours; when administered following the 0.03- or 0.06-µg/µl siRNA treatments, a 21.6±4.6% or 20±9.38% mortality was observed, respectively. A similar pattern was observed after 24 hours, where permethrin alone led to a 45.6±13.45% mortality, increased to 64±10.58% and 58.4±13.45% by siRNA pre-treatments (at the 0.03- and 0.06- µg/µl concentrations). The differences between the treatment with permethrin alone and those added with the lowest concentration of siRNA were statistically significant at both time points (LSD test p=0.027 after 6h p=0.024 after 24h). Moreover, at 24 hours the difference in the efficacy of the scrambled siRNA compared with the gene specific siRNA was also statistical significance (LSD test p=0.003 in comparison to 0.03µg/µl siRNA; p=0.013 in comparison to 0.06 µg/µl and siRNA) even, at both concentrations (Fig. 1).

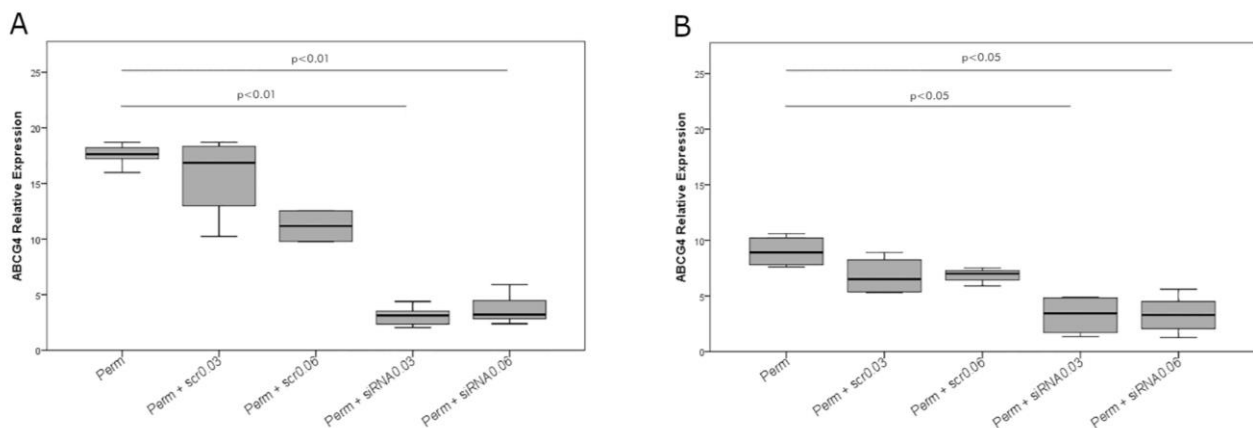


**Fig. 1:** Larval mortality rates in siRNA bioassays. Mortality obtained after 6 h (a) and 24 h (b) of LD<sub>50</sub> permethrin exposure in silenced and non-silenced larvae of *An. stephensi*, through two different concentrations of siRNA (0.03 µg/µl and 0.06 µg/µl). Data were compiled from three time replicate experiments and assessed by one-way ANOVA with *Post-Hoc* LSD test as multiple comparison test. p < 0.05 in comparison to permethrin treated larvae; error bars denote standard deviation of the means (SD)

No statistical differences were observed between the permethrin alone treatment and those with the two doses of scrambled siRNAs (0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and 0.06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (respectively  $p=0.422$  and  $p=0.901$  after 6h; both  $p=0.219$  after 24h) (Fig. 1).

### ABCG4 relative expression in larvae after siRNA treatment

The relative expression of ABCG4 transporter was assessed through qRT-PCR on larvae exposed to the  $\text{LD}_{50}$  of permethrin, alone or in combination with siRNAs and scrambled siRNAs. After six hours, permethrin induced an up-regulation of ABCG4 of  $17.56\pm 1.04$  fold, while pretreatment with siRNA, at the two concentrations, led to an up-regulation of only  $3.08\pm 0.94$  and  $3.76\pm 1.34$  respectively, when compared with control. In other words, a “downregulation”, compared to the insecticide alone, of 15- or 13-folds respectively, for the 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and for 0.06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  siRNA pre-treatments, have been observed. *Post Hoc* LSD test showed that permethrin treated larvae did not significantly differ in ABCG4 expression compared with those treated with scramble siRNA ( $15.67\pm 3.83$  and  $11.17\pm 1.94$  fold), while a significant difference was observed with the two siRNA concentrations ( $p=0.005$  for the higher and  $p=0.008$  for the lower concentration). Whereas the two concentrations of siRNA did not show a statistically significant difference between them (Fig. 2A).



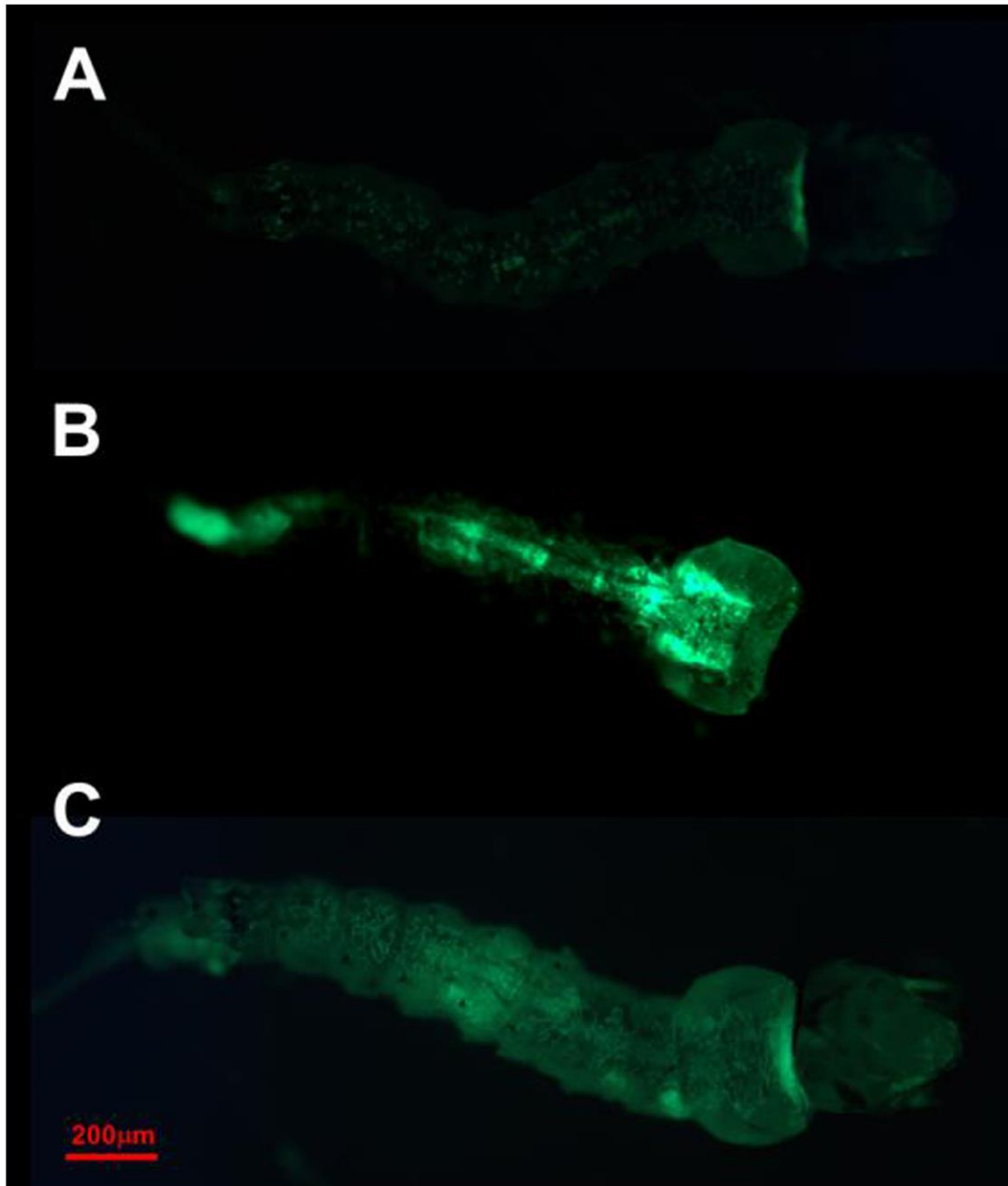
**Fig. 2:** ABCG4 relative expression after siRNA and permethrin treatments. ABCG4 induction after 6 h (a) and 24 h (b) of  $\text{LD}_{50}$  permethrin exposure in silenced and non-silenced larvae of *An. stephensi*, through two different concentrations of siRNA (0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and 0.06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Data were compiled from three time replicate experiments and assessed by one-way ANOVA with *Post-Hoc* LSD test, as multiple comparison test.  $p < 0.01$  in comparison to permethrin treated larvae (a);  $p < 0.05$  in comparison to permethrin treated larvae (b); error bars denote standard deviation of the means (SD).

After 24 hours, the insecticide induced an up-regulation of  $9.01 \pm 1.43$ -fold in permethrin-treated larvae compared to the controls. Permethrin in combination with the two siRNA concentrations led to a reduced up-regulation, of  $3.27 \pm 1.83$  and  $3.34 \pm 1.76$  -fold respectively for the lower and higher concentrations, compared to control. In other words, pre-treatments with siRNA in addition to the insecticide showed a down-regulation of 5.74- and 5.67- fold for the lower and higher concentrations, when compared with insecticide-alone treatment (Fig. 2B). The *Post Hoc* LSD test highlighted no significant differences between ABCG4 expression in permethrin-treated larvae compared to those treated with scramble siRNA (which showed a  $6.81 \pm 1.75$  and  $6.86 \pm 0.68$  -fold expressions relative to control). On the other hand, a significant difference was detectable with the two siRNA concentrations, also at the 24 hour time point ( $p=0.028$  and  $p=0.035$  respectively for the lower and higher concentrations). No statistically significant difference was detected between the two concentrations of siRNA.

### **Systemic siRNA diffusion in *An. stephensi* larvae**

Third instar larvae were exposed to the  $0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  concentration of the fluorescent siRNA (Alexa Fluor 488) for three hours to allow them to up-take the molecule. Figure 3 shows that, after three hours of exposure, fluorescence is localized mainly in the gut, in the central part of the larval body (Fig. 3, panel B), coherently with the assumption that siRNA molecule is acquired by the larvae through the oral route. The fluorescence emission is much more evident in the treated larvae compared to the controls (Fig. 3, panel A), in which the emission can be interpreted as auto-fluorescence. After the three hours of exposure, larvae were moved into fresh water for 24 hours and then analyzed. In this case the fluorescent signal is detectable in all the tissues of the specimens (Fig. 3, panel C).

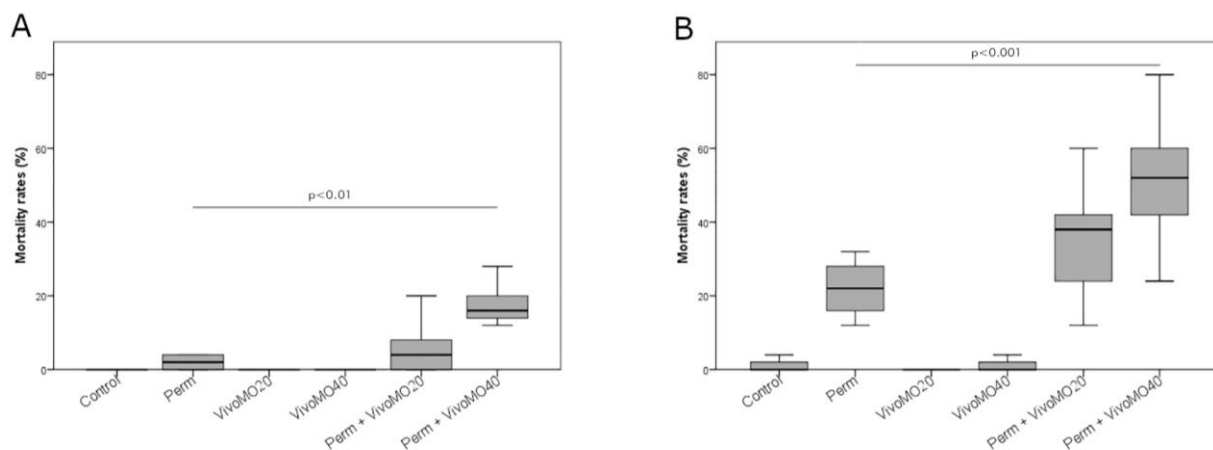




**Fig. 3:** Fluorescence emission in siRNA (Alexa Fluor 488) bioassays. Third instar larvae of *An. stephensi* exposed to a 0.06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  concentration of a fluorescent siRNA. a) Control larva with slight autofluorescence. b) Larva after 3 h of exposure to the siRNA; the fluorescence is concentrated at the gut level. c) Larva exposed for 3 h to the siRNA and transferred for 24 h in water. The signal is diffused to the whole body

### Bioassays on larvae after Vivo-MO treatment

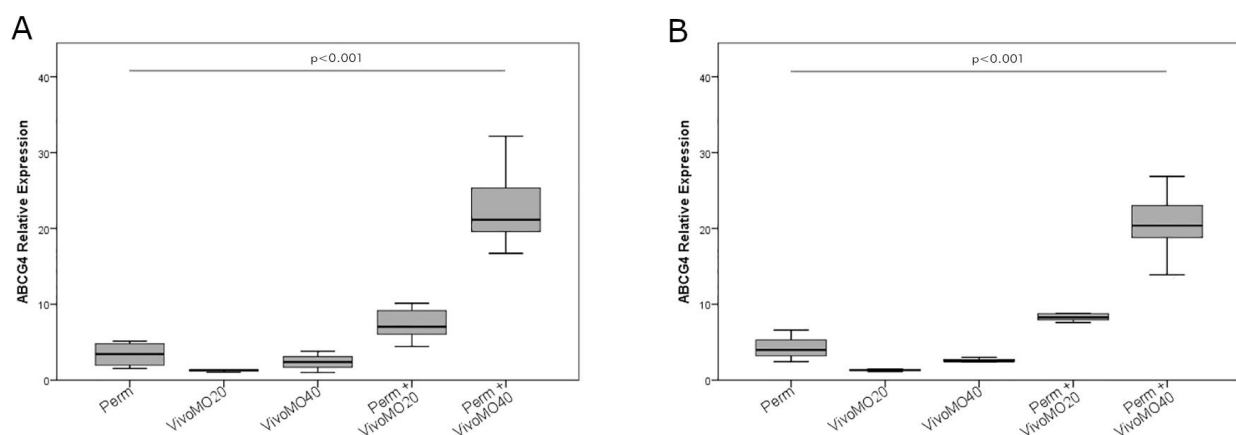
Figure 4 shows the results of the in Vivo-MO bioassays, that were effected with a sub-lethal dose of permethrin (LD<sub>20</sub>). In groups of larvae treated with Vivo-MO alone, the oligonucleotides, at the two concentrations, did not affect the larval survival: at both time points and at both concentrations mortality was equal to that of the controls (0% at six hours and 1.33± 2.3% at 24 hours). In contrast, treatment with Vivo-MO combined with permethrin led to an increase in larval susceptibility, with a dose-dependent effect that raise over time. At six hours (Fig. 4A), larval mortality with permethrin alone was only 2±2.3% (means±SD); after exposure to the two concentrations of VivoMO, 0.203 µg/µl, and 0.406 µg/µl, permethrin-determined mortality increased up to 6.67±7.88% and 18.33±6.26%. At 24 hours (Fig. 4B), a fortiori, the 22±8.33% mortality, determined by the sub-lethal treatment with insecticide alone, increased up to 34.67±13.89% with the lowest dose of VivoMO, and reached the 51.67±15.95% with the highest dose. Therefore, at 24 hours, an increase in the mortality rate of 13% was achieved with 0.203 µg/µl of Vivo-MO, and an increase of 30% with 0.406 µg/µl of Vivo-MO. The *Post Hoc* LSD test showed a statistically significant difference (p=0.0032 after 6 hours; p=0.0006 after 24 hours) between the permethrin treatment alone and the one with the highest dose of Vivo-MO at both time points.



**Fig. 4:** Larval mortality (%) in Vivo-MO bioassays. After 6 h (a) and 24 h (b) of LD<sub>20</sub> permethrin exposure in silenced and non-silenced larvae of *An. stephensi*, through two different concentrations of Vivo-MO (20 µM = 0.203 µg/µl and 40 µM = 0.406 µg/µl). Data were compiled from three time replicate experiments and assessed by one-way ANOVA with *Post-Hoc* LSD test, as multiple comparison test; p < 0.01 and p < 0.001 in comparison to permethrin treated larvae; error bars denote standard deviation of the means (SD)

### **ABCG4 relative expression analysis in larvae after Vivo-MO treatments**

Gene expression analysis was performed through qRT-PCR on groups of larvae, after six and 24 hours of treatment with or without Vivo-MO, followed by the treatment with LD<sub>20</sub> dose of permethrin (except for Vivo-MO alone treatment) (Fig. 5). Considering the mechanism of action of Morpholinos, the molecule binds/inhibits a specific target mRNA sequence, without degrading it, and so it could even induce an ABCG4 upregulation, being a xenobiotic compound, instead of a downregulation. At six hours the relative expression of ABCG4, compared to the control, showed a lower value for larvae treated with permethrin alone, of  $3.38 \pm 1.7$ , than larvae treated with the combination of insecticide plus Vivo-MO at  $0.203 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  and  $0.406 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , with values of  $7.38 \pm 2.04$  and  $23.97 \pm 6.81$  respectively. The target gene after inhibition with MO oligonucleotides, in fact, was up-regulated 4.00 fold more than permethrin alone, by the lowest concentration of oligonucleotides, and 20.59 fold by the highest concentration. On the contrary, the ABCG4 expression in the treatments with Vivo-MO alone (of  $1.25 \pm 0.17$  fold with  $0.203 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  and  $2.40 \pm 1.40$  fold with  $0.406 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) is lower than those of treatment with inhibitor plus insecticide, and that of treatment with permethrin alone. Using the *Post Hoc* LSD test it was possible to detect the differences in relative expression for all treatments. A statistically significant difference was observed between the expression induced by  $0.406 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Vivo-MO ( $p=0.0006$ ) and that of all other treatments, including the permethrin-alone treatment and the  $0.203 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Vivo-MO treatment.



**Fig. 5:** ABCG4 relative expression after Vivo-MO and permethrin treatments. ABCG4 induction after 6 h (a) and 24 h (b) of LD<sub>20</sub> permethrin exposure in silenced and non-silenced larvae of *An. stephensi*, through two different concentrations of Vivo-MO ( $20 \mu\text{M} = 0.203 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  and  $40 \mu\text{M} = 0.406 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Data were compiled from three time replicate experiments and assessed by one-way ANOVA with *Post-Hoc* LSD test, as multiple comparison test.  $p < 0.001$  in comparison to permethrin treated larvae; error bars denote standard deviation of the means (SD)

The expression levels didn't face evident changes from six to 24 hours: at 24 hours the higher dose of Vivo-MO caused a slight decrease of ABCG4 expression (not statistically significant), perhaps due to the weakening of cellular defenses over time. Relative expression of permethrin was of  $4.25 \pm 1.72$  fold, compared to permethrin in combination with Vivo-MO at lowest concentration, ( $9.07 \pm 2.26$ ) and at the highest concentration ( $19.04 \pm 8.43$ ). This highlights an up-regulation of 4.82 and 14.79 respectively, when compared with insecticide alone treatment. The multiple comparisons analysis showed that permethrin treatment did not differ from those with Vivo-MO alone ( $p=0.355$  with the low concentration;  $p=0.609$  with the high concentration), while a significant difference was obtained with the combination of insecticide plus the higher concentrations of Vivo-MO (LSD tests ( $p=0.0007$ )).

## DISCUSSION

As for our results about the RNAi, the expression analysis on the whole larval body are consistent with the data from our previous studies, showing that the peak of ABCG4 over-expression occurs after six hours of exposure to permethrin [26]. We choose this transporter as a target for silencing because it demonstrated a strong up-regulation among the ABC transporters in *An. stephensi* in response to permethrin treatment, suggesting its involvement in the detoxification against this insecticide [22, 25, 26]. RNAi-based assays were thus performed to confirm this hypothesis, thus to assess whether the inhibition of ABCG4 has an effect on mosquito mortality, using two siRNA concentrations. At both concentrations, at  $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  and  $0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , siRNAs were able to induce an increased mortality at the two examined time-points (Fig. 1). This increase is correlated with the RNAi efficacy in down-regulating the expression of ABCG4 at both time points at both concentrations (Fig. 2). In our study, we were able to achieve a detectable down-regulation using both the  $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  and the  $0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  doses. In particular, after 24 hours a down-regulation of around 5.74-fold, compared with insecticide-alone treatment, was achieved with the lower concentration; this downregulation in gene expression was associated with an almost 20% mortality increase. Our results are consistent with studies where RNAi targeted on efflux pumps and G-protein-coupled receptor of insecticide resistant larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* induced an increased toxicity, respectively, of temephos and permethrin [14, 52, 53]. These results, and those of our current study, are also coherent with another work on the diamondback moth *Plutella xylostella*, where the

silencing of another ABC transporter, ABCH1 (structurally similar to ABCG sub-family members), led to larval and pupal lethal phenotypes when exposed to the Cry toxin of *Bacillus thuringiensis* [54]. By comparing the results obtained at the two times and at the two concentrations, the increase in larval mortality was not correlated with the dose of siRNA used or with the duration of insecticide exposure (Fig. 2). It is thus possible that at six hours of exposure, with the 0.03 µg/µl siRNA dosage, a plateau effect is achieved.

With the prospect of applying gene silencing tools in the field, for the control of mosquito larvae, an important issue to be addressed is the method of delivery of interfering/downregulating molecules. Our results using siRNA show that the administration in water, and thus the acquisition of the molecule via oral feeding, work successfully on *An. stephensi* larvae, as previously shown for other mosquito species [31] as well as for insect species belonging to different orders [55]. Despite this, the possible factors that could affect the downregulation and, therefore, the achievement of a high level of larval mortality, remain to be clarified. The efficiency of RNAi is highly variable in insect species and in different conditions: the critical factors that determine the ability of the target organism to uptake the oligonucleotides, its spread to tissues and cells, the activation of an autonomous RNAi machinery for mRNA degradation should specifically be investigated in the different species [56]. Moreover, the critical factors related to the molecule, e.g. its stability and integrity in the environment and in the larval gut lumen, needed to guarantee the cellular delivery of a sufficient amount of intact siRNA, have not yet been investigated in detail [40]. For example, about host-related factors, recent studies suggested that Diptera lack the transmembrane channel-mediated uptake mechanism, formed by the RNA channel transporters SID-1 and SID-2, that are involved in siRNA uptake in the gut lumen of other insects [55, 57-60]. Despite this, our results with fluorescent siRNA demonstrate that this type of molecule actually diffuses into the larval mosquito body, possibly through an endocytosis-mediated mechanism, as suggested in other studies on larvae of *Ae. aegypti* and *An. gambiae*, that demonstrated the spread of the RNAi effects, after oral administration, to tissues outside the gut [30, 31]. Anyway, the clear downregulation of ABCG4 expression in response to siRNA, observed at both six and 24 hours of permethrin treatment (for both concentrations used), indicates that the molecule actually reaches mosquito cells, activating the degradation of target mRNA also in *An. stephensi* larvae.

Evidence for a systemic RNAi in dipterans has already been obtained in other studies which indicated an efficient internalization and biodistribution of dsRNA in *An. gambiae* cultured cells [61], and a strong RNAi effect throughout the development of mosquitoes in *Ae. aegypti* larvae, after feeding [34]. Aspects that are still to be clarified regarding the actual amount of siRNA that reaches larval tissues, after the administration through the breeding water, with the various possible “challenges”, such as pH of the water and gut lumen, and the potentially variable conditions of the gut lumen of larvae in field conditions [40]. The exposure of oligonucleotides to these challenges, as noted in different reports [31, 62], implies that oral feeding-based delivery of interfering RNA molecules determines a less effective knockdown compared to microinjection-based administration. On the other hand, oral administration of siRNA is less time-consuming than microinjection, and more suitable for high-throughput screenings. In addition, it is likely the sole possible way of delivery for field applications for mosquito control.

Recently, to achieve the oral administration of RNAi-inducing molecules to be tested as biopesticides, different approaches have been developed with the aim of delivering intact dsRNAs/siRNAs into cells [63]. The study of abiotic and biotic transport methods was designed to prevent the degradation of RNA molecules, more frequently in the field settings than in lab conditions [64, 65]. Liposomes were tested as abiotic carriers [66, 67], as well as hydrogel- [61], carbon quantum dot- [68] and chitosan-nanoparticles [35, 69]; the last ones, for example, are currently considered as the most economical and environmentally safe system for the delivery of dsRNAs to insect larvae [64, 70]. On the other side, the alternative biotic delivery was achieved through the *Escherichia coli* and the *Pichia pastoris* expression systems, for a cheaper large-scale administration of RNAi inducing molecules to third instar larvae of mosquitoes [71, 72].

Among the antisense gene knockdown technologies, antisense Morpholinos (MOs) present characteristics that should guarantee key advantages for future field applications. They can ensure highly specific antisense activity, and are able to bind the target RNA sequence having less interaction with unintended mRNAs, compared with knocking-down RNAi methods based on protein/catalytic activity (e.g. siRNA). Their stability is due to their molecular structure, and to the covalently linked delivery moiety, that make them more durable in water, and more easily internalized by intestinal cells [42]. Moreover, their lack of electrostatic charge (neutral charge) minimizes the interaction with proteins, hence implying a reduced toxicity and immunogenicity; at the same time, being chemically

different from a “normal” DNA or RNA molecules, they are resistant to nucleases, which implies a higher stability [39, 42].

Our results showed an increased susceptibility to permethrin after Vivo-MO treatment, congruent with the results obtained using siRNA; the role of the ABCG4 transporter in permethrin detoxification in *An. stephensi* is thus further supported. The addition of Vivo-MO to the LD<sub>20</sub> dose of permethrin led to a significant increase of larval susceptibility, until reaching a 50% mortality at the second time point. In particular, after 24 hours, the 0.406 µg/µl Vivo-MO dose determined an increase in larval mortality of 30% compared to permethrin alone, while the 0.203 µg/µl dose, at the same time, determined an increase in mortality of 13% (Fig. 4B). The reached effect appears dose- and time-dependent, with mortality of the two increasing doses shifting from 10 to 23% at six hours and from 35 to 52% at 24 hours. As shown by our results, administration of Vivo-MO in absence of permethrin did not cause any detectable/significant effect in term of mortality and ABCG4 gene expression. We would thus conclude that the molecule is non toxic if administered alone: its effects were detrimental to mosquito larvae when administered with permethrin. This feature has primary importance to avoid negative effects on non-target organisms: specifically-designed Vivo-MO should have no effects on non-target species.

As for the relative expression of ABCG4 gene (Fig. 5A-B), Vivo-MOs act differently from siRNAs, making mRNA unavailable for translation, but without degrading it: mRNA molecules, bounded and inhibited by the oligonucleotides, likely accumulate inside the cell without being used [38]. We actually observed that ABCG4 mRNA amount increased after combined permethrin-Vivo-MO treatment (Fig. 4A-B), while siRNA-permethrin treatment lead to a reduction in ABCG4 mRNA content in the larvae (Fig. 2A-B). We thus suggest that, after the permethrin + Vivo-MO treatment, the larval organism is increasingly stimulated to produce ABCG4 transporter to expel the insecticide, but the mRNA overproduced has no effect, as we have seen from the mortality results (Fig. 3A, B): the more Vivo-MO molecules bind the target mRNA, making it inactive, the greater the production of mRNA. The expression of ABCG4 gene, as we can see from the comparison between the two time points, with the two concentrations of Vivo-MO, is stable (expression at six and 24 hours is not different), but is dose-dependent, i.e. with the higher dose of Vivo-MO the amount of mRNA detected is higher. It is thus possible that the administration of a higher dose of Vivo-MO in the presence of the same dose of permethrin would lead to an increased larval



susceptibility to permethrin. However, we should also consider the possibility that inhibition of ABCG4 could lead to the activation of other defensome genes responsible for detoxification processes and cellular defence, an issue worth of further investigations [17, 22]. Due to the lack of *ad-hoc* antibody against the ABCG4 of mosquitoes (or other insects), quantification of its expression at the protein level is challenging. Therefore, our goal was to determine the effect of this nucleotide on larval mortality (a sort of phenotypic effect). In future studies, it would also be interesting to design a scramble Vivo-MO control, not complementary to the target gene, in order to assess whether the phenotypic effect is really due to the lack of the transporter or to any other phenomena. For example, in previous studies, it has been shown that permethrin can strongly interact with nucleic acids, intercalating DNA bases (it is prone to bind to G-C base pairs) [73]. One might thus suggest that the effects that we recorded could have partially been determined by this, or similar, effects of Vivo-MOs.

In the wild, mosquito larvae are exposed to the residues of insecticides used in agriculture or in the control of adults, where these residues flow to the breeding sites [7]. These low amounts of insecticides, creating a toxic stress, could induce tolerance by the upregulation of genes involved in the xenobiotic metabolism/detoxification of chemicals [74, 75]. Notably, this low dose insecticide exposition is regarded as one of the major causes for the onset of resistant forms in mosquitoes [76, 77]. Considering the above phenomenon, we decided to perform Vivo-MO assays using a low permethrin dosage ( $LD_{20}$ ), which might represent a condition present in breeding sites in treated areas.

Since prior to this study no bioassays had been carried out with Vivo-MO on mosquito larvae, the doses and the timing of administration applied in this study represent a first methodological reference for antisense MO application through direct feeding in mosquito larval stages. It will certainly be interesting to verify in the future if a higher dose of the molecule could lead to a further increase in the susceptibility to permethrin. The possibility to prolong the knocking-down with sequential Vivo-MO treatments against the same ABC transporter should be tested, as well as a multiple knockdown targeting different detoxification genes, in order to avoid that the MO effect declines over time, or to block compensatory effects [41].



## Conclusion

In this study, we determined the effects, on larvae of *An. stephensi*, of two different types of mRNA-targeting oligonucleotides, designed to inhibit the expression of the defensome gene ABCG4, and administered through oral delivery in water. Our results shown that, targeting ABCG4 gene for silencing through both techniques resulted in an increased pyrethroid efficacy. In conclusion, in our opinion, these results open the way toward the possibility to exploit the inhibition of this gene in the context of integrated programmes for the control of *An. stephensi* mosquitoes and thus malaria transmission. Of course, prior to filed application, several issues should be addressed. First, the potential effects on non-target organisms, starting with in silico studies on the specificity of siRNA or Vivo-MO oligonucleotides, but also addressing their potential “side effects” not related with mRNA targeting. Secondly, the stability and methods of delivery of these molecules in filed conditions. Finally, field application would obviously require a cost-effective method for production of the oligonucleotides.

## REFERENCES

1. World Health Organization. (2018). World malaria report 2018. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/275867>.
2. Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJC, Bozdech Z, Carrara VI, Sriprawat K, Nair S, White MM, Dziekan J, Ling C, Proux S, Konghahong K, Jeeyapant A, Woodrow CJ, Imwong M, McGready R, Lwin KM, Day NPJ, White NJ, Nosten F. Declining efficacy of artemisinin combination therapy against *P. falciparum* malaria on the thai-myanmar border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors. Clin Infect Dis. 2016;63(6):784-791. doi: 10.1093/cid/ciw388.
3. Fairhurst RM, Dondorp AM. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Microbiol Spectr. 2016; 4(3) doi: 10.1128/microbiolspec.E110-0013-2016.
4. Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, Ralph SA, Fidock DA. Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol. 2016; 32(9):682-696. doi: 10.1016/j.pt.2016.05.010.
5. Oужи M, Augereau JM, Paloque L, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. Parasite. 2018;25:24. doi:10.1051/parasite/2018021.
6. Nair S, Li X, Arya GA, McDew-White M, Ferrari M, Nosten F, Anderson TJC. Fitness costs and the rapid spread of kelch13-c580y substitutions conferring artemisinin resistance. Antimicrob agents chemother. 2018;62(9). doi: 10.1128/AAC.00605-18.
7. World Health Organization. (2016). World malaria report 2016. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/252038>.
8. Karunamoorthi K. Vector control: a cornerstone in the malaria elimination campaign. Clin Microbiol Infect. 2011;17(11):1608-16. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03664.x.
9. Tikar SN, Mendki MJ, Sharma AK, Sukumaran D, Veer V, Prakash S, Parashar BD. Resistance status of the malaria vector mosquitoes, *Anopheles stephensi* and *Anopheles subpictus* towards adulticides and larvicides in arid and semi-arid areas of India. J Insect Sci. 2011;11:85. doi: 10.1673/031.011.8501.
10. Alonso PL, Tanner M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. Nat Med. 2013;19(2):150-5. doi: 10.1038/nm.3077.

11. Alout H, Labbé P, Chandre F, Cohuet A. Malaria vector control still matters despite insecticide resistance. *Trends Parasitol.* 2017;33(8):610-618. doi: 10.1016/j.pt.2017.04.006.
12. Buss DS, Callaghan A. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2008;90, 141–153. doi: 10.1016/j.pestbp.2007.12.001.
13. Porretta D, Gargani M, Bellini R, Medici A, Punelli F, Urbanelli S. Defence mechanism against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med Vet Entomol.* 2008;22(1):48-54. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00712.x.
14. Figueira-Mansur J, Ferreira-Pereira A, Mansur JF, Franco TA, Alvarenga ES, Sorgine MH, Neves BC, Melo AC, Leal WS, Masuda H, Moreira MF. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Mol Biol.* 2013;22(6):648-58. doi: 10.1111/imb.12052.
15. Lima EP, Goulart MOF, Rolim-Neto ML. Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporter as a defence mechanism against temephos in populations of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014;109, 964–966. doi: 10.1590/0074-0276140164.
16. Dalla Bona AC, Fajta Chitolina R, Lopes Fermine M, deCastro Poncio L, Weiss A, Pereira Lima JB, Paldi N, Soares Bernardes E, Henen J, Maori E. Larval application of sodium channel homologous dsRNA restores pyrethroid insecticide susceptibility in a resistant adult mosquito population. *Parasit Vectors.* 2016;9:397. doi: 10.1186/s13071-016-1634-y.
17. Pignatelli P, Ingham VA, Balabanidou V, Vontas J, Lycett G, Ranson H. The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Mol Biol.* 2018;27(1):110-122. doi: 10.1111/imb.12351.
18. Grant DF, Hammock BD. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol Gen Genet.* 1992;234(2):169-76.

19. Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.* 2001;359(Pt 2):295-304. doi: 10.1042/0264-6021:3590295.
20. Tikar SN, Kumar A, Prasad GB, Prakash S. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol Res.* 2009;105(1):57-63. doi: 10.1007/s00436-009-1362-8.
21. David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:4080- 4084. doi: 10.1073/pnas.0409348102.
22. De Marco L, Sassera D, Epis S, Mastrantonio V, Ferrari M, Ricci I, Comandatore F, Bandi C, Porretta D, Urbanelli S. The choreography of the chemical defensible response to insecticide stress: insights into the *Anopheles stephensi* transcriptome using RNA-Seq. *Sci Rep.* 2017;7:41312. doi: 10.1038/srep41312.
23. Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara LA, Somboon P, Lycett G, Ranson H. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011;41:203-209. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.12.005.
24. Weill M., Berthomieu A., Berticat C., Lutfalla G., Nègre V., Pasteur N., Philips A., Leonetti J.P., Fort P., Raymond M. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol.* 2004;14(14):R552-R553. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.008
25. Epis S, Porretta D, Mastrantonio V, Comandatore F, Sassera D, Rossi P, Cafarchia C, Otranto D, Favia G, Genchi C, Bandi C, Urbanelli S. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasit Vectors.* 2014a;7:349. doi: 10.1186/1756-3305-7-349.
26. Epis S, Porretta D, Mastrantonio V, Urbanelli S, Sassera D, De Marco L, Mereghetti V, Montagna M, Ricci I, Favia G, Bandi C. Temporal dynamics of the ABC transporter response to insecticide treatment: insights from the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Sci Rep.* 2014b;4:7435. doi: 10.1038/srep07435.

27. Porretta D, Epis S, Mastrantonio V, Ferrari M, Bellini R, Favia G, Urbanelli S. How heterogeneous is the involvement of ABC transporters against insecticides? *Acta Trop.* 2016; 157:131-5. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.02.002.
28. Mastrantonio V, Ferrari M, Epis S, Negri A, Scucciamarra G, Montagna M, Favia G, Porretta D, Urbanelli S, Bandi C. Gene expression modulation of ABC transporter genes in response to permethrin in adults of the mosquito malaria vector *Anopheles stephensi*. *Acta Tropica.* 2017;171:37- 43. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.03.012.
29. Mastrantonio V, Ferrari M, Negri A, Sturmo T, Favia G, Porretta D, Epis S, Urbanelli S. Insecticide exposure triggers a modulated expression of abc transporter genes in larvae of *Anopheles gambiae* s.s. *Insects.* 2019; 10,66. doi: 10.3390/insects10030066.
30. Zhang X, Zhang J, Zhu KY. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol Biol.* 2010;19(5):683-93. doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x.
31. Singh A.D., Wong S., Ryan C.P., Whyard S., Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *J Insect Sci.* 2013;13:69. doi: 10.1673/031.013.6901.
32. Ingham VA, Jones CM, Pignatelli P, Balabanidou V, Vontas J, Wagstaff SC, Moore JD, Ranson H. Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in *Anopheles gambiae*: known and novel candidate genes. *BMC Genomics.* 2014;15:1018. doi: 10.1186/1471-2164-15-1018.
33. Kumar P, Pandit SS, Steppuhn A, Baldwin IT. Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(4):1245-52. doi: 10.1073/pnas.1314848111.
34. Whyard S, Erdelyan CN, Partridge AL, Singh AD, Beebe NW, Capina R. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasit Vectors.* 2015;8:96. doi: 10.1186/s13071-015-0716-6.
35. Mysore K, Hapairai LK, Sun L, Harper EI, Chen Y, Eggleston KK, Realey JS, Scheel ND, Severson DW, Wei N, Duman-Scheel M. Yeast interfering RNA larvicides targeting

- neural genes induce high rates of *Anopheles* larval mortality. *Malar J.* 2017;16(1):461. doi: 10.1186/s12936-017-2112-5.
36. Fillinger U, Lindsay SW. Larval source management for malaria control in Africa: myths and reality. *Malar J.* 2011;10:353. doi: 10.1186/1475-2875-10-353.
37. World Health Organization. (2013). Larval source management: a supplementary malaria vector control measure: an operational manual. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/85379>
38. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997;7:187–195. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.187
39. Summerton J. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr Top Med Chem.* 2007;7:651–650. doi: 10.2174/156802607780487740.
40. Luo Y, Wang X, Wang X, Yu D, Chen B, Kang L. Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Mol Biol.* 2013;22:574–583. doi: 10.1111/imb.12046.
41. Pietri JE, Cheung KW, Luckhart S. Knockdown of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling in the midgut of *Anopheles stephensi* mosquitoes using antisense morpholinos. *Insect Mol Biol.* 2014;23(5):558-65. doi: 10.1111/imb.12103.
42. Moulton JD. Guide for morpholino users: toward therapeutics. *J Drug Discov Dev Deliv.* 2016;3(2):1023.
43. Layden MJ, Rottinger E, Wolenski FS, Gilmore TD, Martindale MQ. Microinjection of mRNA or morpholinos for reverse genetic analysis in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Nat Protoc.* 2013;8:924–934. doi: 10.1038/nprot.2013.009.
44. Melvin VS, Feng W, Hernandez-Lagunas L, Artinger KB, Williams T. A morpholino-based screen to identify novel genes involved in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn.* 2013;242:817–831. doi: 10.1002/dvdy.23969.
45. Arora V, Knapp DC, Reddy MT, Weller DD, Iversen PL. Bioavailability and efficacy of antisense morpholino oligomers targeted to c-myc and cytochrome P-450 3A2

following oral administration in rats. *J Pharm Sci.* 2002;91:1009–1018.  
<https://doi.org/10.1002/jps.10088>

46. Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, Dumstrei K, Wise C, Lovell-Badge R, Thisse C, Thisse B, Raz E. dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol.* 2003;13(16):1429-34. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00537-2.
47. Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Méndez G, Raz E. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(11):4074-9. doi: 10.1073/pnas.0407475102.
48. World Health Organization (WHO) (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13. Geneva: World Health Organization.
49. Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, Crotti E, Epis S, Angeletti M, Valzano M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Mandrioli M, Favia G. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):182. doi: 10.1186/1756-3305-6-182.
50. Yamamoto DS, Sumitani M, Kasashima K, Sezutsu H, Matsuoka H. Inhibition of malaria infection in transgenic anopheline mosquitoes lacking salivary gland cells. *PLoS Pathog.* 2016;12(9):e1005872. doi: 10.1371/journal.ppat.1005872.
51. Morcos PA, Li Y, Jiang S. Vivo-Morpholinos: a non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *Biotechniques.* 2008;45(6):613-4, 616, 618 passim. doi: 10.2144/000113005.
52. Li T, Liu L, Zhang L, Liu N. Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Sci Rep.* 2014;4:6474. doi: 10.1038/srep06474.
53. Li T, Cao C, Yang T, Zhang L, He L, Xi Z, Bian G, Liu N. A G-protein-coupled receptor regulation pathway in cytochrome P450-mediated permethrin-resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Sci Rep.* 2015;5:17772. doi: 10.1038/srep17772.



54. Guo Z, Kang S, Zhu X, Xia J, Wu Q, Wang S, Xie W, Zhang Y. The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management. *Sci Rep.* 2015;5:13728. doi: 10.1038/srep13728.
55. Huvenne H, Smagge G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol.* 2010; 56:227-235. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.10.004.
56. Whangbo JS, Hunter CP. Environmental RNA interference. *Trends Genet.* 2008;24(6):297-305. doi: 10.1016/j.tig.2008.03.007.
57. Feinberg EH, Hunter CP. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science.* 2003;301: 1545–1547. doi: 10.1126/science.1087117.
58. Winston WM, Sutherlin M, Wright AJ, Feinberg EH, Hunter CP. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(25):10565-70. doi: 10.1073/pnas.0611282104
59. Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.* 2008;9(1):R10. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-r10.
60. Pillai AB, Nagarajan U, Mitra A, Krishnan U, Rajendran S, Hoti SL, Mishra RK. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Mol Biol.* 2017;26(2):127-139. doi: 10.1111/imb.12282.
61. Phanse Y, Dunphy BM, Perry JL, Airs PM, Paquette CC, Carlson JO, Xu J, Luft JC, DeSimone JM, Beaty BJ, Bartholomay LC. Biodistribution and toxicity studies of PRINT hydrogel nanoparticles in mosquito larvae and cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(5):e0003735. doi: 10.1371/journal.pntd.0003735.
62. Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006;36(9):683-93. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.05.01.



63. Joga MR, Zotti MJ, Smaghe G, Christiaens O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Front Physiol.* 2016;7:553. doi: 10.3389/fphys.2016.00553.
64. Airs PM, Bartholomay LC. RNA Interference for mosquito and mosquito-borne disease control. *Insects.* 2017;5;8(1). pii: E4. doi: 10.3390/insects8010004.
65. Fischer JR, Zapata F, Dubelman S, Mueller GM, Uffman JP, Jiang C, Jensen PD, Levine SL. Aquatic fate of a double-stranded RNA in a sediment-water system following an over-water application. *Environ Toxicol Chem.* 2017;36(3):727-734. doi: 10.1002/etc.3585.
66. Cancino-Rodezno A, Alexander C, Villaseñor R, Pacheco S, Porta H, Pauchet Y, Gill SS, Soberón M, Bravo A. The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2010;40:58–63. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.12.010.
67. Rodríguez-Almazán C, Reyes EZ, Zúñiga-Navarrete F, Muñoz-Garay C, Gómez I, Evans AM, Likitvivatanavong S, Bravo A, Gill SS, Soberón M. Biochem J. Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. 2012;443(3):711-7. doi: 10.1042/BJ20111579.
68. Dass CR, Choong PF. Chitosan-mediated orally delivered nucleic acids: a gutful of gene therapy. *J. Drug Target.* 2008;16, 257–261. doi: 10.1080/10611860801900801.
69. Zhang X, Mysore K, Flannery E, Michel K, Severson DW, Zhu KY, Duman-Scheel M. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *J Vis Exp.* 2015;(97). doi: 10.3791/52523.
70. Jeon SJ, Oh M, Yeo WS, Galvão KN, Jeong KC. Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. *PLoS One.* 2014;9(3):e92723. doi: 10.1371/journal.pone.0092723.
71. Stewart ZP, Oxborough RM, Tungu PK, Kirby MJ, Rowland MW, Irish SR. Indoor application of attractive toxic sugar bait (ATSB) in combination with mosquito nets for control of pyrethroid-resistant mosquitoes. *PLoS One.* 2013;8(12):e84168. doi: 10.1371/journal.pone.0084168.
72. Van Ekert E, Powell CA, Shatters RG Jr, Borovsky D. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid

methyl transferase. J Insect Physiol. 2014; 70:143-50. doi: 10.1016/j.jinsphys.2014.08.001.

73. Zhang Y, Zhang G, Li Y, Hu Y. Probing the binding of insecticide permethrin to calf thymus DNA by spectroscopic techniques merging with chemometrics method. J Agric Food Chem. 2013; 61(11):2638-47. doi: 10.1021/jf400017f
74. Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T. P450 Monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* say larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1998;37:47–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)15206327\(1998\)37:1<47::AIDARCH6>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)15206327(1998)37:1<47::AIDARCH6>3.0.CO;2-S).
75. Hemingway J, Ranson H: Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Ann Rev Entomol. 2000;45: 371-391. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.371.
76. Kasai S, Shono T, Komagata O, Tsuda Y, Kobayashi M, Motoki M, Kashima I, Tanikawa T, Yoshida M, Tanaka I, Shinjo G, Hashimoto T, Ishikawa T, Takahashi T, Higa Y, Tomita T. Insecticide resistance in potential vector mosquitoes for West Nile virus in Japan. J Med Entomol. 2007;44(5):822-9. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.822>.
77. Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. Annu Rev Entomol. 2015;60:537-59. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020828.





## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

---



A partire dalla prima metà del XX Secolo, la ricerca in entomologia applicata ha prodotto risultati di grande impatto, che hanno permesso di contenere le popolazioni d'insetti dannosi, di aumentare la produttività agricola, di contribuire all'eradicazione o al contenimento di diverse malattie a trasmissione vettoriale, in varie aree geografiche.

Nello specifico, malattie trasmesse da vettori importanti, come la malaria (3805 casi tra il 2013 e il 2017 in Italia) (Boccolini et al., 2018), in mancanza di un vaccino efficace, sono state combattute tramite prodotti chimici tossici, che trovano tutt'ora impiego nelle strategie volte a ridurre il contatto uomo-vettore (uso di ITNs e Llin) ed in diretti interventi adulticidi (tramite Irs) (Newby et al., 2015).

Premettendo che, al fine del controllo delle malattie, l'unico fattore al momento fronteggiabile per l'uomo è costituito dalla densità di organismi responsabili della trasmissione, è evidente come il massiccio e prolungato utilizzo d'insetticidi tossici abbia arrecato danni ecologici non trascurabili (ricordiamo ad esempio quelli legati all'abuso di DDT). In aggiunta, negli ultimi decenni, la comparsa di fenomeni di recrudescenza per la malaria, come per altre malattie, causata dall'aumento della densità di artropodi vettori, sembrerebbe imputabile a una duplice causa: i mutamenti ambientali (climatici ed ecologici), causati a loro volta dal fenomeno dell'antropizzazione (Dixon and Pinikakana, 1994; Sharma et al., 1991; Gratz, 1999) e l'insorgenza di resistenze ai trattamenti chimici di controllo.

Considerando tali ripercussioni, ma ammettendo anche l'impossibilità di arrestare fenomeni avanzati di antropizzazione e, al momento, l'incapacità d'identificare un metodo di controllo dei vettori malarici alternativo al trattamento chimico, gli interessi della ricerca si sono spostati alla radice del problema e dunque sui meccanismi di difesa cellulare da cui si originano le forme di resistenza (Buss and Callaghan, 2008).

Il mio progetto di dottorato ha avuto come primo obiettivo acquisire una maggiore comprensione di tali meccanismi di difesa cellulare nelle zanzare, contro un insetticida pretoide di sintesi. Una volta chiariti alcuni aspetti relativi ai meccanismi di detossificazione, in termini di geni potenzialmente coinvolti nella risposta all'insetticida, il secondo obiettivo è consistito nello sviluppo di sistemi d'inibizione dell'espressione di tali geni. I risultati a lungo termine che si attendono da un approccio di questo tipo sono diversi: 1) sviluppare metodologie che permettano di ridurre i dosaggi d'insetticida; 2) aumentare in modo specifico la sensibilità degli artropodi vettori al trattamento chimico, ottenendo un'intensificazione mirata dell'azione dell'insetticida; 3) evitare che si generino condizioni di sottodosaggio (indotte dall'attivazione dei meccanismi di difesa), favorevoli

all'insorgenza di resistenze. In sintesi, riconoscendo l'inderogabilità dei metodi chimici per il controllo degli insetti, in particolar modo delle zanzare, ci si è posti l'obiettivo di sviluppare approcci che promuovano un utilizzo più razionale dell'insetticida, potenziandone allo stesso tempo l'effetto.

Questo progetto si è quindi incentrato sullo studio delle pompe di efflusso, ABC trasportatori, ritenuti tra i maggiori responsabili dei processi di detossificazione in risposta all'azione neurotossica d'insetticidi piretroidi tutt'ora in uso (Zalom et al., 2005). Come affermato nella review di Dernmauw and Van Leeuwen (2014), in numerosi e recenti studi è stato evidenziato come, da un notevole aumento di trascritti codificanti per diverse sottofamiglie di ABC trasportatori negli artropodi, ne siano derivate forme di resistenza a numerose famiglie d'insetticidi chimici (organofosfati, carbammati, piretroidi e neonicotinoidi). A tale proposito, diversi lavori hanno riportato evidenze di attivazioni nelle zanzare: il gene ABCB4 è risultato over-espresso in zanzare *Ae. aegypti* resistenti ai piretroidi (Bariami et al., 2012), mentre ABCG4 e ABCB1 in *An. arabiensis* resistenti al DDT (Jones et al., 2012) ed ABCB4 in *An.gambiae* resistenti sia ai piretroidi che al DDT (Fossog et al., 2013). Per quanto riguarda zanzare sensibili della specie *An. stephensi*, il lavoro di Epis et al. (2014 a) aveva confermato l'attivazione dei due geni AnstABCG4 e AnstABCBmember6, appartenenti alle due superfamiglie B e G, già identificate nell'uomo, rispettivamente, come MDR1, proteine multifarmaco-resistenza (Ambudkar et al,1999) e proteine di resistenza multixenobiotica (MXR) (Sarkadi et al., 2004). In studi successivi tale attivazione era risultata modulata nel tempo, con attivazione di geni diversi in tempi diversi, conformemente alle fasi di coinvolgimento nel processo di detossificazione (Epis et al. 2014b; De Marco et al., 2017).

Partendo da questi presupposti, nel primo lavoro (Mastrantonio et al., 2017), è stata osservata una corrispondenza tra i risultati ottenuti negli adulti e quelli precedentemente evidenziati nelle larve (Epis et al. 2014a,b; De Marco et al., 2017). L'induzione con permetrina ha portato, infatti, a una rapida attivazione di tre dei sei geni analizzati (AnstABCG4, AnstABCB2 e AnstABCBmember6) in entrambi i sessi, dopo una e 24h.

In questo vettore malarico la corrispondenza nel modello di attivazione genica tra i due stadi di sviluppo può rappresentare un punto critico per l'insorgenza di forme di resistenza, soprattutto nei confronti dell'insetticida maggiormente impiegato in trattamenti adulticidi "indoor" (WHO, 2016) ed in trattamenti "outdoor" per la disinfestazione di campi coltivati, in prossimità di siti di breeding larvale. Occorre tenere in considerazione che le mutazioni

che conferiscono resistenza derivano proprio dal costante contatto con queste dosi sub-letali d'insetticida (Bigoga et al., 2012; Nkya et al., 2014; Liu, 2015). Allo stesso tempo, l'approfondita conoscenza dell'attivazione genica che si verifica nei diversi stadi di sviluppo della zanzara darebbe la possibilità di progettare sistemi d'inibizione che ne impediscano l'attività detossificante durante l'intero ciclo vitale del vettore (Dalla Bona et al., 2016). E' interessante notare come la risposta detossificante del defensoma contro la permetrina, pur avendo a disposizione un'ampia famiglia di geni ABC, attivi solo alcuni membri di precise sottofamiglie, mantenendo bassa l'espressione degli altri trasportatori (osservato anche in De Marco et al., 2017). Questo fenomeno potrebbe essere sinonimo di un risparmio energetico cellulare, che impedisce d'incorrere in un deficit di risorse, tramite l'attivazione selettiva di pochi *defensome genes* che comportino un dispendio controllato di ATP per l'organismo.

Nello stesso lavoro (Mastrantonio et al., 2017), per quanto riguarda le evidenze emerse tra i generi, le femmine hanno dimostrato una pronta attivazione (maggiore a un'ora dal trattamento) dei trasportatori ABC già citati, con conseguente maggiore capacità di sopravvivenza rispetto ai maschi. Tale disparità sembrerebbe imputabile alla diversa alimentazione: è stato osservato come la femmina, effettuando il pasto ematico finalizzato allo sviluppo delle uova, presenta risposte fisiologiche e immunitarie innate differenti oltre ad una flora microbica intestinale più complessa. In aggiunta, è stato recentemente ipotizzato il coinvolgimento di alcuni geni ABC trasportatori in un diverso processo di trasporto ed eliminazione nei confronti dell'EME, osservato principalmente nei vacuoli digestivi di specie ematofaghe. Nella zecca *Rhipicephalus microplus* (Lara et al., 2015) quest'attività digestiva incrementa la capacità detossificante: il trasportatore ABCB10 avendo la responsabilità di digestione delle componenti ematiche risulta predisposto ad un up-regolazione in presenza di altre sostanze potenzialmente tossiche da eliminare (come l'ivermectina). Un fenomeno simile, con sovraespressione del gene ABCB8, è stato riscontrato anche in *Ixodes ricinus*, in risposta a basse dosi dello stesso acaricida (Mangia et al., 2016). Questo fenomeno potrebbe dunque verificarsi anche nella zanzara femmina, la cui capacità di eliminazione dell'EME garantirebbe una reattività maggiore contro la permetrina.

Coerentemente con i risultati ottenuti su *An. stephensi* (Epis et al., 2014 a, b; De Marco et al., 2016; Mastrantonio et al., 2017), un pieno coinvolgimento di tali proteine di trasporto e detossificazione contro piretroidi è stato riscontrato anche nel secondo lavoro (Mastrantonio et al., 2019). In *An gambiae* s.s. sono stati identificati tre dei cinque geni



ABC trasportatori analizzati, quali maggiori protagonisti del processo, poiché up-regolati durante tutto il tempo di esposizione alla permetrina (48h). In questo studio è stato interessante osservare l'efficienza nella modulazione/orchestratura della risposta genica degli ABC nel tempo: l'attivazione di ognuno di questi trascritti si verifica in modo preciso e organizzato, in collaborazione e coordinazione con gli altri *defensome genes*, al fine di fornire una protezione complessivamente continuativa alla cellula (come avviene in *An. stephensi* (De Marco et al., 2016). Ciò si traduce in un'attivazione costante (6 - 48h) per i trasportatori ABCC-AGAP006427 e ABCG-AGAP001333 ed un'azione solo precoce e tardiva nel processo (4 e 48 h) per ABCB-AGAP005639.

L'altro punto chiave messo in luce in Mastrantonio e colleghi., (2019) è consistito nella riduzione o blocco dell'attività dei trasportatori ABC, con conseguente incremento della concentrazione intracellulare d'insetticida permetrina, tramite l'utilizzo dell'inibitore delle pompe di efflusso, verapamil. Il verapamil, fungendo da substrato per i siti di legame delle proteine ABC (dominio integrale transmembrana - TMDs), li "impegna", riducendo o negando l'espulsione del tossico ed incrementando la mortalità larvale, che raggiunge valori circa 15 volte superiori nelle larve trattate rispetto a quelle di controllo con solo insetticida. Tale capacità d'invertire il fenotipo MDR e di ridurre il valore della LD<sub>50</sub> in *An. gambiae* s.s. è concorde con quanto osservato precedentemente in *Cu. pipiens* (Buss et al., 2002), in *Ae. caspius* (Porretta et al., 2008), in *A. mellifera* (Hawthorne & Dively, 2011) ed in *Ae. aegypti* (Figureira-Mansur et al., 2013) per piretroidi e altri insetticidi. L'inibitore aspecifico è stato testato in questo lavoro al solo scopo di dimostrare ulteriormente il ruolo degli ABC trasportatori all'interno del pathway del defensoma e non allo scopo di testare la sua potenziale applicabilità in campo, quale composto sinergico per l'insetticida, poiché la sua aspecificità potrebbe facilmente causare fenomeni indesiderati di sensibilizzazione nella fauna non-target.

L'ultimo lavoro (Negri et al., 2019), di conseguenza, si è focalizzato su un diverso metodo d'inibizione, post-trascrizionale e di tipo specie- e sequenza-specifico, che porta all'inibizione mirata dei meccanismi di espulsione del tossico permetrina, scegliendo come target singolo il trasportatore ABCG4, quale gene maggiormente up-regolato sia in *An. stephensi* sia in *An. gambiae* durante l'induzione con l'insetticida. Sono stati eseguiti saggi d'inibizione dell'espressione genica *in primis* mediante siRNA (metodica di RNA interference), per confermare il coinvolgimento del trasportatore ABCG4 in risposta alla permetrina; in secondo luogo, tramite Vivo-Morpholino, ottenendo la medesima mortalità larvale in presenza di dosi ridotte d'insetticida per potenziare l'azione della permetrina.

Tramite la metodica di RNAi, è stato dimostrato come il silenziamento post-trascrizionale del *defensome gene* ABCG4, ad entrambe le concentrazioni e ad entrambi i tempi (seppur senza effetto dose dipendente), possa aumentare in modo significativo la suscettibilità larvale agli insetticidi. Il metodo di somministrazione *per os*, il dosaggio e le tempistiche (simili a Singh A.D. et al., 2013) sono risultate efficaci, inducendo sia sensibilizzazione delle larve trattate con inibitore, sia emissioni di fluorescenza diffusa nelle larve trattate con inibitore marcato con fluorocromo. La distribuzione di fluorescenza ai diversi tempi di esposizione, più concentrata a livello del tratto gastro-intestinale al primo time point e più diffusa nei tessuti all'ultimo, suggerirebbe una distribuzione sistemica degli oligonucleotidi marcati. Tale distribuzione e permanenza all'interno dell'organismo risulta funzionale nell'ottica di un controllo vettoriale, basato sul blocco dei trasportatori ABC, che copra tutti gli stadi di crescita della zanzara e persista attraverso lo sviluppo delle larve in adulto, come dimostrato in precedenza da Dalla Bona e colleghi. (2016) e Pillai e colleghi. (2017). Nonostante questi ottimi presupposti, che hanno consentito l'evidenziazione dell'ABCG4 come ottimo target per l'inibizione, il controllo vettoriale basato sull'uso di siRNA risulterebbe scarsamente applicabile in campo a causa dell'instabilità di struttura delle molecole e a causa della loro facile degradabilità una volta messe a contatto con agenti climatici/microbologici ambientali, in cui si imbatterebbero durante un'ipotetica applicazione in campo.

Al fine di ovviare a questo problema, nello stesso studio (Negri et al., 2019), si è voluto testare un ulteriore metodo d'inibizione post-trascrizionale del target ABCG4 di *An. stephensi*, basato sull'antisense Vivo-Morpholinos (Vivo-MOs) le cui caratteristiche strutturali e funzionali lo rendono più appetibile ad un futuro impiego in programmi di controllo di zanzare in campo o semi-campo. Queste molecole, avvantaggiate dalla loro natura neutra, dalla mancanza d'interazioni con proteine o con sequenze mRNA non specifiche e veicolate da una porzione di "delivery" che le rendono più durature in acqua e più facilmente interiorizzabili dalle cellule intestinali, rappresenterebbero i modulatori ideali dell'espressione genica in organismi quali la zanzara (Moulton, 2016). In questo studio preliminare le molecole di Vivo-MO hanno dimostrato la loro capacità di agire in sinergia con la permetrina (seppur somministrata in dosi ridotte, LD<sub>20</sub>), indebolendo le difese delle larve, con effetto dose dipendente ed evidente incremento di efficacia nel tempo.

Nonostante ciò, date le capacità modulatorie del pattern di espressione dei trasportatori ABC (De Marco et al., 2017), l'inibizione di un singolo gene del defensoma a lungo termine potrebbe comunque non garantire l'effetto desiderato. Come risoluzione a questo

problema sarebbe interessante proporre diverse molecole inibitorie che blocchino diversi trascritti del defensoma (trasportatori ABC o altri *defensome genes*), la cui contemporanea somministrazione, combinata con ridotte dosi d'insetticida, rappresenti un "cocktail"/composto attivo su più fronti delle difese cellulari, finalizzato ad una sensibilizzazione larvale irreversibile.

S'ipotizza infine, in un prossimo futuro, la progettazione di una "struttura" atta alla distribuzione graduale di questi inibitori in zone di breeding per vettori anofelini, con alto tasso di densità larvale. Ovvero, un sistema di rilascio costituito da zattere di idrogel galleggianti, contenenti basse dosi d'insetticida associate all'inibitore dei sistemi di difesa, microincapsulati in strutture a rilascio controllato (ipoteticamente in grado di sfruttare la variazione di pH gastrointestinale delle larve di zanzara), per ottenere una somministrazione mirata all'organismo target.

## REFERENZE

---

- Adak T., Singh O.P., Das M.K., Wattal S., Nanda N. Comparative susceptibility of three important malaria vectors *Anopheles stephensi*, *Anopheles fluviatilis*, and *Anopheles sudaicus* to *Plasmodium vivax*. J Parasitol. 2005;91(1):79-82
- Afrane Y.A., Mweresa N.G., Wanjala C.L., Gilbreath I.I.I., T.M., Zhou G., Lee M.C., et al. Evaluation of long-lasting microbial larvicide for malaria vector control in Kenya. Malaria J. 2016;15:577
- Aktar M.W., Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdiscip Toxicol. 2009;2(1):1–12
- Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:361-398
- Ansari M., Moraiet M., Ahmad S. Insecticides: impact on the environment and human health. In: Malik A., Grohmann E., Akhtar R. (eds) Environmental deterioration and human health. Springer. (2014):99-123. Dordrecht
- Arama C., Troye-Blomberg M. The path of malaria vaccine development, challenges and perspectives. J.Intern. Med. 2014;275:456–466
- Ashley E.A., Pyae Phyo A., Woodrow C.J. Malaria. Lancet. 2018;391:1608–1621
- Azmat R., Moin S., Saleem A. The insects as an assessment tool of ecotoxicology associated with metal toxic plants. Chemosphere. 2018;197:703-708
- Baird J.K. Effectiveness of antimalarial drugs. N Engl J Med. 2005;352:1565-1577
- Bariami V., Jones C.M., Poupardin R., Vontas J., Ranson H. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6):e1692
- Baumann P., Clark M. A., Baumann L., & Broadwell A. H. *Bacillus sphaericus* a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. Microbiological Reviews. 1991;55(3):425–436

Becker N. Mosquito control. German mosquito control association (KABS), (2015) University of Heidelberg, Waldsee, Germany

Becker N., Petric´ D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A. Mosquitoes and their control. (2010) Springer, p 577

Benelli G., Beier J.C. Current vector control challenges in the fight against malaria. *Acta Trop.* 2017;174:91-96

Bigoga J.D., Ndangoh D.N., Awono-Ambene P.H., Patchoke S., Fondjo E., Leke R.G. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* from the rubber cultivated area of Niete, South Region of Cameroon. *Acta Trop.* 2012;124(3):210-214

Boccolini D, Menegon M, Di Luca M, Toma L, Severini F, L'Episcopia M, Caraglia A, D'Amato S, Maraglino FP, Romi R, Gradoni L, Severini C. Malaria surveillance in Italy: a public health topic of relevance. XXX Congresso Nazionale SolPa, Milano, 26-29 giugno 2018

Boisvert M. & Boisvert J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and non target organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology.* 2000;10:517–561

Bonizzoni M., Afrane Y., Dunn W.A., Atieli F.K., Zhou G., Zhong D., Li J., Githeko A., Yan G. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. *PLoS One.* 2012;7(9):e44607

Bravo A., Gill S. S. & Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 2007;49(4):423–435

Broehan G., Kroeger T., Lorenzen M., Merzendorfer H. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics.* 2013;14:6

Buss D.S., Callaghan A. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2008;90:141–153

Buss D.S., McCaffery A.R., Callaghan A. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *Med Vet Entomol.* 2002;16(2):218-22

- Cabrera M. & Jaffe K. An aggregation pheromone modulates lekking behavior in the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23:1–10
- Can Ulu T., Sadic B., Susurluk I.A. Effects of different pesticides on virulence and mortality of some entomopathogenic nematodes. *Inv. Surv. J.* 2016;13:111-115
- Caputo B., Nwakanma D., Jawara M., Adiamoh M., Dia I., Konate L., Petrarca V., Conway D.J., Della Torre A. *Anopheles gambiae* complex along the Gambia river, with particular reference to the molecular forms of *An. gambiae* s.s. *Malar J.* 2008;7:182
- Charlwood J.D., Pinto J., Sousa C.A., Ferreira C., Do Rosario V.E. Male size does not affect mating success of *Anopheles gambiae* in São Tomé. *Med Vet Entomol.* 2002;16:109–111
- Chaves L.F., Koenraadt C.J. Climate change and highland malaria: fresh air for a hot debate. *Q Rev Biol.* 2010;85(1):27-55
- Ciadamidaro S., Mancini L., Rivosecchi L. Black flies (Diptera, Simuliidae) as ecological indicators of stream ecosystem health in an urbanizing area (Rome, Italy). *Ann Ist Super Sanita.* 2016;52(2):269-276
- Coetzee M. Distribution of the African malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70:103–104
- Cole S.P., Deeley R.G. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays.* 1998;20(11):931-40. Review.
- Corbi J.J., Froehlich C.G., Trivinho-Strixino S., Dos Santos A. Evaluating the use of predatory insects as bioindicators of metals contamination due to sugarcane cultivation in neotropical streams. *Environ Monit Assess.* 2011;177(1-4):545-54. doi: 10.1007/s10661-010-1655-5.
- Costa L.G., Giordano G., Guizzetti M., Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci.* 2008;13:1240-1249
- Creamer R., Hubble H., Lewis A. Curtovirus infection of chile pepper in new mexico. *Plant Dis.* 2005;89(5):480-486

Dabiré K.R., Sawadogo P.S., Hien D.F., Maiga H., Millogo A., Baldet T., Simard F., Gouagna L.C., et al. Occurrence of natural *Anopheles arabiensis* swarms in an urban area of Bobo-Dioulasso city, Burkina Faso, West Africa. *Acta Trop.* 2014;132S:S35–S41

Dadd R. H. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *Journal of Insect Physiology.* 1975;21(11):1847–1853

Dalla Bona A.C., Chitolina R.F., Fermino M.L. et al. Larval application of sodium channel homologous dsRNA restores pyrethroid insecticide susceptibility in a resistant adult mosquito population. *Parasites Vectors.* 2016; 9:397

D'Amico V. Biological control: Baculoviruses. Cornell University. Archived from the original on 1 June 2016. Retrieved 15 June 2016.

Davari B., Vatandoost H., Oshaghi M.A., Ladonni H., Enayati A.A., Shaeghi M., Basseri H.R., Rassi Y., Hanafi-Bojd A.A. Selection of *Anopheles stephensi* with DDT and dieldrin and cross-resistance spectrum to pyrethroids and fipronil. *Pest Bioch Physio.* 2007;89:97–103

David J.P., Ismail H.M., Chandor-Proust A., Paine M.J. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368(1612)

De Marco L., Sassera D., Epis S., Mastrantonio V., Ferrari M., Ricci I., Comandatore F., Bandi C., Porretta D., Urbanelli S. The choreography of the chemical defensome response to insecticide stress: Insights into the *Anopheles stephensi* transcriptome using RNA-Seq. *Scien. Rep.* 2017;7:41312

Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7):1156-1166

Della Torre A., Tu Z.J., Petrarca V. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochem Molec.* 2005;35:755–769

Denholm I., Devine G.J., Williamson M.S. Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science.* 2002; 297(5590):2222-2223

Dennison N.J., Jupatanakul N., Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci.* 2014;3:6-13.

- Dermauw W. & Van Leeuwen T. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 2014;45:89-110
- Dhiman S. Are malaria elimination efforts on right track? An analysis of gains achieved and challenges ahead. *Infect Dis Poverty.* 2019;8(1):14
- Diabate A., Dabire R.K., Kim E.H., Dalton R., Millogo N., Baldet T., Simard F., Gimnig J.E., Hawley W.A., Lehmann T. Larval development of the molecular forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in different habitats: a transplantation experiment. *J Med Entomol.* 2005;42:548–553
- Diabate A., Tripet F. Targeting male mosquito mating behaviour for malaria control. *Parasites Vectors.* 2015;8:347
- Diabaté A., Yaro A.S., Dao A., Diallo M., Huestis D.L., Lehmann T. Spatial distribution and male mating success of *Anopheles gambiae* swarms. *BMC Evol Biol.* 2011;11:184
- Dixon R.A., Pinikakana J.P. Malaria and proximity to irrigation projects: a parasitaemia prevalence study from Sri Lanka. *Mosq. Borne Dis. Bull.* 1994;11(4):116–121
- Donnelly M.J., Isaacs A.T., Weetman D. Identification, validation, and application of molecular diagnostics for insecticide resistance in malaria vectors. *Trends Parasitol.* 2016;32(3):197-206
- Draper S.J., Sack B.K., King C.R., Nielsen C.M., Rayner J.C., Higgins M.K., et al. Malaria vaccines, recent advances and new horizons. *Cell Host Microbe.* 2018;24,43–56
- Driessen A.J., Rosen B.P., Konings W.N. Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(8):397-401
- Eigenbrode S.D., Bosque-Pérez N.A., Davis T.S. Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. *Annu Rev Entomol.* 2018;63:169-191
- El-Awady R., Saleh E., Hashim A., et al. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. *Front Pharmacol.* 2017;7:535
- Eldering M., Bompard A., Miura K., Stone W., Morlais I., Cohuet A., Van Gemert G.J., Brock P.M., Rijpma S.R., et al. Comparative assessment of *An. gambiae* and *An.*



- stephensi* mosquitoes to determine transmission-reducing activity of antibodies against *P. falciparum* sexual stage antigens. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):489
- Epis S., Porretta D., Mastrantonio V., Urbanelli, S., Sassera D., Marco L.D., Mereghetti V., Montagna M., Ricci I., Favia G., et al. Temporal dynamics of the ABC transporter response to insecticide treatment: Insights from the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Sci. Rep.* 2014; 4:7435–7439
- Epis S., Porretta D., Mastrantonio V., Comandatore F., Sassera D., Rossi P., Cafarchia C., Otranto D., Favia G., Genchi C., et al. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasite Vector* 2014;7:349–355
- Feyereisen R. Insect cytochrome P450 in comprehensive molecular insect science–Biochem and Mol Bio. Oxford Elsevier (2005) vol4:1–77
- Figueira-Mansur J., Ferreira-Pereira A., Mansur J.F., Franco T.A., Alvarenga E.S., Sorgine M.H., et al. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Mol Biol.* 2013;22(6):648-58
- Fossog T.B., Poupardin R., Costantini C., Awono-Ambene P., Wondji C.S., Ranson H., Antonio-Nkondjio C. Resistance to DDT in an urban setting: common mechanisms implicated in both M and S forms of *Anopheles gambiae* in the city of Yaoundé Cameroon. *PLoS One*. 2013;8(4):e61408
- Fry W.E. Principles of plant disease management. Academic Press (2012):187
- Gadhve K.R., Dutta B., Coolong T., Srinivasan R. A non-persistent aphid-transmitted Potyvirus differentially alters the vector and non-vector biology through host plant quality manipulation. *Sci Rep.* 2019;9(1):2503
- Garibaldi L.A., Steffan-Dewenter I., Winfree R., Aizen M.A., Bommarco R., Cunningham S.A., Kremen C. et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*. 2013;339(6127):1608-11
- Gillot C. Insects and humans. Gillot C. (ed) *Entomology*, 3rd edn. Springer, Netherlands. (2005):725–776

- Githeko A.K., Adungo N.I., Karanja D.M., Hawley W.A., Vulule J.M., Seroney I.K., Ofulla A.V., Atieli F.K., Ondijo S.O., et al. Some observations on the biting behavior of *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* and their implications for malaria control. *Exp Parasitol.* 1996;82:306–315
- Githeko A.K., Service M.W., Mbogo C.M., Atieli F.K., Juma F.O. Origin of blood meals in indoor and outdoor resting malaria vectors in western Kenya. *Acta Trop.* 1994;58(3-4):307-316
- Goldstone J.V. Environmental sensing and response genes in Cnidaria: the chemical defensome in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Cell Biol Toxicol.* 2008;24(6):483-502
- Goldstone J.V., Hamdoun A., Cole B.J., Howard-Ashby M., Nebert D.W., Scally M., Dean M., Epel D., Hahn M.E., Stegeman J.J. The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev Biol.* 2006;300(1):366-84
- Gong Y., Li T., Gao, X. & Liu N. Permethrin induction of multiple cytochrome P450 genes in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Int. J. Biol. Sci.* 2013;9:863–871
- Gratz N.G. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Rev of Entom.* (1999).Vol. 44:51-75
- Gubler D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33(4):330-42
- Hawthorne D.J & Dively G.P. Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees. *PLoS One.* 2011;6(11):e26796
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L., Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(7):653-665
- Holt R.A., Subramanian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R., Nusskern D.R., Wincker P. et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science.* 2002;298(5591):129-149

Horowitz A.R. & Ishaaya I. Biorational Insecticides - mechanisms, selectivity and importance in pest management. *Insect Pest Management*. Springer, (2004). Berlin, Heidelberg

Hsu J.C., Haymer D.S., Wu W.J., Feng H.T. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36(5):396-402

Huang Y.S., Higgs S., Vanlandingham D.L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Front Microbiol*. 2019;10:22

Hume J.C., Tunnicliff M., Ranford-Cartwright L.C., Day K.P. Susceptibility of *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* to tropical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2007;6:139

Jaramillo-Gutierrez G., Rodrigues J., Ndikuyeze G., Povelones M., Molina-Cruz A., Barillas-Mury C. Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiol*. 2009;9:154

Jones C.M., Toé H.K., Sanou A., Namountougou M., Hughes A., Diabaté A., Dabiré R., Simard F., Ranson H. Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS One*. 2012;7(9):e45995

Kamali M., Marek P.E, Peery A., Antonio-Nkondjio C., Ndo C., Tu Z., Simard F., Sharakhov I.V. Multigene phylogenetics reveals temporal diversification of major African malaria vectors. *PLoS One*. 2014;9(4):e93580

Killeen G.F., Fillinger U., Kiche I., Gouagna L.C., Knols B.G. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *Lancet Infect Dis*. 2002;2(10):618-627

Kiritani K., Nakasuji F., Miyai S. Systems approaches for management of insect-borne rice diseases. In: Harris K.F. (eds) *Current topics in vector research*. current topics in vector research. Springer. (1987);vol 3. New York, NY

Koella J.C., Sørensen F.L., Anderson R.A. The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc Biol Sci.* 1998;265(1398):763-768

Konradsen F., Van der Hoek W., Cole D.C., Hutchinson G., Daisley H., Singh S., Eddleston M. Reducing acute poisoning in developing countries-options for restricting the availability of pesticides. *Toxicology.* 2003;192(2-3):249-261

Lamarque P., Meyfroidt P., Nettier B., Lavorel S. How ecosystem services knowledge and values influence farmers' decision-making. *PLoS One.* 2014;9:e107572

Lara F.A., Pohl P.C., Gandara A.C., Ferreira J.S., Nascimento-Silva M.C., Bechara G.H., Sorgine M.H., Almeida I.C., Vaz Ida S. Jr., Oliveira P.L. ATP binding cassette transporter mediates both HEME and pesticide detoxification in tick midgut cells. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134779

Lequime S. & Lambrechts L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol.* 2014;28:681-90

Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:231-53

Lima E.P., Goulart M.O. & Rolim Neto M.L. Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporters as a defence mechanism against temephos in populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109: 964–966

Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:537–59

Liu N., Li T., Reid W. R., Yang T. & Zhang L. Multiple cytochrome P450 Genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE.* 2011;6:e23403

Liu S., Zhou S., Tian L., Guo E., Luan Y., Zhang J., Li S. Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics.* 2011;12:491

Locke S.F., Bug vs. bug: How do mosquitoes survive deadly viruses unscathed? *Scientific American Blog Network* (2008)

- Lu H., Xu Y., & Cui F. Phylogenetic analysis of the ATP-binding cassette transporter family in three mosquito species. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2016;132:118–124
- Lv Y., Wang W., Hong S., Lei Z., Fang F., Guo Q., Hu S., Tian M., et al. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-susceptible and -resistant *Culex pipiens pallens* by RNA-seq. *Mol Genet Genomics*. 2016;291(1):309-321
- Mackenzie S.M., Brooker M.R., Gill T.R., Cox G.B., Howells A.J., Ewart G.D. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1419(2):173-185
- Magesa S.M., Wilkes T.J., Mnzava A.E.P., Njunwa K.J., Myamba J., Kivuyo M.D.P., Hill N., Lines J.D., Curtis C.F. Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria. Part 2. Effects on the malaria vector population. *Acta Trop*. 1991;49:97–108
- Mahmoudi S., Keshavarz H. Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(9):2098-2101
- Mahr D.L., Whitaker P., and Ridgway N. M. Biological control of insects and mites: an introduction to beneficial natural enemies and their use in pest management. University of Wisconsin Cooperative Extension. (2008);No. A3842, Madison, WI
- Majambere S., Lindsay S. W., Green C., Kandeh B., & Fillinger U. Microbial larvicides for malaria control in the Gambia. *Malaria Journal*. 2007;6:76
- Majambere S., Pinder M., Fillinger U., Ameh D., Conway D. J., Green C., Lindsay S. W. Is mosquito larval source management appropriate for reducing malaria in areas of extensive flooding in the Gambia? A cross-over intervention trial. *Amer J of Trop Med and Hyg*. 2010;82:176–184
- Mangia C., Vismarra A., Kramer L., Bell-Sakyi L., Porretta D., Otranto D., Epis S., Grandi G. Evaluation of the in vitro expression of ATP binding-cassette (ABC) proteins in an *Ixodes ricinus* cell line exposed to ivermectin. *Parasit Vectors*. 2016;9:215
- Marini L., Baseggio A., Drago A., Martini S., Manella P., Romi R., et al. Efficacy of two common methods of application of residual insecticide for controlling the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (skuse), in urban areas. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0134831

- Mastrantonio V., Ferrari M., Epis S., Negri A., Scuccimarra G., Montagna M., Favia G., Porretta D., Urbanelli S., Bandi C. Gene expression modulation of ABC transporter genes in response to permethrin in adults of the mosquito malaria vector *Anopheles stephensi*. *Acta Trop.* 2017;171:37-43
- Mastrantonio V., Ferrari M., Negri A., Sturmo T., Favia G., Porretta D., Epis S., Urbanelli S. Insecticide exposure triggers a modulated expression of ABC transporter genes in larvae of *Anopheles gambiae* s.s. *Insects.* 2019;10(3)
- Mehravaran A., Vatandoost H., Oshaghi M.A., Abai M.R., Edalat H., Javadian E., Mashayekhi M., Piazak N., Hanafi-Bojd A.A. Ecology of *Anopheles stephensi* in a malarious area, southeast of Iran. *Acta Med Iran.* 2012;50(1):61-65
- Mineau P., Whiteside M. Lethal risk to birds from insecticide use in the United States—a spatial and temporal analysis. *Environ Toxicol Chem.* 2006;25(5):1214-1222
- Mitchell S.N., Stevenson B.J., Müller P., Wilding C.S., Egyir-Yawson A., Field S.G., Hemingway J., Paine M.J., Ranson H., Donnelly M.J. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(16):6147-6152
- Moulton J.D. Guide for Morpholino users: Toward therapeutics. *J Drug Discov Develop and Deliv.* 2016;3(2):1023
- Murray C.L., Quaglia M., Arnason J.T. and Morris C.E. A putative nicotine pump at the metabolic blood-brain barrier of the tobacco hornworm. *J Neurobiol.* 1994;25:23–34.
- Murray D.A.H., Clarke M.B., Ronning D.A. Estimating invertebrate pest losses in six major Australian grain crops. *Austr J of Entom.* 2013;52:227–241
- Naqqash M.N., Gökçe A., Bakhsh A., Salim M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitol Res.* 2016;115(4):1363-1373
- Narayan K Insect defence: its impact on microbial control of insect pests. *Curr Sci.* 2004;86:800–814
- Nault L. R. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Annals of Entomol Soc of America.* 1997;90:521-541

- Negri A., Ferrari M., Nodari R., Coppa E., Mastrantonio V., Zanzani S., Porretta D., Bandi C., Urbanelli S., Epis S. Gene silencing through RNAi and antisense Vivo-Morpholino increases the efficacy of pyrethroids on larvae of *Anopheles stephensi*. *Malar J.* 2019;18(1):294
- Nelson S.C. & Bushe B.C. Collecting plant disease and insect pest samples for problem diagnosis. *Soil and Crop Management, SCM-14.* 2006;10
- Newby G, Hwang J, Koita K, et al. Review of mass drug administration for malaria and its operational challenges. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(1):125–134
- Nicolas L., Lecroisey A., & Charles J. F. Role of the gut proteinases from mosquito larvae in the mechanism of action and the specificity of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Canad J of Microb.* 1990;36(11):804–807
- Nkya T.E., Poupardin R., Laporte F., Akhouayri I., Mosha F., Magesa S., Kisinza W., David J.P. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasit Vectors.* 2014;7:480
- Nsibandé M.L. Sweet potato, *Ipomoea batatas* (L), cropping practices and perceived production constraints in Swaziland: implications for pest management. *Internat J of Pest Manag.* 1999;45:29–33
- Ogden N.H., Wilson J.R.U., Richardson D.M., Hui C., Davies S.J., et al. Emerging infectious diseases and biological invasions: a call for a One Health collaboration in science and management. *R Soc Open Sci.* 2019;6(3):181577
- Oliva C.F., Damiens D., Benedict M.Q. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. *Acta Trop.* 2014;132S:S512–S517
- Pan American Health Organization; World Health Organization. Epidemiological Alert, Increase of Malaria in the Americas. 2018; PAHO: Washington, DC, USA
- Pavlidis N., Vontas J., Van Leeuwen T. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Curr Opin Insect Sci.* 2018;27:97-102.

Petschenka G., Pick C., Wagschal V. and Dobler S. Functional evidence for physiological mechanisms to circumvent neurotoxicity of cardenolides in an adapted and a non-adapted hawk-moth species. *Proc Biol Sci.* 2013;280:20123089

Pignatelli P., Ingham V.A., Balabanidou V., Vontas J.; Lycett G., Ranson H. The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 2018;27:110–122.

Pillai A., Nagarajan U., Mitra A., Krishnan U., Rajendran S., Hoti S.L., Mishra R.K. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Mol Biol.* 2017;26(2):127-139

Porretta D., Gargani M., Bellini R., Medici A., Punelli F., Urbanelli S. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med Vet Entomol.* 2008:48-54

Rajendran T.P. & Singh D. Insects and pests. In: Omkar (ed) *Ecofriendly pest management for food security.* Elsevier, Inc. (2016):1–24

Ranson H., Jensen B., Vulule J.M., Wang X., Hemingway J., Collins F.H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol.* 2000;9(5):491-497

Ranson H., N'guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z., Corbel V. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 2011;27(2):91-8

Ranson H. & Lissenden N. Insecticide resistance in african *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends in Parasitology.* 2016;32(3):187-196

Rénia L., Goh Y.S., Peng. K, Mauduit M., Snounou, G. Assessing malaria vaccine efficacy. in Manguin S., Dev V. *Towards malaria elimination: a leap forw.* Eds.; IntechOpen (2018); pp. 339-362

Resh V.H. & Cardé R.T. *Encyclopedia of insects,* (2003). Riddiford LM. Molting. *Encyclopedia of insects,* 2nd ed., (2009)



Roser M. & Ritchie H. Malaria. (2020) *Published online at OurWorldInData.org*. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/malaria>'

Roth C.W., Holm I., Graille M., Dehoux P., Rzhetsky A., Wincker P., Weissenbach J., Brey P.T. Identification of the *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter superfamily genes. *Mol Cells*. 2003;15(2):150-158

Sánchez-Bayo F., Ortega R. Special issue on toxicology of pesticides. *J. Environ. Anal. Toxicol S*. 2012;4

Sarkadi B., Ozvegy-Laczka C., Németh K., Váradi A. ABCG2 a transporter for all seasons. *FEBS Lett*. 2004;567(1):116-20

Sarwar M. Biological control to maintain natural densities of insects and mites by field releases of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Int J of Entom and Nemat*. 2016;2:21-26

Sarwar M. The killer chemicals for control of agriculture insect pests: The botanical insecticides. *Int J of Chem and Biomol Sci*. 2015;1:123-128

Sarwar S. & Sarwar M. Involvement of insects (Insecta: Artropoda) in spreading of plant pathogens and approaches for pests management. *Amer J of Microb and Immun*. 2018;3(1):1-8

Saunders M.E., Peisley R.K., Rader R., Luck G.W. Pollinators, pests, and predators: recognizing ecological trade-offs in agroeco systems. *Ambio*. 2016;45(1):4–14

Shanks G.D., Edstein M.D. Modern malaria chemoprophylaxis. *Drugs*. 2005;65:2091-2110

Sharma S., Kooner R., R. A. Insect pests and crop losses. In: Arora R., Sandhu S. (eds) *Breeding insect resistant crops for sustainable agriculture*. Springer, Singapore. 2017;45-66

Sharma V.P., Prastisuk C., Kondrshin A.V. Magnitude of forest related malaria in the WHO Southeast Asia Region. In *Forest-Related Malaria*, ed. VP Sharma, AU Kondrashin. (1991):18– 22. Delhi, India: Malaria Res. Center

Silva A.P., Santos J.M., Martins A.J. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of Anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasit Vectors*. 2014;7:450

Singh A.D., Wong S., Ryan C.P., Whyard S. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *J Insect Sci.* 2013;13:69

Sparks T.C. & Nauen R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol.* 2015;121:122-8

Steinberg C.E.W. Arms race between plants and animals: biotransformation system in stress ecology: environmental stress as ecological driving force and key player in evolution (2012):61–105. Springer New York

Subbarao S. K. *Anopheline* species complexes in South and South-East Asia, Technical publication, World Health Organization, Regional Office for South-East Asia (1998). SEARO No. 18:116-121

Subbarao, S. K., Vasantha K., Adak T., Sharma V. & C. Curtis. Egg float ridge number in *Anopheles stephensi*: ecological variation and genetic analysis. *Med Vet Entomol* (1987);1(3): 265-271

Tesfazghi K., Hill J., Jones C., Ranson H., Worrall E. National malaria vector control policy: an analysis of the decision to scale-up larviciding in Nigeria. *Health Policy Plan.* 2016;31(1):91–101

Tremblay E. *Entomologia applicata*. I° ediz. Vol. 2°, parte 1°, Ed. Liguori, Napoli. (1981);1-310

Tremblay E. *Entomologia applicata*. Volume Primo: Generalità e mezzi di controllo. 3 ed. Liguori Editore, Napoli. (1985)

Tremblay, E. Ordine Diptera (Ditteri): 11-20. In *Entomologia applicata*. Volume III Parte I. Liguori Editore, Napoli. (1991)

Vandana S. Life Cycle of Anopheles (With Diagram) | Zoology.(Biology Discussion.com)

Vincent C., Weintraub P., Hallman G., & Fleurat-Lessard F. Insect management with physical methods in pre- and post-harvest situations. In E. Radcliffe, W. Hutchison, & R. Cancelado (Eds.). *Integrated pest management: concepts, tactics, strategies and case studies*. Cambridge: Cambridge University Press. (2008):309-323

Von Seidlein L., Peto T.J., Landier J., Nguyen T.N., Tripura R., Phommasone K., Pongvongsa T., Lwin K.M., et al. The impact of targeted malaria elimination with mass drug administrations on falciparum malaria in Southeast Asia: A cluster randomised trial. PLoS Med. 2019;16(2):e1002745

Vuk I., Rajic Z., Zorc B. Malaria and antimalarial drugs. Farm Glas. 2008;64:51-60

Walker K. & Lynch M. Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: Review of achievements and potential. Med and Vet Entom. 2007;21:2–21

Wang X., Fang X., Yang P., Jiang X., Jiang F., Zhao D., et al. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. Nat Commun. 2014;5:2957

White N.J.N., Pukrittayakamee S., Hien T.T.T., Faiz M.A., Mokuolu O.A.O., Dondorp A.A.M. Malaria. Lancet 2014; 383:723–735

WHO (2006). Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance

WHO (2009) Temephos in drinking water: Use for vector control in drinking- water sources and containers Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. WHO, Geneva

WHO (2012). World Health Organization-Handbook for Integrated Vector Management

WHO (2013). World Health Organization. Indoor Residual Spraying: An Operational Manual for IRS for Malaria Transmission, Control and Elimination

WHO (2013). World Health Organization. Larval Source Management: A Supplementary Measure for Malaria Vector Control. An Operational Manual

WHO (2016) Zika virus. Fact sheet N°1

WHO. (2017). Vector-borne diseases

Wu X., Xu S., Zhao P., et al. The Orthospovirus nonstructural protein NSs suppresses plant MYC-regulated jasmonate signaling leading to enhanced vector attraction and performance. PLoS Pathog. 2019;15(6):e1007897

Zaim M., Aitio A., Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med Vet Entomol. 2000;14(1):1-5

Zalom F., Toscano N., Byrne F. Managing resistance is critical to future use of pyrethroids and neonicotinoids. *Hilgardia*. 2005;59(1):11-15

Zhou G., Wiseman V., Atieli H.E., Lee M.-C., Githeko A.K., & Yan G. The impact of long-lasting microbial larvicides in reducing malaria transmission and clinical malaria incidence: study protocol for a cluster randomized controlled trial. *Trials*. 2016;17:423



 **MATERIALE SUPPLEMENTARE**

---



# ARTICOLO 1

---

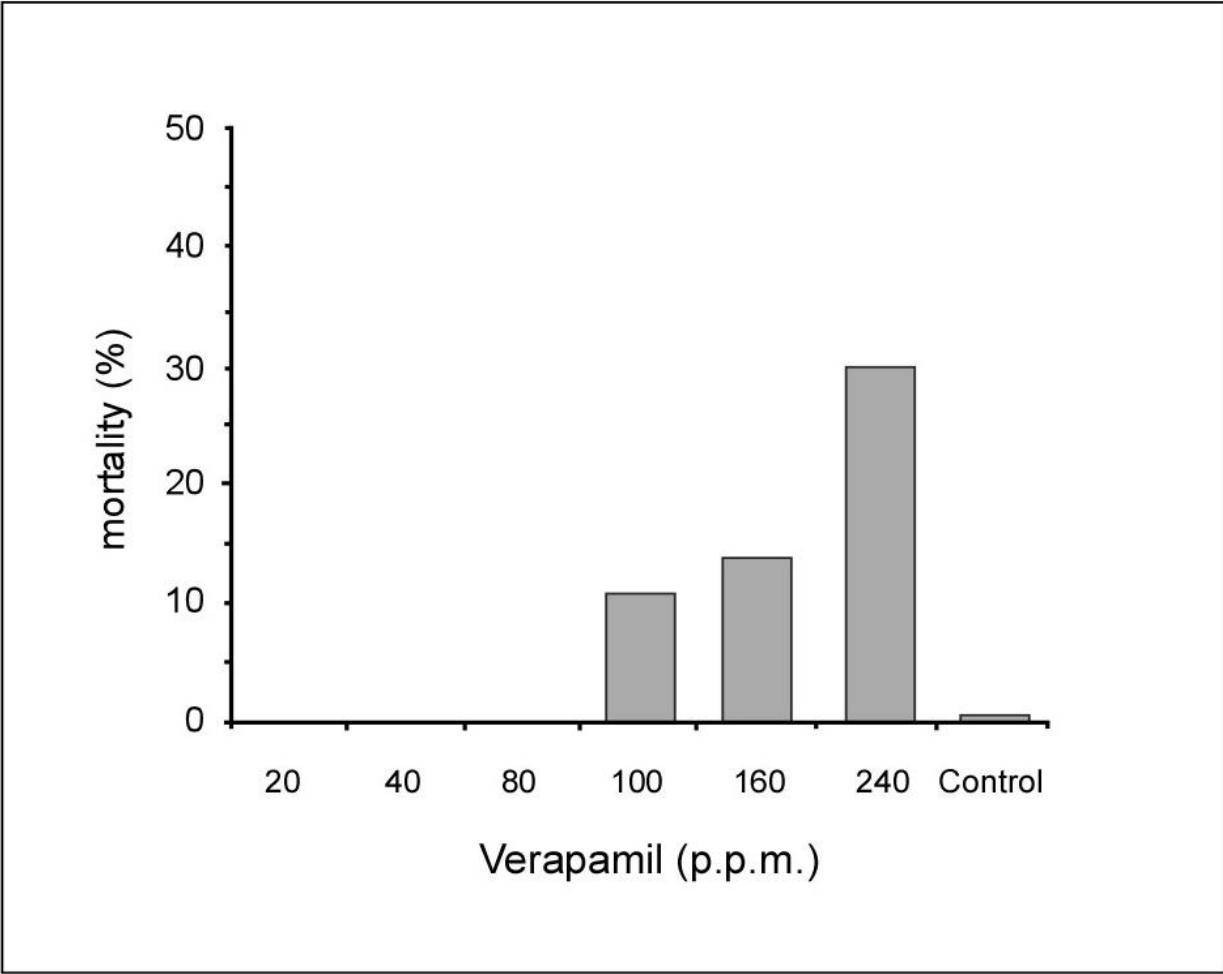
**Table S1. Mortality of male and female *Anopheles stephensi* adults exposed to permethrin.** The results obtained for permethrin treatment by the Student's *t* test were also shown. *df* = degree of freedom; *SD* = standard error of difference.

| Time-points | Permethrin mortality rate (%) |          |                          |           |           |                 | Control Mortality rate (%) |        |
|-------------|-------------------------------|----------|--------------------------|-----------|-----------|-----------------|----------------------------|--------|
|             | ♂                             | ♀        | Student's <i>t</i> -test |           |           |                 | ♂                          | ♀      |
|             |                               |          | <i>t</i> -statistics     | <i>df</i> | <i>SD</i> | <i>P</i> -value |                            |        |
| 1 h         | 70 (±11)                      | 40 (±8)  | 10.398                   | 6         | 2.844     | 0.00006         | 4 (±1)                     | 2 (±1) |
| 24 h        | 82 (±7)                       | 55 (±12) | 4.597                    | 6         | 5.935     | 0.0037          | 5 (±3)                     | 3 (±2) |



**Table S2. Relative expression of *Anopheles stephensi* ABC transporter genes measured by quantitative RT-PCR after permethrin treatment.** The expression level in non-treated adults was considered to be the basal level (equal 1). The internal reference gene *rps7* for *An. stephensi* was used to normalize expression levels. The values are expressed as fold change mean  $\pm$  standard deviation

| Exposure time  | ABCG4              | ABCB2              | ABCB6              | ABCB3              | ABCB4              | ABCC11             |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Females</b> |                    |                    |                    |                    |                    |                    |
| 1hour          | 4.93<br>$\pm 0.08$ | 8.51<br>$\pm 1.17$ | 8.75<br>$\pm 1.69$ | 0.98<br>$\pm 0.20$ | 0.98<br>$\pm 0.19$ | 1.28<br>$\pm 0.07$ |
| 24 hours       | 3.38<br>$\pm 0.18$ | 9.15<br>$\pm 0.15$ | 6.45<br>$\pm 0.15$ | 1.13<br>$\pm 0.14$ | 1.62<br>$\pm 0.04$ | 1.64<br>$\pm 0.12$ |
| <b>Males</b>   |                    |                    |                    |                    |                    |                    |
| 1hour          | 6.27<br>$\pm 0.09$ | 3.2<br>$\pm 0.17$  | 2.7<br>$\pm 0.08$  | 0.94<br>$\pm 0.06$ | 0.66<br>$\pm 0.18$ | 0.42<br>$\pm 0.48$ |
| 24 hours       | 4.4<br>$\pm 0.08$  | 8.99<br>$\pm 0.15$ | 7.98<br>$\pm 0.09$ | 1.54<br>$\pm 0.14$ | 1.41<br>$\pm 0.05$ | 0.61<br>$\pm 0.07$ |



**Figure S1:** Mortality rate of *Anopheles gambiae* s.s. larvae treated with verapamil

**Table S1.** Relative expression of *Anopheles gambiae* s.s. ABC genes measured by quantitative PCR after permethrin exposure at different times. The expression level in non-treated larvae was considered to be the basal level. The internal reference genes rps7 and act5C for *An. gambiae* s.s. were used to normalize the expression levels. The values are expressed as means  $\pm$  standard deviations. Times: two, four, six, 24 and 48 hours.

| AGAP001333         | AGAP006427        | AGAP002278         | AGAP006273         | AGAP005639         | Gene ID        |
|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| ABCG               | ABCC              | ABCB               | ABCB               | ABCB               | ABC Sub-family |
| 10.9 ( $\pm 0.1$ ) | 3.9 ( $\pm 0.7$ ) | -1.4 ( $\pm 1.1$ ) | 1.3 ( $\pm 0.7$ )  | -5.4 ( $\pm 1.1$ ) | 2h             |
| 4.4 ( $\pm 0.6$ )  | 4.3 ( $\pm 1.1$ ) | 1.6 ( $\pm 1.1$ )  | 1.3 ( $\pm 0.6$ )  | 4.3 ( $\pm 0.6$ )  | 4h             |
| 8.6 ( $\pm 0.9$ )  | 2.5 ( $\pm 0.1$ ) | -4.3 ( $\pm 1.6$ ) | -3.2 ( $\pm 0.9$ ) | 1.6 ( $\pm 0.5$ )  | 6h             |
| 8.7 ( $\pm 1.1$ )  | 1.4 ( $\pm 0.1$ ) | -4.3 ( $\pm 0.9$ ) | 2.2 ( $\pm 1.1$ )  | 2.7 ( $\pm 1.5$ )  | 24h            |
| 2.7 ( $\pm 0.8$ )  | 4.5 ( $\pm 1.0$ ) | -4.2 ( $\pm 0.7$ ) | -4.9 ( $\pm 0.9$ ) | 7.6 ( $\pm 1.2$ )  | 48h            |

**Table S2.** Univariate two-way ANOVA analysis on relative gene expression in relation to insecticide treatment and time of exposure for each ABC transporter gene analysed.

|                    | <b>df</b> | <b>MS</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|--------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| <b>AGAP005639</b>  |           |           |          |          |
| Insecticide        | 1         | 9,896     | 17,399   | 0.000*** |
| Time               | 4         | 34,347    | 60,388   | 0.000*** |
| Insecticide × Time | 4         | 34,347    | 60,388   | 0.000*** |
| <b>AGAP006273</b>  |           |           |          |          |
| Insecticide        | 1         | 20.667    | 56.160   | 0.000*** |
| Time               | 4         | 15.109    | 41.058   | 0.000*** |
| Insecticide × Time | 4         | 15.110    | 41.058   | 0.000*** |
| <b>AGAP002278</b>  |           |           |          |          |
| Insecticide        | 1         | 92.928    | 147.975  | 0.000*** |
| Time               | 4         | 10.270    | 16.354   | 0.000*** |
| Insecticide × Time | 4         | 10.270    | 16.354   | 0.000*** |
| <b>AGAP006427</b>  |           |           |          |          |
| Insecticide        | 1         | 40,368    | 148,412  | 0.000*** |
| Time               | 4         | 2,643     | 9,717    | 0.000*** |
| Insecticide × Time | 4         | 2,643     | 9,717    | 0.000*** |
| <b>AGAP001333</b>  |           |           |          |          |
| Insecticide        | 1         | 275,427   | 909,000  | 0.000*** |
| Time               | 4         | 17,209    | 56,797   | 0.000*** |
| Insecticide × Time | 4         | 17,209    | 56,797   | 0.000*** |

\*\*\* P < 0.001





**ALTRE PUBBLICAZIONI**

---



SCIENTIFIC NOTE

**Adenosine triphosphate–binding cassette transporters are not involved in the detoxification of *Azadirachta indica* extracts in *Anopheles stephensi* larvae**

MARCO FERRARI<sup>1,2</sup>, AGATA NEGRI<sup>3</sup>, CLAUDIA ROMEO<sup>4</sup>, ILARIA VAROTTO BOCCAZZI<sup>2</sup>, RICCARDO NODARI<sup>2</sup>, ANNETTE HABLUETZEL<sup>5</sup>, GIORGIO MOLteni<sup>6</sup> AND YOLANDA CORBETT<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Texas Biomedical Research Institute, 8715 W. Military Dr., San Antonio, TX 78227.

<sup>2</sup> Department of Biosciences, University of Milan, via Giovanni Celoria 26, 20133 Milan, Italy.

<sup>3</sup> Department of Environmental Biology, “La Sapienza” University of Rome, via Cesare de Lollis 21, 00185 Rome, Italy.

<sup>4</sup> Department of Veterinary Medicine, University of Milan, via Giovanni Celoria 10, 20133 Milan, Italy.

<sup>5</sup> School of Pharmacy, University of Camerino, via Madonna delle Carceri 9, 62032 Camerino, Italy.

<sup>6</sup> Department of Chemistry, University of Milan, via Camillo Golgi 19, 20133 Milan, Italy.

**KEY WORDS** Detoxification, mosquito defenses, natural insecticides, neem tree, vector control

---



## Abstract

I pathway di detossificazione attivati dalle zanzare nei confronti degli estratti di neem (*Azadirachta indica*) risultano tutt'ora poco chiari. Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare il ruolo degli ABC trasportatori (ATP binding cassette) in tale processo di difesa, nella zanzara della specie *Anopheles stephensi*, uno dei principali vettori di malaria dell'Asia meridionale. A tale scopo le larve di *An. stephensi* sono state alimentate con solo cibo per pesci o cibo addizionato con estratto di neem allo 0,5%, 1%, 5%, e 10%. Sei geni ABC-transportatori, di 3 diverse sottofamiglie (B, C e G), sono stati analizzati per valutare la loro espressione relativa rispetto ai controlli. E' stato inoltre effettuato un biosaggio per valutare il tasso di mortalità larvale alle diverse concentrazioni di neem in combinazione con l'inibitore aspecifico degli ABC trasportatori, verapamil.

Non è stata rilevata nessuna variazione significativa nei livelli di espressione di qualsiasi trasportatore appartenente alle sottofamiglie B, C e G. Inoltre, l'uso di verapamil non ha indotto un aumento della mortalità in combinazione con nessuna delle concentrazioni di estratto di neem testate, indicando che i trasportatori ABC non sono coinvolti nei fenomeni di detossificazione dagli estratti di neem nelle larve di *An. stephensi*.



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA