



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis
Programa de Pós-Graduação em Química Biológica

Inibição da degradação da tirosina para o controle de mosquitos

Marlon Alexander Vergaray Ramirez

Rio de Janeiro

2018

LOMBADA

MARLON ALEXANDER
VERGARAY RAMIREZ

INIBIÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA
TIROSINA PARA O CONTROLE
DE MOSQUITOS

UFRJ

2018

Marlon Alexander Vergaray Ramirez

Inibição da degradação da tirosina para o controle de mosquitos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira

Professor Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Coorientador: Dr. Marcos Sterkel

Pesquisador Assistente CONICET. National University of La Plata (UNLP)

Rio de Janeiro

2018

FICHA CATALOGRAFICA

Ramirez, Marlon Vergaray

Inibição da degradação da tirosina para o controle de mosquitos / Marlon Vergaray Ramirez. Rio de Janeiro, UFRJ, 2018.

Número de páginas fls. 100

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) /UFRJ/Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis/Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2018.

Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira

Referências bibliográficas: f.84-100

FOLHA DE APROVAÇÃO

Inibição da degradação da tirosina para o controle de mosquitos

Marlon Alexander Vergaray Ramirez

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Aprovado por:

Denise Valle

*Doutora pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pesquisadora titular da
Fundação Oswaldo Cruz.*

1º examinador

Rafael Maciel de Freitas

Doutor pelo Instituto Oswaldo Cruz. Pesquisador titular-Instituto Oswaldo Cruz.

2º examinador

Ana Cristina Bahia Nascimento

Doutora pelo Instituto Oswaldo Cruz. Professor Adjunto IBCCF-UFRJ.

3º examinador

Ednildo Alcantara Machado

Doutor pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professor associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

Suplente Externo

Monica Montero Lomeli

Doutora pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professora associada do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Revisor / Suplente Interno

Pedro Lagerblad de Oliveira

Doutor pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Professor Principal do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis – IBqM (UFRJ).

Orientador

Marcos Sterkel

Doutor pela National University of La Plata (UNLP). Pesquisador Assistente CONICET. Centro Regional de Estudios Genómicos - CREG

Coorientador

Rio de Janeiro, 03 de agosto de 2018.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores da FIOCRUZ, sob orientação do Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira e co-orientação do Dr. Marcos Sterkel e em colaboração com o Dr. José Bento Pereira Lima e o Dr. Ademir Martins Junior. O trabalho foi desenvolvido na vigência de auxílios concedidos pela CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

À minha mãe
Ao meu pai
Ao meu irmão

Scientific research is one of the most exciting and rewarding of occupations. It is like a voyage of discovery into unknown lands, seeking not for new territory but for new knowledge.

It should appeal to those with a good sense of adventure.

Frederick Sanger (10 Dec 1980)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira por me dar a oportunidade de formar parte de sua equipe de trabalho, pelo apoio, pela infinita paciência. Muito obrigado pelas suas observações e correções, por me permitir trabalhar e aprender com a maneira de lidar com os problemas de pesquisa. Por me dar as sugestões que precisava e acompanhamento ao longo destes dois anos, apesar de sus compromissos. Por me dar a oportunidade de crescer não apenas como cientista, mas também como pessoa. Para mim é um exemplo a seguir.

Ao meu Co-orientador Marcos Sterkel, por ser como um irmão para mim, pelos ensinamentos, pela amizade, pela dedicação e compreensão. Por tornar tudo mais fácil, por me permitir confiar em você, pelas conversas científicas e também pelas conversas não científicas. Compartilhar esse trabalho com você foi muito gratificante.

Ao Dr. José Bento Pereira Lima por me dar toda a facilidade para fazer ensaios no laboratório por ele chefiado e pelo fornecimento dos mosquitos, pelo seu jeito pausado de falar que foi de grande ajuda para mim nos primeiros meses no laboratório. Por me dar dicas para o desenvolvimento dos ensaios, em especial com Anopheles e Culex.

Ao Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior, por estar sempre disposto a oferecer sua ajuda e seu tempo, pelo fornecimento dos mosquitos e responder muitas das minhas dúvidas.

Ao Dr. Marcos Sorgine, Dra. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva e a Dra. Carla Policarpo pelo seu apoio ao longo deste período.

À Dra. Martha Sorenson por me escutar detidamente e fazer correções do meu manuscrito no inglês, pelas suas correções e sugestões.

À Dra Monica Montero Lomeli, revisora da minha dissertação, pelo seu acompanhamento no curso destes dois anos.

À os membros da banca examinadora, Dra. Denise Valle, Dr. Rafael Maciel de Freitas, Dra. Ana Cristina Bahia Nascimento, pelo seu tempo e sugestões críticas do manuscrito, que ajudaram a melhorá-lo.

A todos os integrantes do laboratório de Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, especialmente a Octavio Talyuli da Cunha, Vanessa Botino Rojas, Igor Ferreira e Rodrigo Dutra Nunes por sempre me ensinar e esclarecer as dúvidas que tinha sob meu modelo de estudo, os mosquitos. A Ana Carolina Paiva Gandara, Felipe de Almeida Dias, Tainan Carla Guedes, Clarinha, Laion Okuda, Gilbert Oliveira, Leticia Lima, Melina Guizzo, José Henrique de Oliveira, Leila Faustino Dutra Oliveira, Renata de Cássia Pires, Jheniffer, Gabi, Fernanda, Raquel. Sem a ajuda de vocês não teria conseguido terminar este caminho. Muito obrigado por me escutarem e aconselharem em todos os momentos que eu precisava. Também estou muito grato pelas suas loucuras e brincadeiras que fizeram o trabalho do laboratório mais divertido.

A todos os integrantes do LAFICAVE- Laboratório de Fisiologia e Controle de insetos vetores-FIOCRUZ- RJ, especialmente a Luciana Dias dos Santos pelo seu tempo, pelo seu apoio no trabalho no laboratório e convivência agradável. A Luana Carrara, Raquel Santos, Priscila Serravale, Quesia Amorín, Jhon Caldeira, Rafi Khaan, Gilberto, Sandro, Cynara Rodovalho, Luiz Bauzer, Monique Costa, Luiz Brito pelo apoio na execução dos experimentos e responder às minhas perguntas.

Aos colaboradores técnico-administrativos da pós-graduação e do laboratório, especialmente a Patrícia Ingridis, Pingo, Charlion Cosme pelo seu trabalho que permite que as coisas funcionem mais facilmente no laboratório.

Também quero agradecer às pessoas que estão encarregadas do serviço de limpeza do laboratório e do serviço de vigilância, pelo seu trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Á TODOS em geral, pela sua amizade e por me aceitarem com minhas diferenças.

RESUMO

Vergaray-Ramirez, Marlon. Inibição da degradação da tirosina para o controle de mosquitos. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2018.

Os mosquitos são vetores de diferentes patógenos. A maioria deles têm um hábito hematófago, consomem grandes quantidades de sangue para obter as proteínas necessárias para a maturação dos seus ovos. Produto da degradação das proteínas do alimento sanguíneo, uma enorme quantidade de aminoácidos é gerada no intestino médio. Em outro artrópode hematófago, *Rhodnius prolixus*, se demonstrou a importância da detoxificação de um destes aminoácidos, a tirosina. Isso abriu as possibilidades da utilização dos inibidores da 4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD), que interfere com a degradação da tirosina, como ferramenta para o controle desses insetos. Aqui nós mostramos que os inibidores da HPPD produzem a morte dos mosquitos após a alimentação com sangue, tanto quando são administrados pela via oral ou tópica. Em *Aedes aegypti*, NTBC demonstrou ser o inibidor mais potente dos três estudados (NTBC, Mesotriona e Isoxaflutole). As doses letais (LD) de NTBC em *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles aquasalis* foram similares ao *A. aegypti*. A alimentação artificial de NTBC em linhagens de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas neurotóxicos não mostrou diferenças entre as linhagens resistentes e suscetíveis, mas a aplicação tópica resultou em uma diferença moderada entre as linhagens, o que indica uma diminuição na penetração do composto através da cutícula dos mosquitos resistentes. A impregnação do NTBC em ensaio de garrafa de vidro, mostrou uma diminuição da sobrevivência dos mosquitos, embora não tenha sido produzida uma curva dose-resposta. O teste do efeito do NTBC nos mosquitos *Aedes aegypti* submetidos a uma alimentação com sangue suplementado com o vírus Zika, mostrou que doses subletais da NTBC reduzem o título viral. Portanto, inibir a degradação da tirosina pode ser uma ferramenta potencial para o controle de mosquitos.

ABSTRACT

Vergaray, Ramirez Marlon. Inibitivo of tyrosine degradation for mosquito control. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2018.

Mosquitoes are vectors of different pathogens. Most of them have a hematophagic habit and consume large amounts of blood to obtain the proteins necessary for the maturation of their eggs. As a consequence of the degradation of proteins of blood meal, huge amounts of amino acids are produced in the midgut. In another hematophagous arthropod, *Rhodnius prolixus*, the importance of detoxification of one of these amino acids, tyrosine, has been demonstrated. This opened up the possibilities of using 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitors, which interfere with the degradation of tyrosine, as a tool for the control of these insects. Here we show that HPPD inhibitors reduce mosquitoes survival when administered both, orally and topically. Artificial feeding with blood plus nitisinone (NTBC) in *Aedes aegypti* was lethal, but mesotrione and isoxaflutole were less potent. In the topical application, a better response was also obtained with the NTBC. The NTBC was tested by artificial feeding on *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles aquasalis*, obtaining a similar response to *Aedes aegypti*. NTBC was evaluated in insecticide-resistant strains of *Aedes aegypti*, and no significant difference was observed between resistant and susceptible lineages using artificial feeding assay. However, topical application assays revealed moderate difference between resistant and susceptible lineages. Glass bottle impregnation assays with NTBC decreased survival of mosquitoes. NTBC treatment of *Aedes aegypti* mosquitoes fed with a Zika virus containing blood meal showed that sublethal doses of NTBC reduced mosquito infection. Therefore, inhibiting tyrosine degradation may be a potential tool for mosquito control.

Lista de siglas e abreviaturas.

ACC: Acetil-CoA carboxilase
AChE: Acetilcolinesterase
ace1: Mutação na acetilcolinesterase
Bti: *Bacillus thuringiensis israelenses*
CA: Carbamatos
CHIKV: Vírus Chikungunya
CIV: controle integrado de vetores
CDC: Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CMC: Carboximetilcelulosa
CYP450: Citocromo P450
Cys: Cisteína
DDT: Dicloro difeniltricloroetano
DEN-1: sorotipo 1 do vírus do dengue
DEN-2: sorotipo 2 do vírus do dengue
DEN-3: sorotipo 3 do vírus do dengue
DEN-4: sorotipo 4 do vírus do dengue
DKN: dicetonitrila
DMEM: Médio de cultura Dulbecco modification of Minimum Essential Media
dpi: dias post-infecção
EUA: Estados Unidos da América
FAH: fumarilacetoacetase (fumarilacetoacetato hidrolase)
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GST: Glutathione S-transferase
HJ: hormônio juvenil
Hgd: Homogentisato 1,2-dioxigenase
HMG-CoA redutase: Hidroximetilglutaril Coenzima A redutase
HPPD: 4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenase
IFT: Isoxaflutole
IGR: Reguladores do crescimento de insetos
Ile: Isoleucina
IRS: indoor residual spraying
Kdr: Knockdown Resistance

LAFICAVE: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
LD50: Doses Letal 50 (mata 50% dos mosquitos)
LD10: Dose letal 10 (mata 10% dos mosquitos)
LLIN: Long Lasting Insecticidal Nets
MAAI: Maleilacetoacetato isomerase
MES: Mesotriona
MoReNAa: Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas
NAv: Canal de sódio dependente de voltagem
NTBC: nitisinona
OCA: albinismo ocular cutâneo
OC: Organoclorados
OMS: Organização Mundial de Saúde
OP: Organofosforados
PAH: fenilalanina hidroxilase
PBM: Post-blood meal
PBO: piperonyl butoxide
PBS: Phosphate buffered saline
PDS: fitoeno desaturase
PFU: Unidade de formação de placa
Phe: fenilalanina
PI: Piretróides
PKU: fenilcetonúria
PNCD: Programa Nacional de controle da Dengue
PQ: Plastoquinona
rdI: Mutação que vai conferir resistência a dieldrin
RIDL: Libertação de insetos com letal dominante
ROCK: Rockefeller
RR: Razão de Resistência
SA: succinilacetona
SAA: succinilaceteoacetato
SIT: técnica de inseto estéril
SFB: soro fetal bovino
Sobi: Swedish Orphan Biovitrum

SP: Espinosinas

TAT: tirosina aminotransferase

TH-I: tirosinemia hereditária tipo I

TH-II: tirosinemia hereditária tipo II

TH-III: tirosinemia hereditária tipo III

Tyr: tirosina

Val: Valina

WHOPES: WHO Pesticide Evaluation Scheme

WMP: World Mosquito Program

ZIKV: vírus Zika

Lista de Figuras

- Figura 1. Representação do ciclo biológico de um mosquito.
- Figura 2. Neurotoxicidade dos inseticidas.
- Figura 3. Mecanismos de resistência nos mosquitos.
- Figura 4. Estrutura química da L-tirosina.
- Figura 5. Via da degradação da tirosina em humanos.
- Figura 6. Via metabólica da tirosina em plantas.
- Figura 7. Efeito dos inibidores da HPPD no metabolismo da tirosina em plantas.
- Figura 8. Estrutura química da letopspermona.
- Figura 9. Estrutura química da mesotriona (MES)
- Figura 10. Estrutura química da Nitisinona (NTBC).
- Figura 11. Estrutura química do isoxaflutole (IFT).
- Figura 12. O IFT (isoxaflutole) se ativa a dicetonitrila (DKN), inibidor da HPPD.
- Figura 13. Estrutura química da tropamezona.
- Figura 14. A via da degradação da tirosina em insetos.
- Figura 15. A importância da degradação da tirosina em artrópodes hematófagos.
- Figura 16. Bioensaio utilizando papéis impregnados com NTBC
- Figura 17. Curva dose-resposta de letalidade do *A. aegypti* (Red Eye strain) em ensaio de garrafa impregnada com NTBC.
- Figura 18. Efeito da NTBC na infecção do *A. aegypti* (Red Eye strain) pelo vírus Zika.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Mosquitos

Mosquitos são insetos da família Culicidae, ordem Diptera, Sub-ordem Nematocera, caracterizados por suas longas antenas filiformes e multi-segmentadas, com muitas cerdas nos machos, que os diferencia da sub-ordem Brachycera. Eles são, talvez, o grupo de insetos mais bem-sucedido no desenvolvimento da hematofagia. É um grupo grande, com 39 gêneros que somam um total de 3500 espécies reconhecidas, mas do ponto de vista da saúde humana, os mais importantes pertencem aos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (REINERT, 2001).

Os mosquitos são holometábolos (metamorfose completa) e passam por quatro estágios biológicos: ovo, larva (quatro instares), pupa e adulto (ou imago). Os três primeiros estágios são desenvolvidos em ambientes aquáticos. O estágio adulto (fêmeas ou macho) é o que voa (Figura 1). Os adultos se alimentam principalmente de néctares florais, e as fêmeas, além da ingestão de carboidratos precisam de proteínas sanguíneas para o desenvolvimento e a maturação de seus ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O hábito hematofágico das fêmeas as torna responsáveis pela transmissão de diferentes patógenos.

O gênero *Aedes* é encontrado em zonas tropicais e subtropicais. Os mais representativos são o *Aedes aegypti* (origem africana, fortemente antropofílicos) e o *Aedes albopictus* (origem asiática, não são tão antropofílicos). O *A. aegypti* transmite o vírus da dengue (DV), febre amarela (FAV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV). O *A. aegypti* é importante principalmente nas Américas. O *A. albopictus* é menos susceptível a infecção por ZIKV que o *A. aegypti* (POMPON et al., 2017). O *A. albopictus* é importante na Ásia, mas também estão presentes em outros continentes (KOTSAKIOZI et al., 2017). Em Brasil a presença desse mosquito foi relatada a partir de 1986 (PANCETTI et al., 2015).

O vírus do dengue inclui quatro sorotipos diferentes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) que produzem como manifestações clínicas a dengue e dengue grave. Para um melhor entendimento são divididas em três: dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). O CHIKV foi identificado pela primeira vez em Makonde Plateau, Tanzânia (ROBINSON, 1955). O CHIKV foi originalmente transmitido apenas pelo *A. aegypti*, mas estudos mostraram uma mutação no gene da glicoproteína do envelope (E1) no genótipo

ESCA (Leste-Centro-Sul africano) que permitiu que ele fosse transmitido por *A. albopictus*, expandindo grandemente sua distribuição geográfica (TSETSARKIN et al., 2007).

O ZIKV, originário da floresta de Zika em Uganda, é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015). O vírus foi gradativamente se espalhando em direção ao oriente, tendo a primeira epidemia de grande porte sido detectada na Polinésia, nas Ilhas Yap, em 2007 (KOOL et al., 2009; MESSINA et al., 2016). Em 2015 foi detectado no Brasil a transmissão autóctone desse vírus. Mais de 1 milhão de casos foram registrados, sendo indicado como agente causador de microcefalia em crianças (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; POSSAS et al., 2017; ZINSZER et al., 2017), que é causada pela infecção de mulheres grávidas (GULLAND, 2016). O ZIKV também está associado à síndrome de Guillain-Barré em adultos (ROZE et al., 2017) e a outras síndromes neurológicas.

O gênero *Anopheles* compreende mosquitos vetores do parasito *Plasmodium*, causador da malária. Um dos vetores mais importantes da malária é o mosquito *Anopheles gambiae*, que na África transmite o parasito *Plasmodium falciparum*. Esta doença é uma das mais prevalentes no mundo e ocorre em áreas tropicais, principalmente na África Subsaariana (WHO, 2016a). Mas também está presente no sudeste da Ásia e na América Latina (CRUZ et al., 2013; KIM STREATFIELD et al., 2014). Alguns mosquitos (*A. gambiae*, *Anopheles funestus*) são fortemente antropofílicos, enquanto outros (*Anopheles aquasalis*) são predominantemente zoofílicos (FLORES-MENDOZA et al., 1996). Existem muitos mosquitos do gênero *Anopheles* que transmitem a malária. Nas Américas, o principal transmissor da malária é *Anopheles darlingi* (SINKA et al., 2012). No Brasil, após de anos de queda, observou-se um aumento, principalmente na região Amazônica e, em 2017, outros países da América Latina registraram o mesmo cenário (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; PAHO/WHO, 2018).

O gênero *Culex* pode transmitir arboviroses como o vírus do Nilo Ocidental, encefalite japonesa, encefalite de St. Louis e a febre do Vale do Rift. Mas também podem transmitir filariose, causada pelo nematódeo *Wuchereria bancrofti*. *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor desse nematódeo na Índia (AGRAWAL; SASHINDRAN, 2006). No Brasil, é uma doença de alta prevalência no Nordeste (Região Metropolitana do Recife) (FONTES et al., 2012).

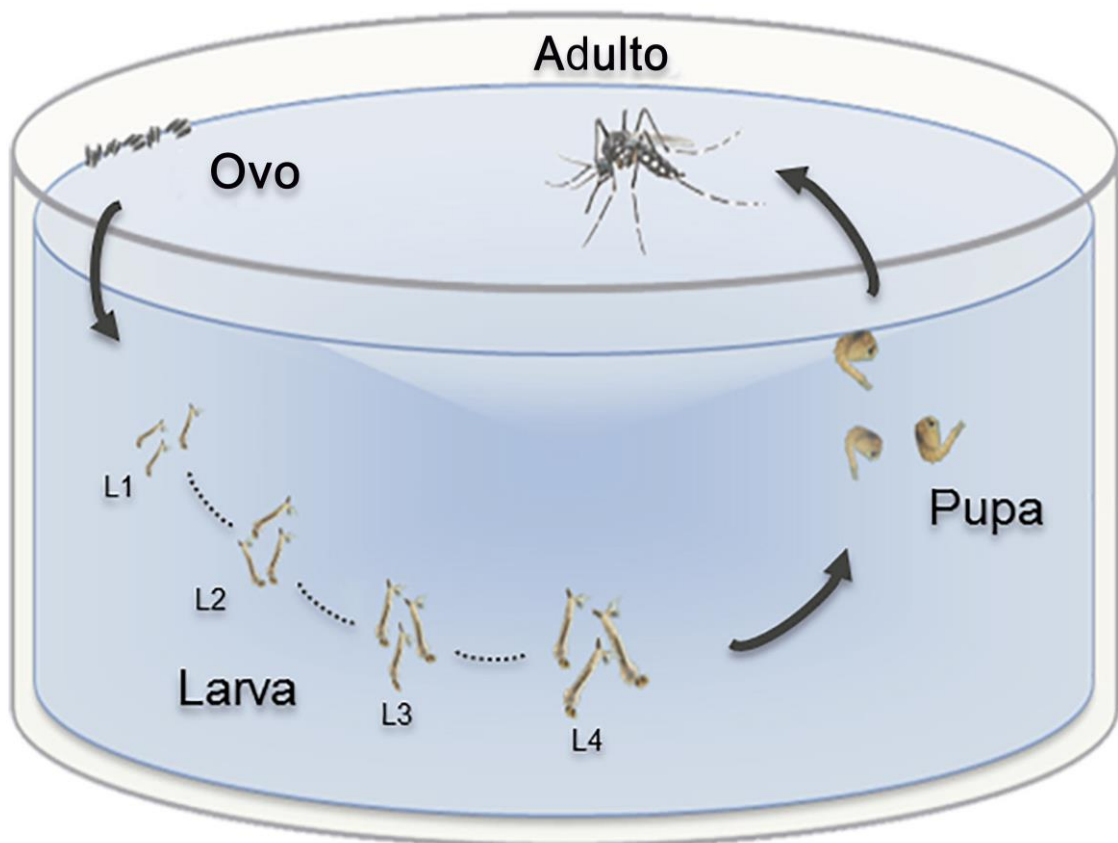


Figura 1. Representação do ciclo biológico de um mosquito. Aqui é representado o ciclo biológico no mosquito do gênero *Aedes* (CHOUIN-CARNEIRO; SANTOS, 2017). Os mosquitos passam pelo estágio de ovo, larva (L1, L2, L3, L4), pupa e adulto. O ovo, larva e pupa se desenvolvem na água. O adulto ou imago é aquele que voa procurando o néctar das flores (ou solução açucarada) ou um hospedeiro para se alimentar com sangue.

1.2 Controle de mosquitos

No final do século XIX, a descoberta de mosquitos como vetores de patógenos causadores de doenças representou uma grande mudança na maneira de lidar com elas. Hoje, à luz do conhecimento atual, sugere-se que controle integrado de vetores (CIV) é a solução mais razoável. O CIV consiste na utilização conjunta de diferentes métodos: mecânico, químico, biológico e outras abordagens para o controle dos mosquitos (BRIGGS, 1970; WERMELINGER; FERREIRA, 2013). Também é importante ressaltar que a participação dos cidadãos é fundamental para alcançar esse controle, pois muitas vezes essas doenças estão relacionadas à falta de acesso a serviços básicos como saneamento, descarte de resíduos sólidos ou a ineficiência das ações de promoção da saúde. Outro aspecto importante é que o mosquito é

endofílico, isto é, habita nas casas da população (VALLE, 2016). O Brasil vem desenvolvendo o Programa Nacional de controle da Dengue (PNCD), que está composto por: vigilância epidemiológica, combate ao vetor, assistência aos pacientes, integração com atenção básica, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recurso humanos, legislação, sustentação político-social, acompanhamento e avaliação do PNCD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A partir da epidemia do ZIKV, o PNCD definiu estratégias como viáveis para aplicação. Essas estratégias incluem o controle ambiental do vetor, elaboração de mapas de risco, disseminação do larvicida pelo próprio mosquito (ABAD-FRANCH; ZAMORA-PEREA; LUZ, 2017). Fala-se também do uso de telas impregnadas ou não com inseticidas e o uso de repelentes para serem aplicados em situações especiais. Finalmente, é abordado o uso de novas ferramentas mas que ainda não podem ser implementadas no PNCD (VALLE, 2016). Outro aspecto importante de destacar é a participação da mídia, uma vez que consegue uma conscientização mais efetiva de uma porcentagem da população (VALLE; NACIF PIMENTA; AGUIAR, 2016).

Em relação ao controle químico, há relatos de seu uso para combater insetos na antiga civilização suméria, onde compostos à base de enxofre eram usados para controlar insetos e ácaros. Na antiga civilização chinesa utilizavam extratos de plantas para o tratamento de sementes, e compostos de arsênico e mercúrio para o tratamento dos piolhos (<https://courses.cit.cornell.edu/ipm444/lec-notes/extra/ipm-history.html>). Ao longo dos anos, para controle de populações de insetos, se chegou a utilizar compostos como nicotina, rotenona e extratos vegetais (como o de piretro), compostos derivados do enxofre, arsênico, flúor e cobre. Por exemplo, o Verde de Paris (acetoarsenito de cobre) foi amplamente utilizado principalmente na Europa até meados do século XX, em particular para o controle dos mosquitos do gênero *Anopheles* (MAJORI, 2012). Em 1874, o químico austríaco Othmar Zeidler sintetizou o Dicloro difenil tricloetano (DDT), mas apenas 65 anos depois, em 1939, o químico Paul Hermann Müller descobriu suas propriedades inseticidas (<https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>). Nessa época os inseticidas não eram muito eficazes, na maioria das vezes eram derivados de moléculas como o arsênico, que também eram venenosas para o homem. Durante quatro anos, Müller testou mais de 300 compostos e descobriu que o DDT atuava sobre diversos insetos como: besouros, piolhos, pulgas e mosquitos. Esse composto foi usado no controle da

malária, febre amarela, tifo exantemático epidêmico e outras doenças transmitidas por insetos vetores, o que lhe valeu o Nobel de medicina em 1948 (MÜLLER, 1948). No final dos anos 1960, o DDT foi essencial para a eliminação da malária nos EUA, Europa e Chile, bem como uma redução bastante expressiva em outros países da América Latina. A Academia Nacional de Ciências dos EUA estimou que o DDT teria evitado mais de 500 milhões de mortes (PRUETT, 2013). Posteriormente, o DDT experimentou um uso descontinuado devido a pressões internacionais, entre elas competência do mercado. A OMS realizou um estudo onde relata a falta de uma justificativa razoável em relação aos efeitos desse inseticida, embora sugere sua substituição por outros inseticidas (BRAGA; VALLE, 2007).

Nas décadas seguintes, houve um grande desenvolvimento do controle químico de insetos em geral, e de vetores em particular. Apesar das limitações observadas acima, o uso de inseticidas é atualmente uma das estratégias mais utilizadas para esse controle. A maioria dos inseticidas agem no sistema nervoso (COSTA et al., 2008; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015) (Figura 2). O controle pode ser aplicado a larvas (larvicidas) e também a adultos (adulticidas). Os inseticidas utilizados para o controle dos mosquitos são agrupados em diferentes classes (WHO, 2016b):

1. Organoclorados (OC): Foram os primeiros inseticidas sintéticos. O mais representativo no controle de vetores adultos foi o DDT. O DDT e a maioria dos OC atuam no sistema nervoso, nos canais de sódio dependentes de voltagem (NAV) (DAVIES et al., 2007). Outros OC, como os ciclodienos, atuam inibindo o receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) (BRAGA; VALLE, 2007), mas não são amplamente utilizados no controle de mosquitos nas Américas. Um representante dos ciclodienos é dieldrin.

2. Organofosforados (OP): Seu alvo é a enzima acetilcolinesterase (AChE), causando uma inativação irreversível dessa enzima. Aqui temos fention, fenitrotona, paration e malation (BRAGA; VALLE, 2007). No mosquito *A. aegypti*, para o controle de larvas é utilizado o temefós (Abate) (MACORIS; ANDRIGHETTI; TAKAKU, 1995) e para o controle de adultos é utilizado malation (ANDRIGHETTI et al., 2013).

3. Carbamatos (CA): A maioria desses inseticidas são derivados do ácido metilcarbâmico. Esses inseticidas agem através da inibição reversível da enzima AChE, mas através de uma reação de carbamilação reversível, onde a enzima carbamilada regenera naturalmente a sua forma ativa (FUKUTO, 1990). Como a

ligação entre o inseticida e AChE não é tão forte, pode acontecer a recuperação dos insectos. Aqui temos o carbaril e o propoxur (BRAGA; VALLE, 2007).

4. Piretróides (PI): Tem esse nome pela sua estrutura derivada do princípio ativo identificado inicialmente nos extratos de piretro, estão presentes na maioria dos inseticidas de uso doméstico atuais. Estes compostos impedem o fechamento dos NAV, paralisando assim o organismo. Neste grupo temos deltametrina e cipermetrina (DAVIES et al., 2007) que são utilizados comumente no controle de mosquitos.

5. Pirróis halogenados: O composto mais representativo neste grupo é Clorfenapir. Esse composto é um pró-inseticida, o que quer dizer que é metabolizado em um inseticida ativo depois da absorção. Este composto é um desacoplador da fosforilação oxidativa na mitocôndria, portanto bloqueia a produção do ATP. O Clorfenapir foi utilizado contra os mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex* (OXBOROUGH et al., 2010; RAGHAVENDRA et al., 2011).

6. Fenil pirazois: Atuam no receptor de GABA e nos canais de Glutamato-Cloreto, presentes no sistema nervoso central dos insectos (RAYMOND-DELPECH et al., 2005). O composto mais representativo é fipronil (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003). Recentemente, foi testado o uso da ingestão oral deste composto em bovinos para o controle de *Anopheles* (POCHÉ et al., 2017).

7. Neonicotinóides: Estes insecticidas são análogos sintéticos do alcaloide nicotina e têm sido utilizados desde 1990. Estes compostos agem através da ativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (são agonistas). Podem ser anéis heterocíclicos como imidaclopride ou compostos acíclicos como dinotefuran (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

8. Espinosinas (SP): É uma nova classe de inseticida derivado da actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa*. Podem ser naturais (espinosinas) ou sintéticos (espinosoides). Um desses compostos é spinosad, que já foi aprovado para uso em recipientes que contenham água potável (WHO, 2010). Spinosad está formado pela espinosina A e a espinosina D (HERTLEIN et al., 2010), que possuem propriedades inseticidas. O Spinosad atua no sistema nervoso, possivelmente no receptor de GABA e também nos receptores nicotínicos de acetilcolina (ORR et al., 2009; SALGADO, 1998; WATSON, 2001). Recentemente, foi relatado o uso de spinosad em cepas de *A. aegypti* resistentes a OP (temepòs), não tendo sido encontrada resistência cruzada (DOS SANTOS DIAS et al., 2017).

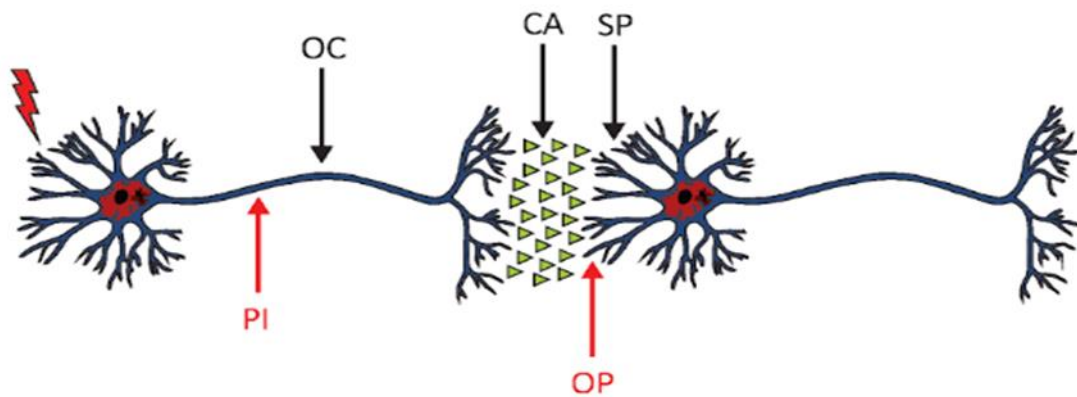


Figura 2. Neurotoxicidade dos inseticidas. A maioria dos inseticidas atuam no sistema nervoso dos insetos. OC: Organoclorados, OP: Organofosforados, CA: Carbamatos, PI: Piretróides, SP: Espinósinas. PI atuam nos canais de sódio dependentes de voltagem dos axones (NAv), alguns OC atuam nos NAv (como DDT) e outros nos receptores de GABA (como dieldrin), CA e OP atuam na acetilcolinesterase (AChE) que degrada o neurotransmissor acetilcolina (triângulos verdes), SP atuam no receptor de GABA e nos receptores nicotínicos de acetilcolina (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Muitas vezes, quando as aplicações precisam ser feitas em campo, os inseticidas são combinados com outros compostos chamados sinergistas. De fato, os PI e CA são aplicados em conjunto com o butóxido de piperonila (PBO), que por si só não tem atividade inseticida, mas quando misturado com inseticidas, aumenta a potência desses compostos. Os sinergistas agem inibindo as enzimas envolvidas na desintoxicação metabólica (WHO, 2016b), e desta forma é diminuída a quantidade de inseticida que precisa ser aplicado (VIJAYAN et al., 2007).

Além dos métodos de controle químico citados acima, baseados em compostos em sua maioria neurotóxicos, diversas estratégias têm sido propostas e utilizadas para o controle de insetos vetores, propostas a partir do conhecimento da biologia desses insetos, dentre as quais temos:

a. Controle mecânico: consiste em atividades para eliminar os criadouros, o vetor ou estratégias voltadas a diminuir o contato do mosquito com o homem (LAURA DE SENE AMÂNCIO ZARA et al., 2016). De fato, embora seja uma alternativa de baixa tecnologia, essa abordagem é uma das mais eficazes, é aquela que envolve a participação da comunidade e o controle doméstico, com eliminação dos focos. Foi central no caso de Singapura e do Brasil (BURATTINI et al., 2008; OOI; GOH; GUBLER, 2006). Também é importante nas campanhas “10 min contra a Dengue”

(<http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=96>). É importante resgatar que uma das dificuldades para este tipo de estratégia é mobilizar a comunidade.

b. Reguladores de crescimento de insetos (IGRs) : São compostos que interrompem o desenvolvimento do inseto, impedindo-o de atingir a maturidade, interferindo no processo de muda ou metamorfose (SIDDALL, 1976). Entre os cientistas que estudaram a metamorfose dos insetos temos Vincent Brian Wigglesworth e Carrol Williams. O primeiro descobriu o hormônio juvenil (HJ) e o segundo apontou o potencial dos análogos de hormônios como inseticidas (WILLIAMS, 1967). Os IGRs podem ser classificados em dois grupos: 1) os análogos e inibidores de HJ e de ecdisona: metopreno, hidropreno, fenoxycarb e piriproxifeno e 2) os inibidores de síntese de quitina: diflubenzuron e novaluron, derivados da Benzoilureia. Os IGRs são usados atualmente para o controle de larvas de mosquitos (WHO, 2005). No Brasil os IGRs são utilizados a partir de 2009.

c. Controle biológico: que inclui o uso de predadores, parasitóides e patógenos. Entre os predadores temos o peixe *Gambusia affinis*, os mosquitos *Toxorhynchites*, cujas larvas são predadoras, e também copépodos como *Mesocyclops* e *Macrocyclus*. Entre os patógenos temos *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti) e *Lysinibacillus sphaericus*, nemátodeos mermithídeos como *Romanomermis*, e os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium sp* (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017).

d. Bactéria Wolbachia: Uma estratégia diferente envolve o uso de uma alfa-proteobactéria endossimbiótica chamada Wolbachia como uma ferramenta de controle biológico não do mosquito, mas de sua competência vetorial. A infecção por esta bactéria nos mosquitos pode levar a várias mudanças fenotípicas que reduzem ou bloqueiam a transmissão de parasitos e arbovírus, incluindo o DENV, CHIKV, ZIKV, e Mayaro (DUTRA et al., 2016; MOREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2018). Uma iniciativa chamada World Mosquito Program (WMP) usando esta bactéria está sendo desenvolvida em vários países. Por exemplo, mosquitos infectados com Wolbachia foram liberados no Brasil para avaliar a aplicabilidade desta metodologia em campo (<http://www.eliminatedengue.com/brasil>). O projeto ainda está em andamento e, no futuro, pode ser uma ferramenta importante.

e. Técnica de insetos estéreis e mosquitos transgênicos: Outras formas de controle também estão disponíveis, como a técnica de inseto estéril (SIT), onde por

irradiação ou produtos químicos os machos são esterilizados e liberados para se reproduzirem com as fêmeas selvagens (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016; HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017). A SIT tem sido usada no controle de moscas da família Tephritidae, mas esta abordagem tem uso limitado com mosquitos, embora alguns autores tenham sugerido retomar as investigações de sua aplicação (BLACK; ALPHEY; JAMES, 2011; HENDRICHS et al., 2002). Recentemente foram desenvolvidos mosquitos transgênicos como um método alternativo para esterilizar machos, com uma técnica nomeada “libertação de insetos com um letal dominante” (RIDL: Release of Insects carrying a Dominant Lethal) (THOMAS et al., 2000) . Esses insetos possuem um gene letal dominante em seu genoma, que será transmitido para a progênie e será expresso em heterozigose. Para que esses insetos possam atingir a idade adulta, o gene letal é reprimido pelo antibiótico tetraciclina (ALPHEY et al., 2013; THOMAS et al., 2000).

1.3 Mecanismos de resistência a inseticidas.

A ação de diferentes inseticidas químicos ao longo do tempo tem sido acompanhada pela seleção de populações resistentes a inseticidas. A resistência é definida como um traço hereditário de uma população de insetos que conduz a tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, seria letal para indivíduos susceptíveis da mesma espécie (BEATY; MARQUARDT, 1996). Como mencionado acima, é um fenômeno adaptativo baseado na seleção natural. A resistência, principalmente aos inseticidas das classes OC, OP, CA e PI, pode ser atribuída a quatro diferentes tipos de mecanismos (Figura 3):

1.3.1. Detoxificação do inseticida por enzimas (Resistência metabólica)

A resistência metabólica é o resultado do aumento da expressão de genes que codificam enzimas que metabolizam xenobióticos (HEMINGWAY; RANSON, 2000; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007).

O processo de detoxificação consiste na transformação de compostos lipossolúveis em compostos mais solúveis em água ou metabólitos fáceis de eliminar. Este processo é dividido em duas fases: Fase I (Fase Primária), onde a estrutura da toxina é modificada pelas enzimas. Aqui temos duas famílias principais de enzimas, as monoxigenases (como os citocromo P450 monoxigenases) e as esterases; a Fase II (Fase Secundária), consiste na conjugação de produtos da fase I a compostos que

auxiliam na excreção ou neutralização da molécula tóxica (BERENBAUM; JOHNSON, 2015), que envolvem enzimas como a glutathione-S-transferase (GST).

1.3.2. Diminuição da sensibilidade do sítio de ação do inseticida (Resistência pela alteração no sítio alvo)

Podem ocorrer mudanças na estrutura do alvo molecular do inseticida através da substituição de aminoácidos na estrutura primária da proteína, que pode levar ao desenvolvimento de resistência. O caso mais estudado em mosquitos é a mutação no NaV, sítio alvo do DDT e PI. Essa resistência é conhecida como resistência Knockdown, devido a uma mutação *kdr* (k: Knock, down:d, r: resistência) (MARTINS; VALLE, 2012). No Brasil, estudos mostraram resistência a PI associadas ao NaV, tendo sido demonstrado que o fenótipo é devido a duas mutações pontuais: Val1016Ile (no segmento 6 do domínio II do canal de sódio) e Phe1534Cys (no segmento 6 do domínio III do mesmo canal) (BRITO *et al.*, 2013; LINSS *et al.*, 2014).

Outros tipos de alterações de sítio alvo têm sido identificadas, como aquelas encontradas em mosquitos do gênero *Anopheles*, como a mutação *ace1* na AChE que confere resistência a CA e OP (ESSANDOH; YAWSON; WEETMAN, 2013) e a mutação *rdl* (r: resistência, dl: dieldrin) no receptor do GABA (DU *et al.*, 2005).

1.3.3. Resistência comportamental

Cada inseto tem um hábito particular, enquanto alguns têm hábitos diurnos, outros têm hábitos noturnos. Conhecer seus hábitos é importante para implementar um controle mais efetivo. Porém, esses hábitos podem mudar após a aplicação de uma substância tóxica. Alguns estudos descrevem mudanças no comportamento de mosquitos do gênero *Anopheles* após a distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração (Long Lasting Insecticidal Nets, LLIN), chegando-se a alimentar durante o dia em vez de picar à noite, o que é habitual (MOIROUX *et al.*, 2012; SOUGOUFARA *et al.*, 2014). Essa mudança de comportamento colocaria em risco a eficácia de ferramentas como LLINs (SOKHNA; NDIATH; ROGIER, 2013), que é uma das estratégias mais bem sucedidas para o controle da malária.

1.3.4. Diminuição da taxa de penetração do composto através da cutícula.

Provavelmente seja o mecanismo de resistência menos conhecido. Alguns insetos apresentam cutículas mais espessas que atuam reduzindo a penetração de

inseticidas. Nas larvas de *Culex tarsalis* foi avaliado a penetração do paration pela cutícula, onde foram observadas diferenças entre as populações resistentes e suscetíveis (APPERSON; GEORGHIOU, 1975). Alguns estudos mostraram uma relação entre a espessura da cutícula e a resistência a PI no mosquito *A. funestus* (WOOD *et al.*, 2010), conclusão que foi reforçada por outros estudos onde uma análise microscópica mostrou que a cutícula da cepa resistente tinha maior espessura que na cepa susceptível de *A. gambiae* (YAHOUÉDO *et al.*, 2017). Também um estudo de transcriptômica comparativa identificou diferença na composição de proteínas cuticulares de uma cepa susceptível e uma cepa resistente de *A. gambiae* (BONIZZONI *et al.*, 2012).

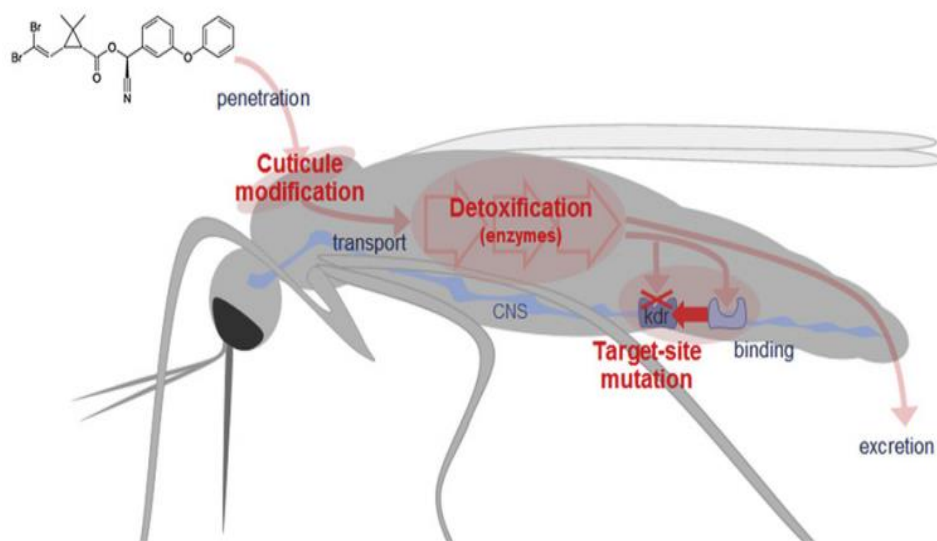


Figura 3. Mecanismos de resistencia nos mosquitos (NKYA *et al.*, 2013). Representação de um mosquito mostrando os quatro tipos principais de resistencia a inseticidas: metabólica (detoxificação do inseticida), mutação no sitio alvo, a modificação da cutícula (que pode reduzir a penetração de piretróides, como é mostrado no gráfico) e a mudança de comportamento.

1.4 Hematofagia

O uso do sangue como alimento é característico dos mosquitos e determina sua capacidade de transmitir patógenos. As fêmeas adultas consomem grandes quantidades de sangue dos vertebrados e as usam esse para sua reprodução, permitindo o desenvolvimento de ovários e ovos (LEHANE, 2005). Os ovos de insetos são majoritariamente compostos pelas proteínas de vitelo (vitelogeninas ou vitelinas), cuja síntese é regulada pelo HJ e ecdisona, produzidas em resposta ao repasto sanguíneo (LEHANE, 2005; RAIKHEL *et al.*, 2002). Nos mosquitos este processo de sincronização da ingestão de sangue e desenvolvimento dos ovos é denominado concordância gonotrófica, neste caso na condição de anautogenia. No caso do desenvolvimento de ovos em mosquitos que não foram alimentados com sangue, o processo é dominado de autogenia.

O volume proporcionalmente grande de sangue ingerido pelos insetos hematófagos é consequência da necessidade de minimizar o número de visitas ao hospedeiro vertebrado, que constituem um alto risco, uma vez que os mamíferos são muito maiores do que os insetos. O sangue é um alimento muito rico em proteínas (constituem mais de 85% do peso seco do sangue), portanto a hematofagia envolve uma dieta hiperproteica, onde a digestão do sangue gera altas concentrações de aminoácidos. Além disso, nestos insetos existe um eficiente sistema excretor.

No hemíptero *Rhodnius prolixus* foi observado que as enzimas de degradação da tirosina mostravam-se superexpressas, o que levou a postular que estas deveriam estar desempenhando um papel importante nesses insetos (RIBEIRO *et al.*, 2014). Mas tarde, foram feitos ensaios de silenciamento gênico para os genes das enzimas envolvidas na degradação desse aminoácido, tendo sido encontrado que o silenciamento da tirosina aminotransferase (TAT) ou da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) causavam a morte do inseto após serem alimentados com sangue. Posteriormente, foram testados inibidores químicos da HPPD em *R. prolixus*, *A. aegypti* e *Rhipicephalus microplus*, tendo efeitos similares que o silenciamento (STERKEL *et al.*, 2016). Portanto, nos artrópodes hematófagos, quando a degradação da tirosina é inibida ou bloqueada, o aminoácido pode atingir níveis que são tóxicos.

1.5 Degradação da tirosina em humanos e plantas

A tirosina pode ser obtida a partir da hidrólise de proteínas da dieta ou também através da hidroxilação da fenilalanina, sendo portanto um aminoácido semi-essencial (BRUNET, 1961) (Figura 4).

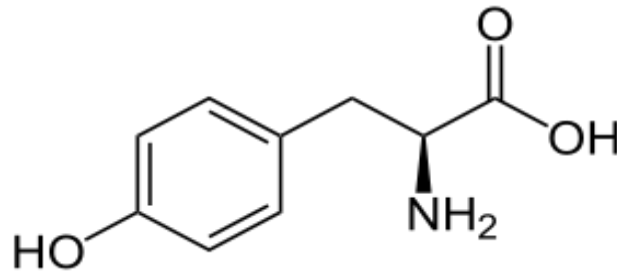


Figura 4. Estrutura química da L-tirosina. A tirosina apresenta uma cadeia lateral cíclica aromática, portanto é relativamente apolar.

A tirosina é um precursor para a biossíntese de catecolaminas (epinefrina, norepinefrina, dopamina, L-dopa) e melaninas. Além desses metabólitos, a tirosina tem dois destinos principais: síntese proteica ou degradação a fumarato e acetoacetato (LOCK; RANGANATH; TIMMIS, 2014). A degradação da tirosina tem sido mais estudada em humanos e em plantas. No primeiro caso, motivado pela existência de doenças genéticas envolvendo essa via e, no outro, a maioria dos estudos esteve associada ao desenvolvimento de herbicidas.

1.5.1. Degradação da tirosina em humanos.

Em humanos, a tirosina é metabolizada principalmente nos hepatócitos e nos rins. A deficiência de algumas enzimas dessa via leva ao acúmulo desse aminoácido e outros metabólitos no sangue, tecidos, líquido encefalorraquidiano e urina. Como a tirosina é um intermediário do metabolismo da fenilalanina, muitos autores frequentemente a denominam via da tirosina/fenilalanina. Primeiro, a fenilalanina é hidroxilada em tirosina pela fenilalanina hidroxilase (PAH), cuja deficiência causa uma doença chamada fenilcetonúria (LOCK; RANGANATH; TIMMIS, 2014).

A degradação da tirosina envolve cinco enzimas (LOCK; RANGANATH; TIMMIS, 2014; SANTRA; BAUMANN, 2008) (Figura 5):

- ❖ tirosina aminotransferase (TAT). Defeito desta enzima origina tirosinemia tipo II (tirosinemia oculocutânea ou síndrome de Richner Hanhart, TH-II).

- ❖ 4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD). Permite a conversão de 4-hidroxifenilpiruvato em homogentisato. Defeito desta enzima origina tirosinemia tipo III (TH-III)
- ❖ Homogentisato 1,2-dioxigenase (HgD). Defeito desta enzima origina Alcaptonúria.
- ❖ Maleilacetoacetato isomerase (MAAI). É a única enzima desta via que não está associada com nenhuma doença humana.
- ❖ Fumarilacetoacetato hidrolase ou fumarilacetoacetase (FAH). Participe no último passo, formando acetoacetato e fumarato. Defeito desta enzima origina tirosinemia tipo I (tirosinemia hepatorenal, TH-I), que possui um quadro clínico mais grave.

Os produtos finais da via da degradação da tirosina, acetoacetato e fumarato, entram no ciclo dos ácidos tricarboxílicos para produção de energia.

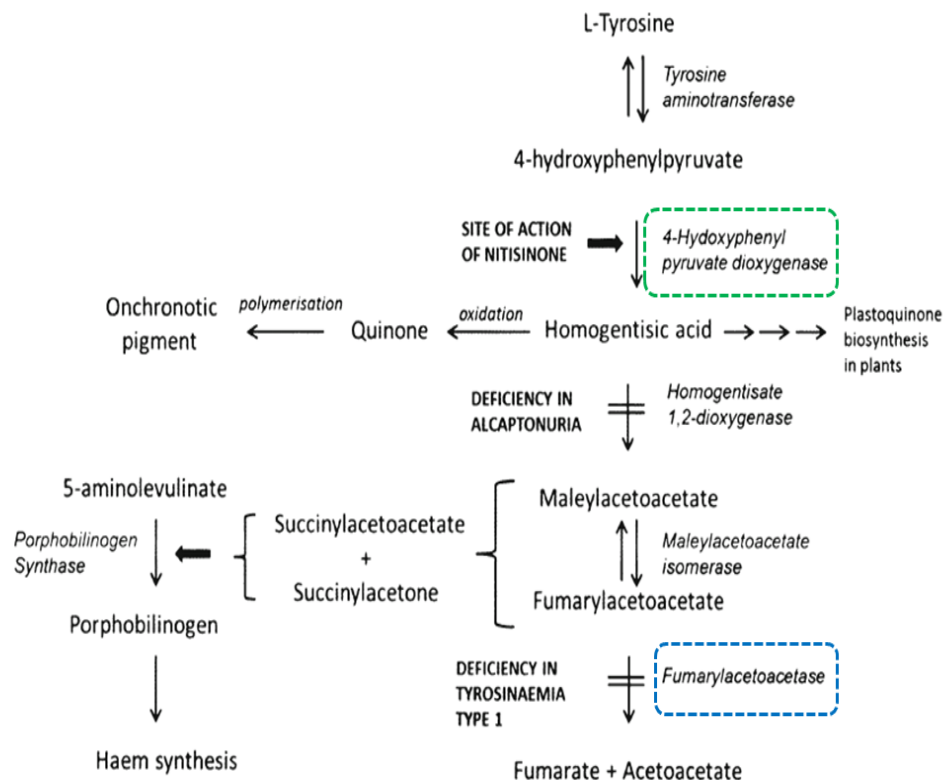


Figura 5. Via da degradação de tirosina em humanos (LOCK; RANGANATH; TIMMIS, 2014). A degradação da tirosina em humanos envolve 5 enzimas: TAT, HPPD, HgD, MAAI, FAH. Uma das doenças associadas a esta via é a tirosinemia tipo I (TH-I), causada pela deficiência de FAH (caixa azul). Para o tratamento desta doença é usada nitisinona (NTBC) que atua na enzima HPPD (caixa verde).

Os quadros clínicos relacionados às altas concentrações plasmáticas de tirosina são chamados de tirosinemias. Estas doenças podem ser de 3 tipos, como descrito acima, embora, alguns autores também falem de uma tirosinemia transitória. A doença de maior incidência é a TH-I. Neste tipo de tirosinemia há também o acúmulo de metabólitos como o fumarilacetoacetato e o maleilacetoacetato. Eles serão transformados em succinilacetoacetato e succinilacetona (SA), que é tóxico em altas concentrações (LINDBLAD; LINDSTEDT; STEEN, 1977).

As pessoas afetadas pela TH-I apresentam crise neurológicas semelhante à de pacientes com porfiria aguda intermitente, uma vez que a SA inibirá a ácido δ -aminolevulinico desidratase (ALAD), uma das enzimas da síntese do heme (CARDOSO *et al.*, 2017; SASSA; KAPPAS, 1983). No túbulo renal de ratos a SA também pode inibir o transporte de glicose e aminoácidos (ROTH *et al.*, 1985).

1.5.2. Degradação da tirosina em plantas

Foi demonstrado que a via da degradação da tirosina em mamíferos também existe em plantas, como *Arabidopsis thaliana* (DIXON; EDWARDS, 2006). Portanto, a tirosina também pode ser catabolizada por TAT, HPPD, HgD, MAAI e FAH para formar acetoacetato e fumarato (HILDEBRANDT *et al.*, 2015).

Mas, nas plantas o homogentisato pode seguir um caminho alternativo, atuando como precursor da plastoquinona (PQ) e tocoferóis, que são essenciais para a sobrevivência da planta (FIEDLER; SOLL; SCHULTZ, 1982) (Figura 6). Por isso, inibidores da HPPD são amplamente utilizados como herbicidas.

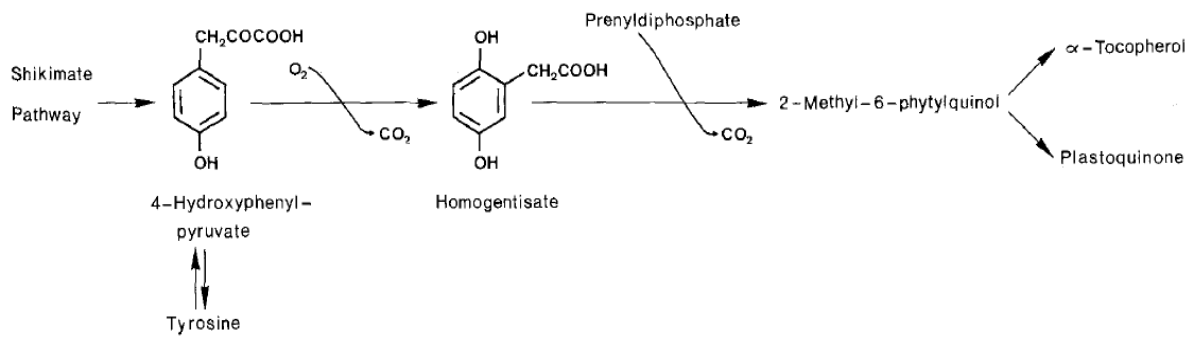


Figura 6. Via metabólica da tirosina em plantas. O homogentisato, um intermediário da degradação da tirosina, é um precursor dos tocoferóis e da plastoquinona (PQ). A PQ é um importante cofator para a biossíntese de carotenóides (FIEDLER; SOLL; SCHULTZ, 1982).

Nos inícios do estudo dos inibidores da HPPD, não se sabia como eles exerciam seu efeito sobre as plantas, apenas sabia-se que produziam branqueamento nas folhas, sendo proposto que estariam agindo como outros chamados "herbicidas de branqueamento" dessa época, por exemplo, o norflurazon, que inibe a enzima fitoeno desaturase (PDS), importante na biossíntese de carotenoides (CHAE et al., 2004; SANDMANN; LINDEN; BÖGER, 1989). As PQ são moléculas que intervêm no transporte de elétrons na fase clara da fotossíntese (Fase fotoquímica ou reação de Hill), mas a PQ também é um cofator crítico para a enzima PDS. Portanto, se HPPD é inibido, não há PQ suficiente, o que leva à depleção de carotenoides e produz o típico efeito de clareamento (Figura 7).

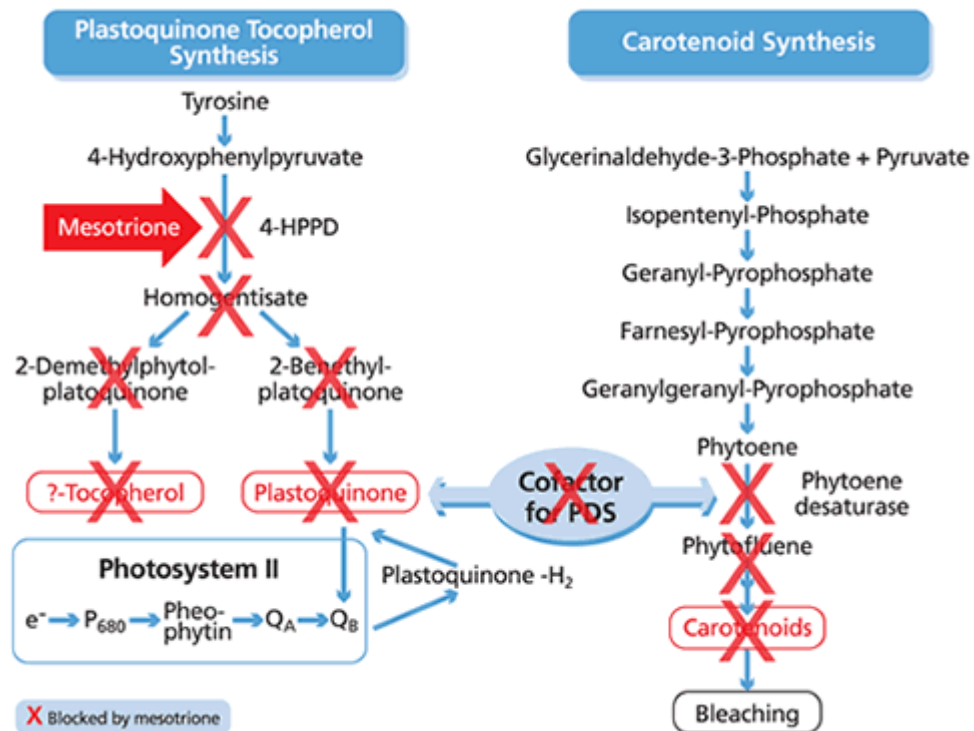


Figura 7. Efeito dos inibidores da HPPD no metabolismo da tirosina em plantas. Neste gráfico é representado que o metabolismo da tirosina permite a síntese de tocoferóis e plastoquinona (PQ). A PQ é um cofator da fitoeno desaturase (PDS), enzima importante na biossíntese de carotenoides. Se a 4-HPPD (ou HPPD) é inibida pela Mesotrione (MES), se bloqueia a produção de PQ e, portanto, a produção de carotenoides, o que produzirá um branqueamento nas plantas.

(<http://www.greencastonline.com/tenacityherbicide/golf/about-activeingredient.html>)

1.6 Inibidores da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD)

Os inibidores da HPPD são classificados em três famílias: tricetonas, isoxazóis e pirazolonas (HIRAI; UCHIDA; OHNO, 2002; VAN ALMSICK, 2009).

1.6.1. Tricetonas (Benzoil- ciclohexanodionas)

Estes são os inibidores da HPPD mais estudados até o momento. As tricetonas são caracterizadas pela presença de três grupos cetônicos ligados a um anel ciclohexano (BEAUDEGNIES et al., 2009; MITCHELL et al., 2001). Dois eventos foram críticos para a descoberta destes herbicidas: O primeiro foi a descoberta da ação herbicida dessas moléculas em 1977, atribuída a Reed Gray, da empresa Zeneca Agrochemicals (atual Syngenta), com base na observação de que poucas plantas cresceram em torno do arbusto *Callistemon citrinus* (Família Myrtaceae), o que levou a identificação da Leptospermona, que é um alcaloide de tipo β -tricetona (KNUDSEN, 2000) (Figura 8). O segundo evento ocorreu em 1982, quando cientistas da Zeneca Agrochemicals estavam procurando inibidores da Acetil-CoA carboxilase (ACC), particularmente que fossem análogos de sethoxydim. Essa procura os levou a identificar compostos da mesma estrutura química que a leptospermona (MITCHELL et al., 2001). Posteriormente, foi estabelecido um programa, liderado por David Lee (Zeneca Agrochemicals), para sintetizar compostos análogos a leptospermona.

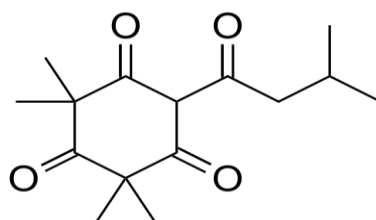


Figura 8. Estrutura química da leptospermona. Composto presente na planta *Callistemon citrinus*. Leptospermona é um inibidor natural da HPPD. No princípio foi identificado como um composto alelopático, ou seja, um composto que influencia na sobrevivência e crescimento de outro organismo.

Um análogo sintético de leptospermona é a mesotriona (MES), até o momento o herbicida mais utilizado do tipo inibidor de HPPD. A MES participa de uma inibição competitiva da HPPD e foi desenvolvido pelos químicos da Syngenta no ano de 2001 (MITCHELL et al., 2001) (Figura 9). É conhecida no mercado pelas marcas Callisto® e Tenacity®. Pode ser usado para o controle pré e pós-emergência de muitas ervas daninhas de folhas largas e de gramíneas. O composto é absorvido pelas raízes e

transportado pelo xilema e floema. Neste grupo de herbicidas da família das tricetonas também temos a sulcotriona, tembotrione e a tefuritrione.

Aqui também se tem um composto químico chamado Benzobicyclon, embora não seja uma tricetona típica, originou-se de substituições de uma benzoil-ciclohexanodiona (KOMATSUBARA et al., 2009). Outros autores consideram este herbicida em um grupo separado (ANTONENKO et al., 2015).

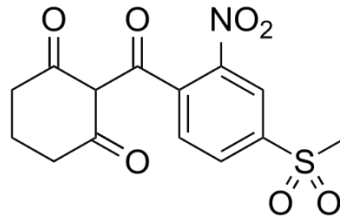


Figura 9. Estrutura química da mesotriona (MES). É um inibidor químico da HPPD, atualmente comercializada como herbicida. Apresenta o grupo SO_2 .

Outro análogo sintético é a nitisinona (NTBC) (Figura 10), que foi inicialmente desenvolvida como herbicida, com poucos resultados. Posteriormente ao realizar um teste de toxicidade de NTBC em camundongos, observou-se aumento dos níveis de tirosina no sangue, e de 4-hidroxifenilpiruvato e 4-hidroxifenillactato na urina (ELLIS et al., 1995). Isso levou à conclusão de que em mamíferos o efeito do NTBC estava associado ao metabolismo da tirosina e que o sítio alvo era HPPD. O NTBC é um inibidor competitivo da HPPD (LOCK; RANGANATH; TIMMIS, 2014). Atualmente, NTBC é usado como medicamento no tratamento da TH-I (LINDSTEDT, HOLME E, LOCK EA, HJALMARSON O, 1992; LOCK et al., 1998), que é vendido sob o nome de Orfadin pela empresa Swedish Orphan Biovitrum (Sobi). Também foi sugerido o uso do NTBC para o tratamento da alcaptonúria, uma vez que induz redução dos níveis de ácido homogentísico de até 95% (INTRONE et al., 2011; SUWANNARAT et al., 2005).

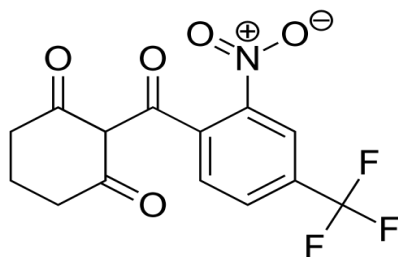


Figura 10. Estrutura química da Nitisinona (NTBC). É um inibidor químico da HPPD. É utilizada como medicamento para o tratamento da tirosinemia tipo I (TH-I). Como pode ser visto nos gráficos, a NTBC difere da MES em apenas um grupo trifluorometil.

O NTBC também foi testado em camundongos que apresentam albinismo ocular cutâneo (OCA), caracterizados por um defeito genético na enzima tirosinase, responsável pela oxidação de fenóis na produção de pigmentos como a melanina. Os camundongos que receberam NTBC mostraram um aumento na pigmentação da íris (ONOJAFE et al., 2011).

1.6.2. Isoxazóis

São uma classe de compostos heterocíclicos (Figura 11) cujo estudo como herbicidas iniciou-se entre os anos 80 e 90, liderado pela empresa francesa Rhone-Poulenc (PALLETT et al., 2001). Ao princípio estavam procurando inibidores da hidroximetilglutarilcoenzima A (HMGC_oA) redutase (SANTUCCI et al., 2017), a primeira enzima na via de síntese do colesterol.

O composto representativo é o isoxaflutole (IFT). Este composto é considerado um pró-herbicida, por não ser biologicamente ativo, mas quando atinge o solo ou a planta, quebra-se o anel de isoxazol formando dicetonitrila (DKN) (PALLETT et al., 1998), que é a molécula que inibe a HPPD, depois decaindo para ácido benzóico (GARCIA; JOB; MATRINGE, 2000; PALLETT et al., 2001) (Figura 12). O DKN é um inibidor competitivo da HPPD (GARCIA; JOB; MATRINGE, 2000).

Também é relatado que em raízes de plantas daninhas a absorção de IFT é maior que DKN, o que significa que o IFT é a molécula de entrega apropriada (PALLETT et al., 2001). Atualmente, o IFT é usado para controlar gramíneas e outras ervas daninhas presentes nos cultivos de milho e cana-de-açúcar (BELTRÁN et al., 2003).

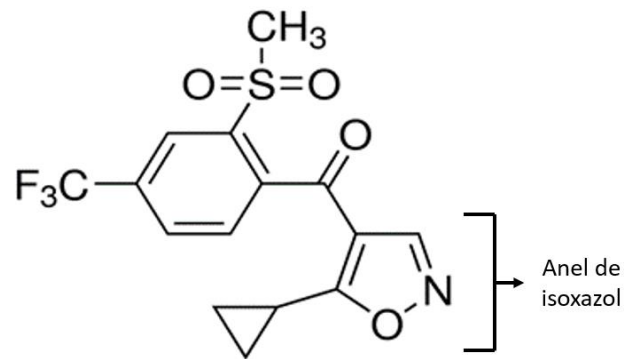


Figura 11. Estrutura química do isoxaflutole (IFT). É um inibidor químico da HPPD. Pode-se ver o anel de isoxazol.

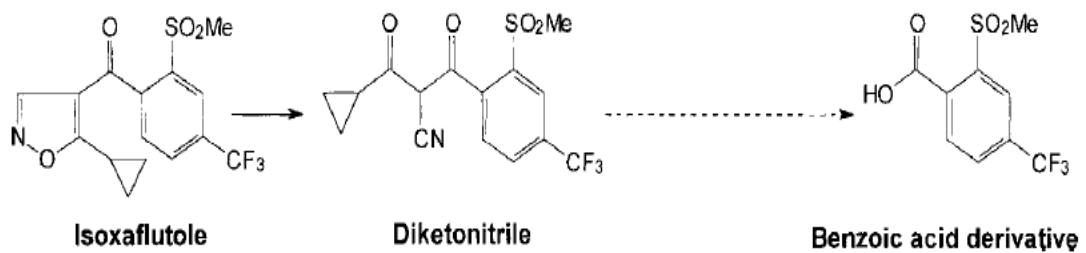


Figura 12. O isoxaflutole (IFT) se ativa a dicetonitrila (DKN), inibidor da HPPD (PALLET et al., 2001). O IFT irá atingir o solo ou raízes das plantas, em seguida, o anel de isoxazol é quebrado, formando a dicetonitrila (DKN). Subsequentemente, a dicetonitrila (DKN) é inativado no derivado do ácido benzoico.

1.6.3. Pirazolonas (Benzoil pirazóis)

São compostos heterocíclicos que contém dois átomos de nitrogênio adjacentes (Figura 13). A origem desta família de inibidores está associada à produção de arroz, especialmente no Japão. O primeiro composto desta classe, o pirazolinato, foi desenvolvido durante os anos 70 e 80 pela empresa Sankyo (AHRENS et al., 2013), e foi mostrado que causa inibição da síntese de carotenóides nas plantas através da inibição da HPPD (MATSUMOTO et al., 2002). Posteriormente, outras moléculas foram desenvolvidas, como pirazoxifen e benzofenap (AHRENS et al., 2013).

De acordo com alguns estudos, na família das pirazolonas temos o mais potente inibidor de HPPD em plantas, tropamezona, que foi introduzido em 2006 para o controle de dicotiledôneas e gramíneas no cultivo de milho (GROSSMAN; EHRHARDT, 2007).

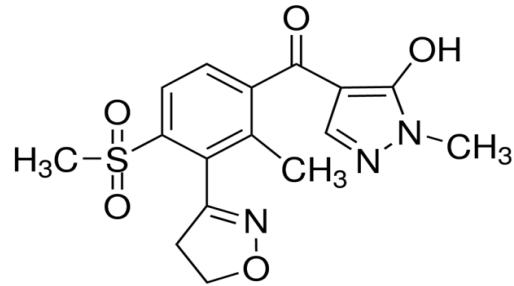


Figura 13. Estrutura química da tropamezona. É um inibidor químico da HPPD. Na sua estrutura pode-se ver os dois átomos de nitrogênio adjacentes, característicos deste grupo.

1.7. Degradação da tirosina em artrópodes hematófagos

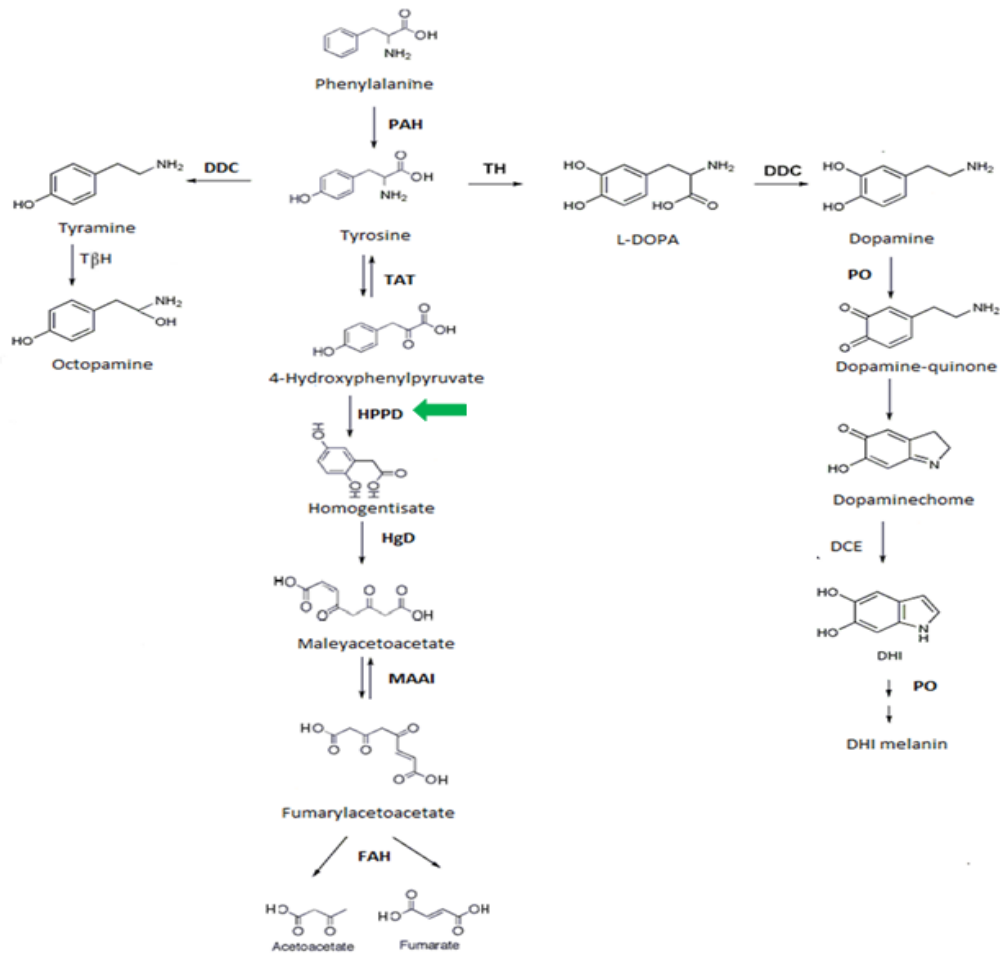


Figura 14. A via da degradação da tirosina em insetos (STERKEL et al., 2016). A tirosina pode-se originar da dieta ou da fenilalanina. A degradação da tirosina é realizada por 5 enzimas: TAT, HPPD, HgD, MAAI, FAH. As enzimas das rotas alternas do metabolismo deste aminoácido são: DDC, L-DOPA descarboxilase; TH:tirosina hidroxilase; PO, fenoxidase; DCE, dopacrome conversão enzima; TβH, tiramina β-hidroxilase. Metabolitos das rotas alternas: L-DOPA, L-3,4-dihidroxifenilalanina; DHI, 5,6-dihidroxiindole. A seta verde está indicando a segunda enzima da degradação da tirosina, alvo dos inibidores da HPPD.

A via de degradação da tirosina é altamente conservada, de modo que a busca por ortólogos levou à identificação de todos os genes que codificam as enzimas de degradação da tirosina no inseto *R. prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) (MESQUITA et al., 2015) (Figura 14). Significativamente, observou-se que muitos desses genes apareciam superexpressos no aparelho digestivo (RIBEIRO et al., 2014).

Posteriormente, cada um dos genes que codificam as enzimas de degradação da tirosina foi silenciado, e verificou-se que a TAT e HPPD produziram morte nos insetos após um repasto sanguíneo (STERKEL et al., 2016). Em seguida, avaliou-se o efeito dos inibidores da HPPD na sobrevivência de diferentes artrópodes. Um desses inibidores, a MES, foi letal para diversas espécies de insetos hematófagos; mas não foi letal para insetos não hematófagos ou mosquitos alimentados apenas com solução açucarada (STERKEL et al., 2016). Esses dados levaram a propôr que a capacidade de degradar grandes quantidades de tirosina da dieta é um traço essencial dos insetos que se alimentam de sangue, contribuindo para adapta-los a hematofagia (Figura 15).

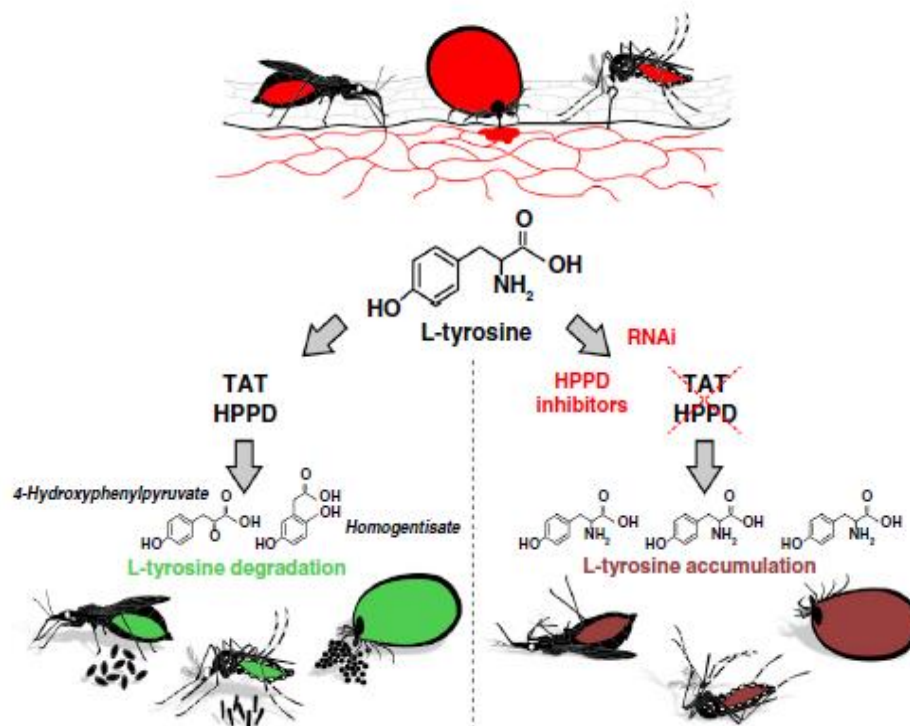


Figura 15. A importância da degradação da tirosina em artrópodes hematófagos (KOPÁČEK; PERNER, 2016). Artrópodes hematófagos como *R. prolixus*, *A. aegypti* e *Rhipicephalus microplus* tem uma dieta rica em proteínas, que ao ser degradadas vão originar uma grande quantidade de aminoácidos. A degradação da tirosina é uma característica essencial em estos artrópodes (letras verdes), mas quando é silenciada ou inibida as duas primeiras enzimas desta via (letras vermelhas), TAT e HPPD, produz morte destes.

JUSTIFICATIVA

Os mosquitos são responsáveis pela transmissão de diferentes patógenos, que causam doenças que afligem a população. Por exemplo, dengue, malária e filariose são transmitidos por insetos vetores. Estas doenças não afetam apenas o sistema público de saúde, mas também afetam a economia e outros setores. Uma componente chave para reduzir o impacto dessas doenças é o controle dos mosquitos. Mas isso está seriamente ameaçado pela resistência aos inseticidas, adicionando também que uma vacina eficaz ainda não foi desenvolvida para mitigar a maioria dessas doenças.

Portanto, é muito importante a procura de novas soluções. Atualmente, a maioria dos inseticidas usados no controle de insetos na agricultura também são usados na pecuária e no controle de insetos vetores. Pensamos que o conhecimento do hábito alimentar dos insetos vetores nos permitirá entender melhor sua fisiologia e, portanto, encontrar novas formas de combatê-los. O trabalho inicial sobre a degradação da tirosina em artrópodes hematófagos abriu a possibilidade de utilização de inibidores químicos da HPPD como uma ferramenta para o controle de insetos vetores. Deve-se notar que um desses inibidores, NTBC, é consumido diariamente por pessoas que sofrem de TH-I, com efeitos colaterais modestos e observados apenas após administração crônica. Também, outro aspecto notável destes inibidores é que eles só têm efeito sobre os artrópodes que foram previamente alimentados com sangue, o que os torna muito mais seletivos e, portanto, mais amigáveis ao meio ambiente. Assim, na presente dissertação nos propusemos a investigar o efeito dos inibidores da HPPD sobre os mosquitos, a fim de avaliar seu potencial como uma nova ferramenta de controle.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- ❖ Estudar a viabilidade de inibidores de HPPD como inseticidas seletivos para insetos vetores (mosquitos).

2.2. Objetivos específicos:

- ❖ Estudar os inibidores da HPPD na sobrevivência de *Aedes aegypti*.
- ❖ Estudar os inibidores da HPPD na sobrevivência de *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles aquasalis*.
- ❖ Estudar os inibidores de HPPD na sobrevivência de populações de *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas.
- ❖ Testar e comparar diferentes formas de administração dos inibidores de HPPD.
- ❖ Avaliar o efeito da NTBC na infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus zika.

3 RESULTADOS

CAPÍTULO 1: ARTIGO EM FASE DE REDAÇÃO.

On the use of inhibitors of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase as a vector-selective insecticide in the control of mosquitoes

Marlon Alexander Vergaray Ramirez¹, Marcos Sterkel², Ademir J. Martins^{3,4,5}, José Bento P. Lima^{3,4}, Pedro L. Oliveira^{1,4}

¹Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Centro Regional de Estudios Genómicos, Universidad Nacional de La Plata (CREG-UNLP), Argentina. ³Laboratorio de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ⁴Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, RJ-Brasil. ⁵Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Brazil.

Summary

Proteins are the major component of vertebrate blood and hence, digestion of a blood meal in the gut of hematophagous insects generates extremely high concentrations of free amino acids. Previous reports showed that tyrosine degradation plays an essential role in adapting these animals to blood feeding. Inhibiting 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), the rate-limiting step of the tyrosine degradation pathway, results in the death of insects after a blood meal. Therefore, it was suggested that compounds that block the catabolism of tyrosine could act selectively on blood feeding insects. Here we have evaluated the toxicity of three HPPD inhibitors against mosquitoes. Among the compounds tested, nitisinone (NTBC) showed a lower lethal dose 50 (LD50) in *Aedes aegypti* than mesotrione (MES) or isoxaflutole (IFT). NTBC was lethal to *Aedes aegypti* in artificial feeding assays (LD50: 4.36 μ M), as well as using topical application (LD50: 0.0033 nmoles/mosquito). MES was lethal on feeding assays but not on topical application, in contrast to IFT, that was

not lethal in feeding assays but presented toxicity in topical application assays. Taken together, these results provide support for the use of HPPD inhibitors as a potential tool for mosquito control. This would represent a safer and more environmentally friendly alternative to conventional neurotoxic insecticides.

INTRODUCTION

Mosquitoes are important vectors for pathogens that cause diseases such as malaria, lymphatic filariasis, yellow fever, dengue, chikungunya, zika and West Nile fever. Mosquito-borne diseases are among the leading global public health menaces [1], and vector control by means of insecticides is a critical part of the strategies aimed to manage these diseases [2]. Long-lasting insecticidal bed nets (LLIN) and indoor residual spraying (IRS) are the two most important strategies employed for human protection against mosquitoes-borne diseases, mainly malaria [3]. Currently, six classes of insecticides are recommended for IRS: organochlorines, organophosphates, carbamates, pyrethroids, pyrroles and phenyl pyrazoles [4], all of them neurotoxic [5], and only one, the pyrethroids, are used for LLIN [3]. However, because of increasing mosquito resistance to all these insecticides, mosquito-borne diseases are on the rise [6]. This is particularly true for arboviroses transmitted by *Aedes aegypti*, exemplified by the recent global Zika outbreak [7], making the search for alternative methods of mosquito control a high priority of the global public health agenda [8].

Female mosquitoes need to feed on blood for the maturation of their eggs, a fact that allows them to spread different diseases. Since 85% of vertebrate blood dry-weight is protein [9], its digestion generates high concentrations of amino acids in the gut. Although amino acids are considered essential nutrients, many human genetic diseases are caused by defective degradation of amino acids, leading to hyperaminoacidemias and the formation of toxic metabolites [10]. In the hematophagous “kissing bug” *Rhodnius prolixus* high level of expression of enzymes related to tyrosine degradation were found in the midgut [11]. Silencing of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), the enzyme that catalyzes the second (and rate-limiting) step of the tyrosine degradation pathway, led to insect death after a blood meal. HPPD chemical inhibitors also led to the death of hematophagous

arthropods (kissing bug, mosquitoes and ticks) but were not toxic to non-hematophagous insects [12]. These results led us to propose that the degradation of free tyrosine formed in excess during digestion of a blood meal is an essential trait in the adaptation to an hematophagous way of life [9]. The key role suggested for this pathway in the evolution of blood feeding organisms, led us to identify tyrosine degradation as a potential target in the development of alternative insecticides that would therefore be selective for these animals.

Since HPPD has been identified as one of the most promising target sites for the development of new herbicides, thousands of HPPD inhibitors have been synthesized [13]. HPPD inhibitors are classified into three main chemical families: triketone, diketonitriles and pyrazolones [14,15]. The first discovered and most used of these inhibitors are triketones, that can be natural compounds such as leptospermane, or synthetic, such as mesotrione (MES), nitisinone (NTBC) and many others [16]. MES is one of the most successful HPPD inhibitors widely used as an herbicide (Callisto®, Syngenta) [17]. NTBC, on the other hand, has been approved for therapeutic use in humans to treat hereditary tyrosinemia type 1 (Orfadin®) [18] and its potential for use in patients with alkaptonuria is under investigation [19,20]. In the diketonitriles group, isoxaflutole (IFT) is also used as an herbicide (Balance® and Merlin®, Bayer) [21]. In order to test the possibility of using HPPD inhibitors as insecticides selective for disease vectors, here we aimed to investigate the toxicity of three inhibitors of HPPD (NTBC, MES and IFT) towards mosquitoes, especially against *Aedes aegypti*, evaluating different possible modes of application. We also tested toxicity to *Aedes aegypti* strains resistant to pyrethroids and organophosphates, as well as to other species of mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles aquasalis*.

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

All experiments were conducted according to the guidelines of the institutional care and use committee (Committee for Evaluation of Animals Use for Research from the Federal University of Rio de Janeiro, CAUAP-UFRJ), which is founded on NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ISBN 0-309-05377-3). The protocols used here were approved by CAUAP-UFRJ under registry #IBQM155/13.

Mosquitoes

Aedes aegypti of the Red Eye strain was maintained in the insectary of the Federal University of Rio de Janeiro (URFJ), Brazil. The resistant strains, originally collected from different Brazilian cities, were: Santarém strain (Pará state), Nova Iguaçu strain (Rio de Janeiro state), Oiapoque strain (Amapá state). These resistant strains were collected from the field by technicians from the health departments of the mentioned municipalities and shipped to the Laboratory of Physiology and Control of Arthropod Vectors (LAFICAVE), Rio de Janeiro, and kept in the insectary from FIOCRUZ-RJ. A Rock-kdr strain that presents point mutations in the voltage-dependent sodium channel associated with pyrethroid resistance was also maintained in the insectary from FIOCRUZ-RJ [22]. When these strains were used, the Rockefeller strain, which is commonly used as a standard for insecticide susceptibility was used, instead of the Red Eye Strain, in order to allow better comparison with literature data. RR50 (Reason for resistance 50) for deltamethrin of Santarém strain = 30.4, Nova Iguaçu strain = 25.4, Oiapoque strain = 144 [22–25].

The larvae were fed with powdered cat food (Friskies®, Nestlé Purina PetCare). Adult mosquitoes were kept in cages and fed with a 10% sucrose solution. All mosquitoes were reared at 28°C, in 70-80% relative humidity and a photoperiod of 12h light:12h dark.

A colony of *Anopheles aquasalis* was established in 1995 using specimens collected in the municipality of Guapimirim, Rio de Janeiro, at the insectary of FIOCRUZ-RJ. The larvae were reared on a diet of fish food (Tetra Marine Large Flakes, Tetra GmbH) in containers containing dechlorinated water and sea salt, at a concentration of 0.2 % NaCl (w/v). Adult mosquitoes were provided with 10 % sucrose

ad libitum under a regimen of photoperiod, temperature and humidity similar to that of *Aedes aegypti* strains.

Culex quinquefasciatus were reared at Instituto de Biologia do Exército (IBEX), Rio de Janeiro. The larvae were fed cat food (Friskies®, Nestlé Purina PetCare). Adults were housed in a dark room (photoperiod is reversed), because this mosquito feeds on blood at night to favor copula. Temperature and humidity were similar to the other mosquitoes.

Topical application:

NTBC, MES or IFT (Sigma Chemical Co.) were diluted in acetone just before each experiment. After feeding on blood, mosquitoes were cold-anesthetized and placed in a glass petri dish on ice. Then, a volume of 0.5 µl of the HPPD inhibitor solution was topically applied with a micropipette on the abdomen of the insect. Survival was evaluated every 24 h for a week. Controls received only acetone.

Artificial feeding:

Rabbit blood was collected with a sterile syringe containing heparin at a ratio of 1µl heparin/ml blood (heparin 5000 IU/ml). Stock solutions of HPPD inhibitors made in NaCl 0.15 M, Na-phosphate 10 mM, pH 7.0 (PBS) were diluted in PBS and mixed 1:10 with heparinized blood to obtain final concentrations used to feed to mosquitoes, as indicated under figure legends. Controls received PBS: blood (1:9). Mosquitoes of 3-5 days post-emergence were used. An artificial feeding apparatus was used where food was offered through a membrane of Parafilm M®. The temperature of the blood meal was maintained with a circulating water bath, adjusted at 37-38°C [26]. The maximum feeding time was 30 minutes. Only fully engorged mosquitoes were used. The survival was evaluated every 24 h for a week.

Survival experiments, statistical analysis

Statistical analysis and design of graphs were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). At least two independent experiments were performed for each experimental condition (each with its respective control group). The Kaplan Meier survival curve analysis in the Prisma software (the log rank test) was used to evaluate significant differences between experimental and control groups. LD50 was determined using a plot of non-linear fit for log of inhibitor vs. normalized response (Variable slope).

RESULTS

We examined three chemical inhibitors of HPPD for their effects on the survival of *Aedes aegypti* (Red Eye strain): two of them are used as herbicides (MES and IFT), and one is used in medicine for the treatment of tyrosinemia type I (NTBC). MES and NTBC are triketones while IFT belongs to the diketone nitrile family. Inhibitors from the family of pyrazoles were not evaluated.

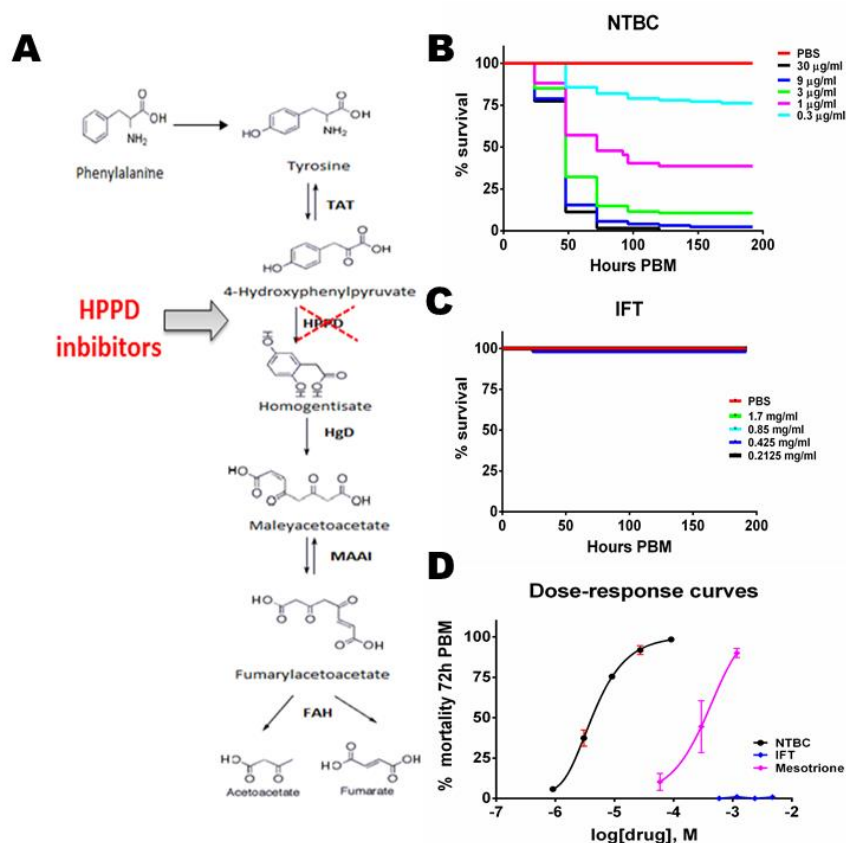


Figure 1. Ingestion of HPPD with the blood meal decrease the survival of *Aedes aegypti*. (A) Tyrosine catabolism pathways. TAT, tyrosine aminotransferase; HPPD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; HgD, homogentisate 1, 2 dioxygenase; MAAI, maleylacetoacetate isomerase; FAH, fumarylacetoacetase. (B) Survival rates of *A. aegypti* (Red eyes strain) fed with rabbit blood plus NTBC dissolved in PBS (1:10; V/V) PBM, Post-blood meal; PBS, Phosphate-buffered saline. Control group was fed with Blood plus 10% PBS (V/V). (C) Survival rates of *A. aegypti* (Red Eye strain) fed with rabbit blood plus IFT dissolved in PBS (1:10; V/V) at time 0. (D) Dose-response curves at 72 h PBM. MES data were taken from Sterkel *et al.* (2016). Panels B and C are plotted as Kaplan-Meier survival curves. 3 and 2 independent experiments were performed respectively, each with n =10–36 insects per experimental group.

The three inhibitors were administered by artificial feeding and topical application. Figure 1 shows that NTBC was the most potent of the three inhibitors in the artificial feeding trials, presenting a LD50 (the dose that kills 50% of mosquitoes) of 4.36 μM ., while MES presented a LD50 = 324 μM . IFT showed no lethal effects. Thus, NTBC was about 74 times more potent than MES when it was co-administered along with the blood meal to the mosquitoes.

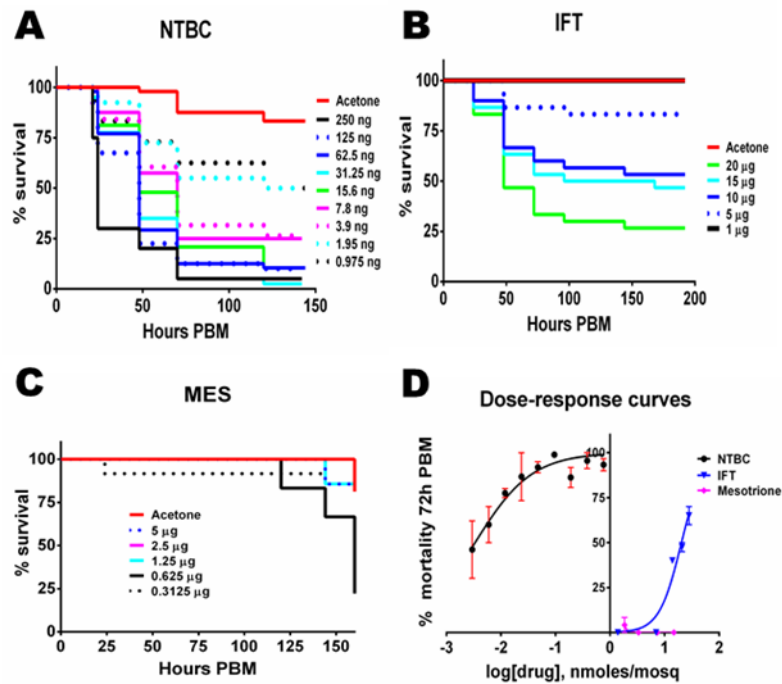


Figure 2. Topical application of HPPD inhibitors effect on survival of *A. aegypti* (Red Eye strain) after a blood meal. Topical application of (A) NTBC or (B) IFT on the abdomen causes mosquitoes death. (C) MES did not cause mosquito death. (D) Dose-response curves recorded at 72 h PBM. Panels A, B and C are plotted as Kaplan-Meier survival curves. 3 and 2 independent experiments were performed respectively, each with $n = 12-35$ insects per experimental group. The drugs (dissolved in 0.5 μl of acetone) were applied on the abdomen immediately after the blood meal (time 0 PBM). Controls received only acetone (0.5 μl).

Table 1 – Toxicity of HPPD inhibitors to *Aedes aegypti* using artificial feeding and topical application - LD50 were calculated from data in Figures 1 and 2. Data shown are mean \pm 95% Confidence Interval (CI).

Inhibitor	LD50 (95% CI)	
	Artificial feeding (μ M)	Topical application (nmol/mosq)
NTBC	4.36 (3.85-4.59)	0.0033 (0.0019-0.006)
IFT	-	20.4 (17.70-23.43)
MES	324 (193.4-543.9)	-

NTBC proved to be more potent also in the topical application trials (Figure 2), presenting a LD50 = 0.0033 nmol/insect (1.10 ng/insect). However, in contrast to the artificial feeding assay, IFT resulted to be lethal, presenting a LD50 = 20.4 nmoles/insect (7320 ng/insect). These results demonstrated that NTBC was around 6182 times more potent than IFT. On the other hand, MES did not cause mortality in mosquitoes when applied topically, indicating that this compound was not able to traverse the cuticle.

As NTBC was the most potent of the three inhibitors tested both, in artificial feeding and topical application trials (Fig. 1 and 2, Table 1), only this drug was further used in experiments with other species of mosquitoes and with *Aedes aegypti* strains resistant to organophosphorus and pyrethroid insecticides.

The effect of NTBC on other mosquito species was evaluated in trials of artificial feeding. *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles aquasalis* died when fed with blood containing concentrations of NTBC similar to those that killed *Aedes aegypti* (Red eye strain) (Fig. 3 and Table 2). These results show that NTBC can be used not only for the control of *Aedes* populations, but also for the control of other mosquitoes that transmit diseases.

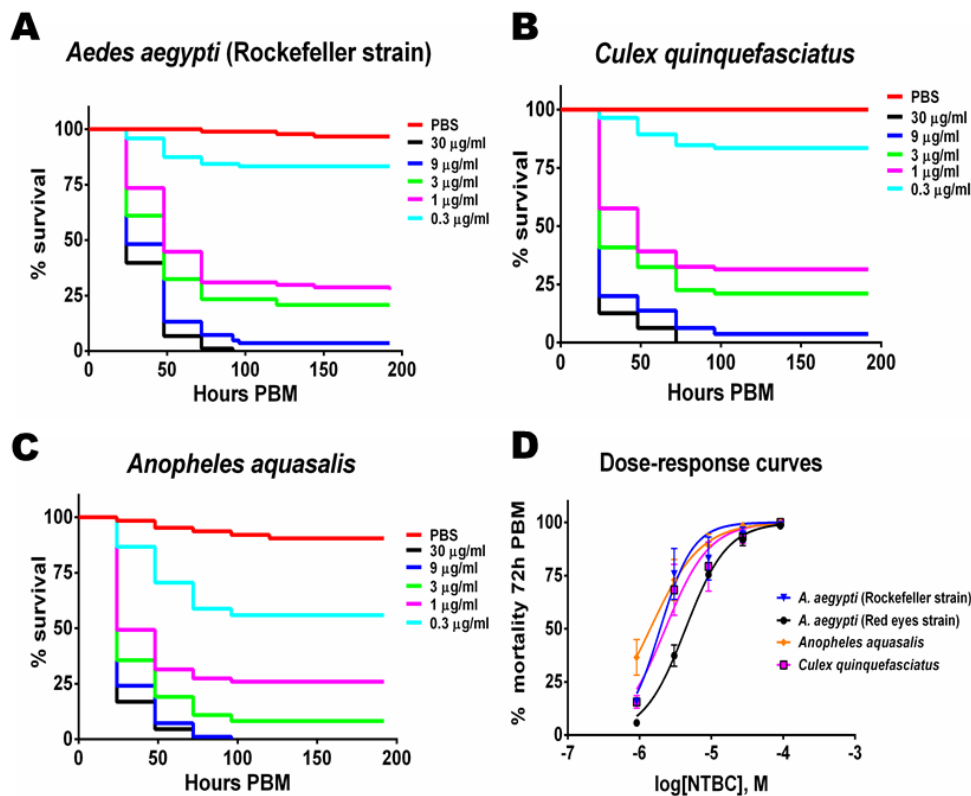


Figure 3. Ingestion of NTBC is lethal to other mosquito species.

(A) *A. aegypti* (Rockefeller strain) females were fed human blood plus NTBC. **(B)** *Culex quinquefasciatus* females were fed human blood plus NTBC. **(C)** *Anopheles aquasalis* females were fed human blood plus NTBC. **(D)** Dose-response curves at 72 h PBM. Panels A, B and C are plotted as Kaplan-Meier survival curves. 3 independent experiments were performed, each with $n = 10\text{--}37$ insects per experimental group.

Table 2 – Toxicity of NTBC to different mosquito species using artificial feeding - LD50 were calculated from data from Figure 3. Data shown are mean \pm 95% Confidence Interval (CI).

Species of mosquito	NTBC LD50 (95% CI)	
	μM	$\mu\text{g/ml}$
<i>Aedes aegypti</i> (Rockefeller strain)	1.94 (1.42-2.65)	0.64 $\mu\text{g/ml}$
<i>Culex quinquefasciatus</i>	2.28 (1.56-3.34)	0.75 $\mu\text{g/ml}$
<i>Anopheles aquasalis</i>	1.41 (1.03-1.93)	0.46 $\mu\text{g/ml}$

Next, we studied the effect of NTBC on field collected strains of *Aedes aegypti* that showed high levels of resistance to organophosphates and pyrethroids. NTBC was also tested on Rock-kdr, a Rockefeller strain of *Aedes aegypti* that presents a mutation in the voltage-dependent sodium channel, the target site of pyrethroids and organochlorines (DDT). When these strains were artificially fed with NTBC, they presented LD50 values similar to the control strain (Fig. 4 and table 3). Thus, both field strains resistant to organophosphates and pyrethroids and the Rock-Kdr strain did not show cross-resistance to NTBC when fed artificially.

Finally, topical application trials were also carried out on the resistant strains. In this case, unlike artificial feeding, there were significant differences between field collected neurotoxic-resistant strains and Rockefeller strain ($p < 0.001$). There were no significant difference between the Red eye, Rock-Kdr and Rockefeller strains (Figure 5 and table 3). These results might be explained by at least part of the resistance to neurotoxic insecticides presented by these strains being associated with cuticle thickness, since major differences were observed in NTBC LD50 during artificial feeding trials.

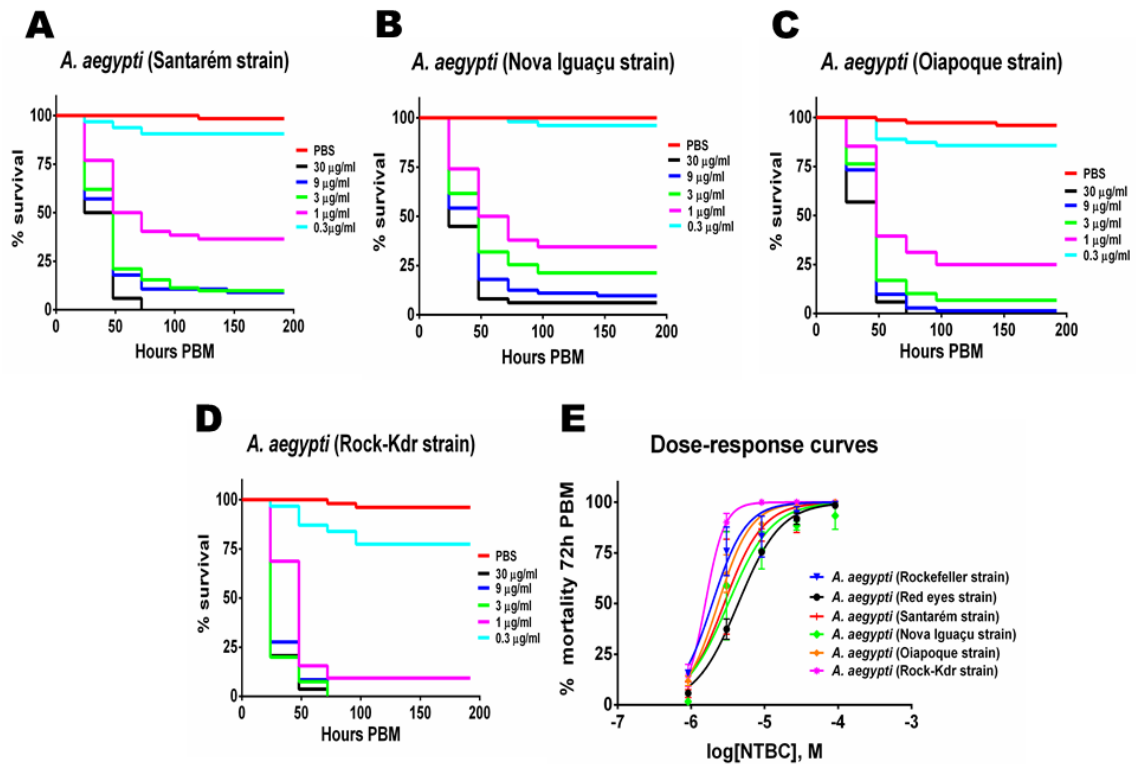


Figure 4. Insecticide-resistant *Aedes aegypti* strains do not show resistance towards NTBC ingested with a blood meal. Different *A. aegypti* strains were fed with human blood plus NTBC. **(A)** Santarém strain, **(B)** Nova Iguaçu strain, **(C)** Oiapoque strain, **(D)**, Rock-kdr strain. **(E)** Dose-response curves at 72 h PBM. Panels A-D are plotted as Kaplan-Meier survival curves. 3 (A, B, C) and 2 (D) independent experiments were performed respectively, each with n =10–35 insects per experimental group.

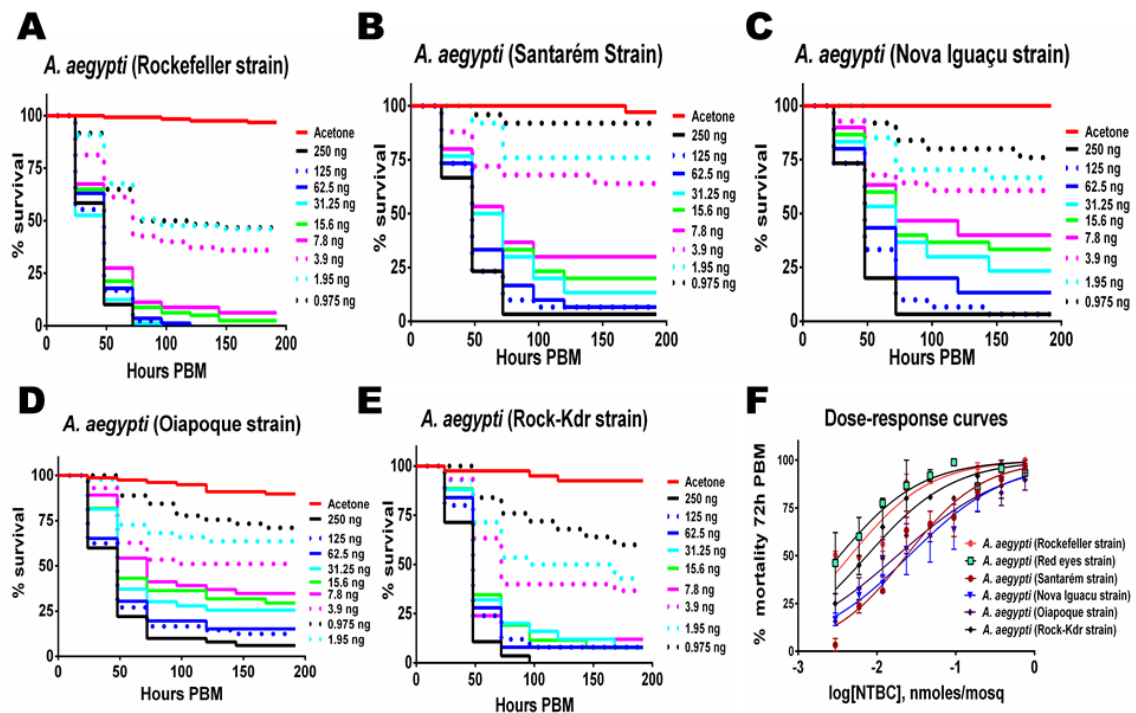


Figure 5. Insecticide-resistant *Aedes aegypti* strains show moderate resistance to NTBC applied topically after a blood meal. Topical application of NTBC caused death to *A. aegypti* (A) Rockefeller strain, (B) Santarém strain, (C) Nova Iguaçu strain, (D) Oiapoque strain; (E) Rock-kdr strain. (F) Dose-response curves at 72 h PBM. Panels A, B, C, D and E are plotted as Kaplan-Meier survival curves. 4 independent experiments for Rock-kdr strain and Oiapoque strain and 2 independent experiments for the other mosquito strains were performed, each with $n = 10\text{--}32$ insects per experimental group. The drug (in $0.5\ \mu\text{l}$ acetone) was applied on the abdomen immediately after a blood meal. Controls received $0.5\ \mu\text{l}$ acetone. Differences in the LD50 between Santarém, Nova Iguaçu and Oiapoque strain ($p < 0.001$) and Rockefeller strain were observed.

Table 3 – Toxicity of NTBC to insecticide resistant strains of *Aedes aegypti* - LD50 were calculated from data from Figures 4 and 5. ***= P<0.01. Data shown are mean \pm 95% Confidence Interval (CI).

<i>Aedes aegypti</i> strain	NTBC LD50 (95% CI)	
	Artificial feeding (μ M)	Topical application (nmoles/mosq)
Rockefeller strain	1.94 (1.42-2.65)	0.0046 (0.0036-0.0060)
Santarém	2.82 (1.79-4.41)	0.0235 (0.017-0.03)***
Nova Iguaçu	3.20 (1.76-5.79)	0.0255 (0.018-0.037)***
Oiapoque	2.33 (1.94-2.76)	0.0181 (0.012-0.026)***
Rock-Kdr	1.56 (1.39-1.75)	0.0075 (0.0052-0.011)

Persistence of NTBC in *Aedes aegypti*

Toxicity of HPPD inhibitors in hematophagous arthropods depends on the digestion of blood meal protein, as previous data showed that sugar fed mosquito females were not sensitive to mesotrione [12]. Using topical/contact applications of the drug under field conditions imply that drug exposition does not occur at the same time as blood intake. Therefore, we decided to evaluate the time interval between drug exposition and blood feeding that would be enough to retain lethality of the drug. After the topical application of a LD95 (15,6 ng, the dose that kill 95% of the mosquitoes when it is applied immediately after a blood meal) of NTBC, mosquitoes were fed on blood at different times (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) (Figure 6). Although a significant toxicity was retained for the first 24 h after drug application, the longer the time between blood feeding and topical application of NTBC, the lower the number of dead mosquitoes, suggesting progressive inactivation and/or excretion of the drug by the mosquito. In a second set of tests, mosquitoes were first fed on blood and then the topical application was made at different times PBM (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) (Figure 7). Here, a similar time-dependent loss of efficacy is observed because by 48 h and later time points after meal, there is little blood protein in the gut, and tyrosine has already been catabolized.

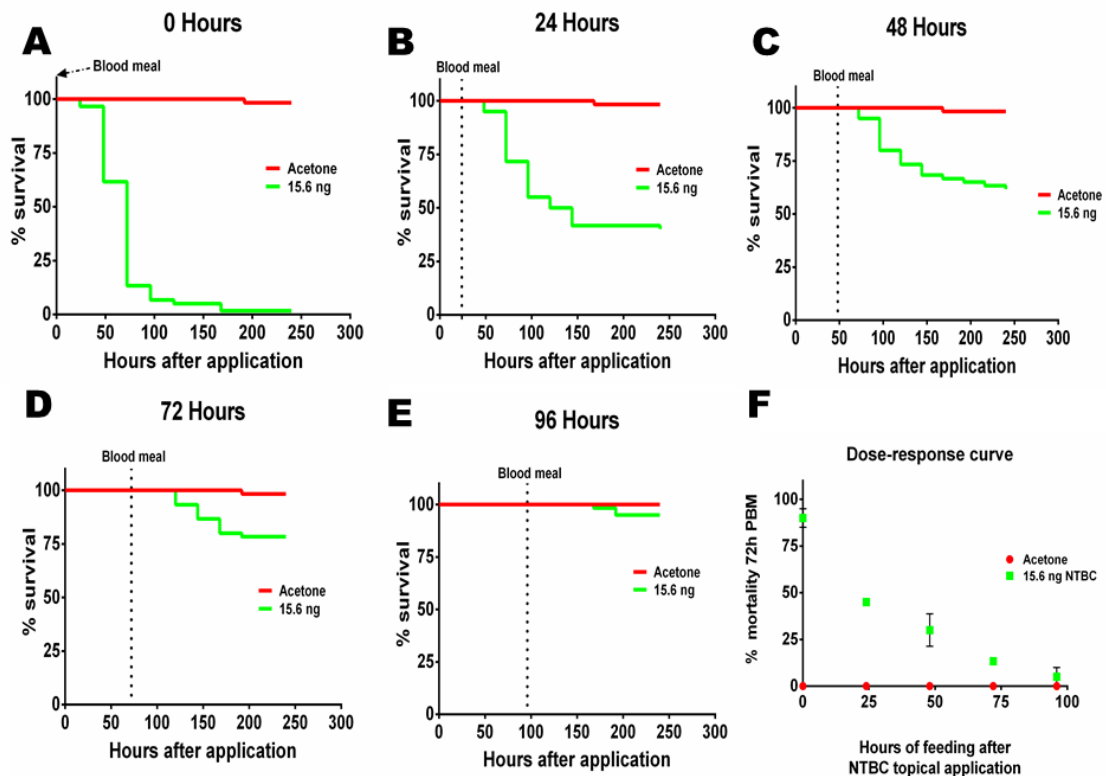


Figure 6. Persistence of NTBC effect in *Aedes aegypti* after topical application.

Mosquitoes (Red eyes strain) were fed with blood at different times after topical application of NTBC. (A) 0 h, (B) 24 h, (C) 48 h, (D) 72 h, (E) 96 h, (F) Dose-response curve at 72 h PBM. Panels A, B, C, D and E are plotted as Kaplan-Meier survival curves. 2 independent experiments were performed, each with $n = 10-32$ insects per experimental group. The LD95 (15.6 ng in 0.5 μ l acetone) was applied on the abdomen of the mosquito at time 0. Acetone alone was applied to the control group.

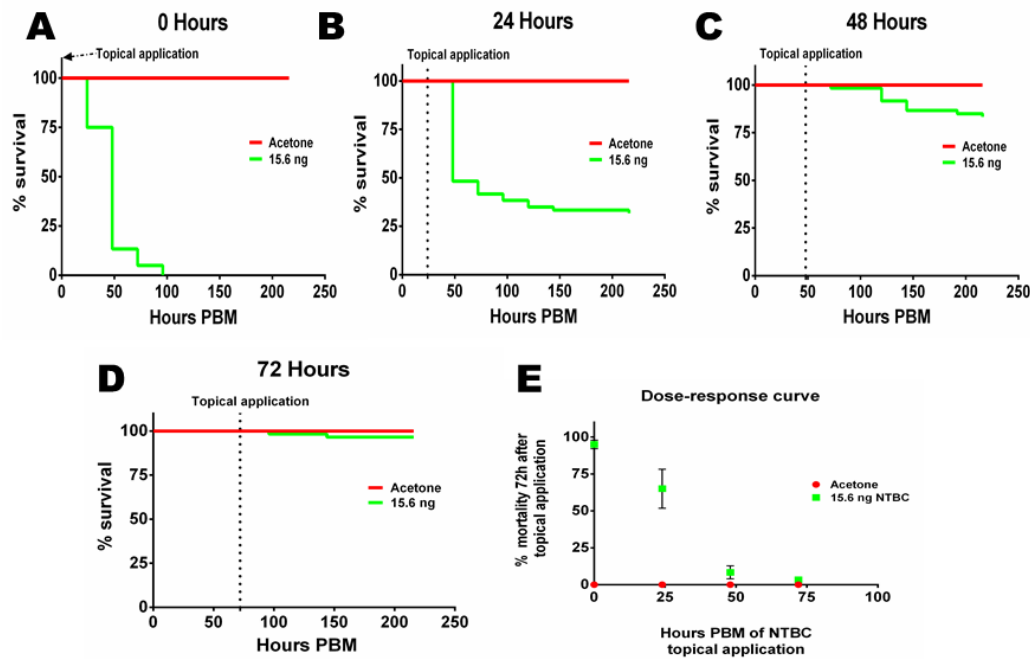


Figure 7. Topical application of NTBC at different times PBM.

Mosquitoes (Red Eye strain) were fed with blood and topical application of NTBC was performed at times indicated by the dotted line: **(A)** 0 hours, **(B)** 24 hours, **(C)** 48 hours, **(D)** 72 hours, **(E)** Dose-response curve at 72 h PBM. Data are plotted as Kaplan-Meier survival curve. 2 independent experiments were performed, each with $n = 10\text{--}32$ insects per experimental group.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Hematophagy is linked to a hyperproteic diet to an extent not found in other animals [9]. When the proteins in the blood are degraded, high levels of amino acids such as tyrosine accumulate in the digestive tract. The discovery that the capacity to degrade free tyrosine produced in excess during blood meal digestion is an essential trait in the physiology of blood sucking arthropods that contributes to adapt these animals to hematophagy led us to propose the use of HPPD inhibitors a new class of insecticides, selective for blood feeding animals. Our study here has further evaluated the use of HPPD as a target for the control of adult mosquitoes, comparing different inhibitors and modes of application to different strains of *Aedes aegypti* and other mosquito species.

Here, while comparing the three distinct HPPD inhibitors, our results showed that neither MES nor IFT were very powerful in *Aedes aegypti* (Red Eye strain), while NTBC stood out for its potency and efficacy. This was consistent with the report of Sterkel et al. (2016), who found that feeding of *A. aegypti* with rabbit blood plus mesotrione decreased their survival. However, differences in the results depending on the mode of administration provided relevant insights that can help further research on the use of HPPD inhibitors as vector selective insecticides. NTBC, MES but not IFT were effective against *Aedes aegypti* when administered along with the blood meal (Figure 1) but topical application resulted in a different profile, although also showing a much better performance for NTBC, IFT, but not MES was also capable to induce death of the insects, albeit much higher doses were needed (Figure 2). An open question is to understand the molecular mechanism responsible for such a difference between MES, IFT and NTBC in response to topical application and artificial feeding, knowing that these compounds act on the same enzyme, HPPD. Whereas MES and NTBC act directly on the HPPD enzyme [17,27], in IFT its biotransformation takes place forming the diketonitrile derivative (DKN), the latter acting on the HPPD enzyme [21,28]. Specifically, the difference between MES and IFT in these two assays might be explained either by differential absorption or by differential metabolic modification of these compounds when administered by each route. Currently, MES and IFT are used as herbicides and NTBC is used in the treatment of tyrosinemia type 1 [17,18,21]. In humans, NTBC has a long plasma half-life (approximately 54 h) and its concentration in plasma following ingestion of a therapeutic dose (1 mg/kg) is 8 µg/ml (24,3 µM) [29], much higher than the LD50 observed for all mosquito species. The potency and persistence following administration of NTBC makes it suitable for the treatment of patients with HT-1 and may be also a reason for its higher potency towards mosquitoes. Thousands of compounds are presently listed as HPPD inhibitors [13], therefore, it is important to highlight that this differential toxicity depending on the mode of administration calls for a systematic comparison between a greater spectrum of inhibitors, as a way to reveal alternative compounds directed to the same enzyme.

The effectiveness of topical application of NTBC suggests that it can be used in the strategies such as IRS and LLIN to complement (or replace) the neurotoxic insecticides currently in use. A striking feature of the mode of action of HPPD inhibitors is that they have a lethal effect only in insects that have previously been fed with blood, making them selective for hematophagous arthropods. However, this also created some limitations, as illustrated by the results showing that the efficacy of NTBC on topical application trials strongly depended on the time interval between drug administration and blood meal intake. When mosquitoes were fed 24 hours after the topical application of a LD95, it only killed 50% of the insects, indicating that a significant proportion (around 50%) of the drug has already been inactivated or excreted by that time. NTBC LD95 only killed 25% of the mosquitoes when fed 72 hours after application, and it was not effective when mosquitoes were fed later on. When NTBC was applied on different times after a blood meal, it was lethal when applied up to 48 hours PBM, indicating that most of the tyrosine had already been catabolized by that time (Fig 6 and 7).

The only endectocide drug (it has activity against endo- and ectoparasites when applied to the host) approved nowadays for its use in human and livestock is Ivermectin [30]. It targets a broad range of parasites and invertebrates, including mosquitoes [31–34], and it has been proposed as an additional tool to control vector-borne diseases such as malaria [35–41]. It reduces the survival of mosquitoes that were fed with blood of people who were treated with ivermectin, and the most striking thing is lack of acute toxicity of this drug, using doses 300 µg/kg and 600 µg/kg per day and the mosquitocidal effect was found for up to 28 days [33,42], and there are reports in adults up to 2000 µg/kg [43]. These doses of ivermectin mentioned above were quite tolerable and safe for humans. Ivermectin in *Anopheles gambiae* presents a LD50 = 16 ng/mL [44] and a LD50 = 10 mg/kg in rats [45]. A recent study proposed the use of isoxazoline group drugs (fluralaner and afoxolaner) currently used orally against fleas and ticks, for the drug-based vector control of *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Anopheles* and sand flies [46]. Because NTBC toxicity towards hematophagous is maximized when it is co-delivered along with the blood meal, and it is a remarkable safe drug for mammals (LD50 > 1000 mg/kg in rats) [47], our results suggest that it could be administered to the vertebrates, similar to Ivermectin or under a strategy of mass

drug administration for human populations, as is being proposed for isoxazoline, as a novel strategy for the control of mosquitoes and other hematophagous organism.

The spreading of insecticide resistance among natural populations is a factor that has limited their efficiency in the control of vector borne diseases and hence, fueled the search for alternative methods. Resistant mosquitoes are those that can survive in contact with an insecticide and since mosquitoes can produce many generations per year, the levels of resistance can evolve very quickly and the appearance of cross-resistance among different neurotoxic compounds is a common finding [48,49]. Here we searched for cross-resistance using strains known to be resistant to organophosphates and pyrethroids, attributed both to metabolic resistance and due to target site mutations [22–25]. No evidence for cross-resistance appeared using oral administration (Figure 4, Table 3), but when using the topical application assay for NTBC a significant variation in the LD50 was observed (Figure 5, Table 3). These results might be explained by a lower penetration of the drug through the cuticle by Santarem, Nova Iguacu and Oiapoque strains. This mechanism of resistance has been studied of some insects of agricultural importance [50,51] and parasites [52]. Mechanistically, this has been by results on comparative transcriptomic analysis that revealed significant differences in the transcripts of some cuticular proteins between deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* strains [53]. Rock-kdr strain is derived from the backcrossing of a field strain and the Rockefeller strain for eight generations, to reduce the contribution of detoxification enzymes (glutathione-S-transferase, esterases) in pyrethroid resistance and to evaluate the effect of the Kdr mutation [22]. Knockdown resistance associated with pyrethroids in Brazilian *Aedes aegypti* populations, as Rock-kdr strain, it is due to point mutations Val1016Ile and Phe1534Cys [22,54]. When the NTBC topical application was performed in the Rock-kdr strain, there was no significant variation of the LD50 with respect to the Rockefeller control strain, and the same result is observed when comparing the Red Eye strain and the Rockefeller strain (Figure 5, table 3).

The strains of *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus* used in this study are mosquitoes established in the laboratory from wild populations of Rio de Janeiro. Results showing action of NTBC on *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus* adults with efficiency levels similar to that in *A. aegypti* reinforce that this may be used to target at the same time several vector borne diseases. In addition,

similar responses were obtained with the Rockefeller strain susceptible to insecticides (Figure 3, Table 2).

At this point we have documented the rate at which mosquitoes die from exposure to HPPD inhibitors, but we do not know the mechanism by which this happens. In *R. prolixus*, silencing TAT and HPPD raised tyrosine levels in the hemolymph and abundant material precipitated in the hemocoel and in the surrounding tissue [12]. It may be that the same thing happens in mosquitoes. Further studies are needed to elucidate this mechanism. In addition, it is important to highlight new strategies are needed for the control of vector-borne diseases, among them the search for alternative insecticides [55,56], with a different mode of action that could be effective against resistant strains.

Taken together, our data demonstrate that NTBC can be used as a leading compound, to later develop better compounds that act on this enzyme, but a wide range of other HPPD inhibitors can be investigated as possible tools for mosquito control, opening an area that should be further explored.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Martha Sorenson for a critical reading and for all his suggestions in the writing of the manuscript. We thank all of the members of the Laboratory of Biochemistry of Hematophagous Arthropods (UFRJ), especially Katia Anastacio Laia and Jaciara Miranda Freire for breeding of *Aedes aegypti* (Red Eye strain) and João Marques, Thiago Varjão, Charlion Cosme and S.R. Cassia for providing technical assistance.

We also thank of members of Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (FIOCRUZ), especially Luciana dos Santos Dias for his suggestions for conducting the trials and provide the resistant strains Santarém and Nova Iguaçu, Luana Carrara for providing Oiapoque and Rock-Kdr resistant strains. We thank Raquel Santos, Priscila Serravale and Quesia Amorim for the breeding of *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*.

REFERENCES:

1. Marshall E. A renewed assault on an old and deadly foe. *Science* (80-). 290: 428–30.
2. Liu N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu Rev Entomol.* 2015;60: 537–559. doi:10.1146/annurev-ento-010814-020828
3. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. *Mr4.* 2013; 1–30. doi:ISBN 978 92 4 150515 4
4. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Second. World Health Organisation Technical Report Series. 2016. doi:10.1007/978-3-642-10565-4
5. Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci.* 2008;13: 1240–1249. doi:10.2741/2758
6. Hemingway J, Field L, Vontas J. An overview of insecticide resistance. *Science* (80-). 2002;298: 96–97. doi:10.1126/science.1078052
7. Messina JP, Kraemer MUG, Brady OJ, Pigott DM, Shearer FM, Weiss DJ, et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife.* 2016;5. doi:10.7554/eLife.15272
8. Boëte C, Reeves RG. Alternative vector control methods to manage the Zika virus outbreak: More haste, less speed. *Lancet Glob Heal.* 2016;4: e363. doi:10.1016/S2214-109X(16)00084-X
9. Sterkel M, Oliveira JHM, Bottino-Rojas V, Paiva-Silva GO, Oliveira PL. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. *Trends Parasitol.* Elsevier Ltd; 2017;33: 633–644. doi:10.1016/j.pt.2017.04.008
10. Scott CR. The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2006;142C: 121–126. doi:10.1002/ajmg.c.30092
11. Ribeiro MC, Genta FA, Sorgine MHF, Logullo R, Mesquita RD, Paiva-silva GO,

- et al. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug , *Rhodnius prolixus*. 2014;8. doi:10.1371/journal.pntd.0002594
12. Sterkel M, Perdomo HD, Guizzo MG, Barletta ABF, Nunes RD, Dias FA, et al. Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. *Curr Biol. Elsevier Ltd.*; 2016;26: 2188–2193. doi:10.1016/j.cub.2016.06.025
 13. Beaudegnies R, Edmunds AJF, Fraser TEM, Hall RG, Hawkes TR, Mitchell G, et al. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors-A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorganic Med Chem. Elsevier Ltd*; 2009;17: 4134–4152. doi:10.1016/j.bmc.2009.03.015
 14. Hirai K, Uchida A, Ohno R. Major Synthetic Routes for Modern Herbicide Classes and Agrochemical Characteristics. 2002;
 15. Van Almsick A. New HPPD-inhibitors - A proven mode of action as a new hope to solve current weed problems. *Outlooks Pest Manag.* 2009;20: 27–30. doi:10.1564/20feb09
 16. Knudsen CG. Discovery of the triketone class of HPPD inhibiting herbicides and their relationship to naturally occurring β -triketones. *Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry.* 2000. pp. 101–111.
 17. Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TEM, Hawkes TR, Holt DC, Townson JK, et al. Mesotrione: A new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag Sci.* 2001;57: 120–128. doi:10.1002/1526-4998(200102)57:2<120::AID-PS254>3.0.CO;2-E
 18. Lindstedt, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O SB. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet.* 1992; 813–817.
 19. Suwannarat P, O'Brien K, Perry MB, Sebring N, Bernardini I, Kaiser-Kupfer MI, et al. Use of nitisinone in patients with alkaptonuria. *Metabolism.* 2005;54: 719–728. doi:10.1016/j.metabol.2004.12.017
 20. Introne WJ, Perry MB, Troendle J, Tsilou E, Kayser MA, Suwannarat P, et al. A

- 3-year randomized therapeutic trial of nitisinone in alkaptonuria. *Mol Genet Metab.* Elsevier B.V.; 2011;103: 307–314. doi:10.1016/j.ymgme.2011.04.016
21. Pallett KE, Cramp SM, Little JP, Veerasekaran P, Crudace AJ, Slater AE. Isoxaflutole: The background to its discovery and the basis of its herbicidal properties. *Pest Manag Sci.* 2001;57: 133–142. doi:10.1002/1526-4998(200102)57:2<133::AID-PS276>3.0.CO;2-0
 22. Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, et al. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS One.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0060878
 23. Dos Santos Dias L. Avaliação da persistência e efeito do spinosad no desenvolvimento e reprodução de populações brasileiras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resistentes aos inseticidas temephos e deltametrina. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2015. p. 110.
 24. Dos Santos Dias L, MacOris MDLDG, Andrighetti MTMO, Otrera VCG, Dias ADS, Bauzer LGSDR, et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. *PLoS One.* 2017;12: 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0173689
 25. Bottino-Rojas V, Talyuli OAC, Carrara L, Martins AJ, James AA, Oliveira PL, et al. The redox-sensing gene *Nrf2* affects intestinal homeostasis, insecticide resistance and Zika virus susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem.* 2018;293: jbc.RA117.001589. doi:10.1074/jbc.RA117.001589
 26. World Health Organisation, NIH. *Methods in Anopheles Research.* Mr4. 2014; 1–6. Available: <https://www.beiresources.org/Publications/MethodsInAnophelesResearch.aspx>
 27. Ellis MK, Whitfield AC, Gowans LA, Auton TR, Provan WM, Lock EA, et al. Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-Chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1995. pp. 12–19. doi:10.1006/taap.1995.1121

28. Garcia I, Job D, Matringe M. Inhibition of p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by the Diketonitrile of Isoxaflutole: A Case of Half-Site Reactivity. *Biochemistry*. 2000;39: 7501–7507.
29. Hall MG, Wilks MF, McLean Provan W, Eksborg S, Lumholt B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52: 169–177. doi:10.1046/j.0306-5251.2001.01421.x
30. Omura S, Crump A. Ivermectin and malaria control. *Malar J. BioMed Central*; 2017;16: 1–3. doi:10.1186/s12936-017-1825-9
31. Ameen M, Arenas R, Villanueva-Reyes J, Ruiz-Esmenjaud J, Millar D, Domínguez-Dueñas F, et al. Oral ivermectin for treatment of pediculosis capitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29: 991–993. doi:10.1097/INF.0b013e3181e63f5f
32. Chosidow O, Giraudeau B, Cottrell J, Izri A, Hofmann R, Mann SG, et al. Oral Ivermectin versus Malathion Lotion for Difficult-to-Treat Head Lice. *N Engl J Med*. 2010;362: 896–905. doi:10.1056/NEJMoa0905471
33. Smit MR, Ochomo EO, Aljanyoussi G, Kwambai TK, Abong'o BO, Chen T, et al. Safety and mosquitocidal efficacy of high-dose ivermectin when co-administered with dihydroartemisinin-piperaquine in Kenyan adults with uncomplicated malaria (IVERMAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis. Elsevier Ltd*; 2018;18: 615–626. doi:10.1016/S1473-3099(18)30163-4
34. Panahi Y, Poursaleh Z, Goldust M. The efficacy of topical and oral ivermectin in the treatment of human scabies. *Ann Parasitol*. 2015;61: 11–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911032>
35. Pooda HS, Rayaisse JB, Hien DFDS, Lefèvre T, Yerbanga SR, Bengaly Z, et al. Administration of ivermectin to peridomestic cattle: A promising approach to target the residual transmission of human malaria. *Malar J. BioMed Central*; 2015;14: 1–12. doi:10.1186/s12936-015-1001-z
36. Kobylinski KC, Deus KM, Butters MP, Hongyu T, Gray M, da Silva IM, et al. The

- effect of oral anthelmintics on the survivorship and re-feeding frequency of anthropophilic mosquito disease vectors. *Acta Trop.* Elsevier B.V.; 2010;116: 119–126. doi:10.1016/j.actatropica.2010.06.001
37. Kobylinski KC, Sylla M, Chapman PL, Sarr MD, Foy BD. Ivermectin mass drug administration to humans disrupts malaria parasite transmission in Senegalese villages. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85: 3–5. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0160
 38. Sylla M, Gray M, Chapman PL, Sarr MD, Rasgon JL. Mass drug administration of ivermectin in south-eastern Senegal reduces the survivorship of wild-caught, blood fed malaria vectors. *Malar J.* 2010;9: 1–10. doi:10.1186/1475-2875-9-365
 39. Foy BD, Kobylinski KC, Silva IM da, Rasgon JL, Sylla M. Endectocides for malaria control. *Trends Parasitol.* Elsevier Ltd; 2011;27: 423–428. doi:10.1016/j.pt.2011.05.007
 40. Alout H, Krajacich B, Meyers J, Grubaugh N, Brackney D, Kobylinski K, et al. Evaluation of ivermectin mass drug administration for malaria transmission control across different West African environments. *Malar J.* 2014;13: 417. doi:10.1186/1475-2875-13-417
 41. Ouédraogo AL, Bastiaens GJH, Tiono AB, Guelbéogo WM, Kobylinski KC, Ouédraogo A, et al. Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment: A double-blind, randomized, clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60: 357–365. doi:10.1093/cid/ciu797
 42. Smit MR, Ochomo E, Aljanyoussi G, Kwambai T, Abong'o B, Bayoh N, et al. Efficacy and Safety of High-Dose Ivermectin for Reducing Malaria Transmission (IVERMAL): Protocol for a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Finding Trial in Western Kenya. *JMIR Res Protoc.* 2016;5: e213. doi:10.2196/resprot.6617
 43. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *J Clin Pharmacol.* 2002;42: 1122–1133. doi:10.1177/009127002237994
 44. Kobylinski KC, Foy BD, Richardson JH. Ivermectin inhibits the sporogony of

- Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2012;11: 1–9. Available: http://www.ajtmh.org/content/87/5_Suppl_1/150.full.pdf+html%5Chttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed11&AN=71041136%5Chttp://eleanor.lib.gla.ac.uk:4550/resserv?sid=OVID:embas&id=pmid:&id=doi:&issn=0002-9637&isbn=&volum
45. DrugBank [Internet].
 46. Miglianico M, Eldering M, Slater H, Ferguson N, Ambrose P, Lees RS. Repurposing isoxazoline veterinary drugs for control of vector-borne human diseases. 2018; 1–7. doi:10.1073/pnas.1801338115
 47. Lock E, Ranganath LR, Timmis O. The Role of Nitisinone in Tyrosine Pathway Disorders. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16: 1–8. doi:10.1007/s11926-014-0457-0
 48. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 2000;45: 371–391.
 49. Flores AE, Ponce G, Silva BG, Gutierrez SM, Bobadilla C, Lopez B, et al. Wide Spread Cross Resistance to Pyrethroids in *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) from Veracruz State Mexico. *J Econ Entomol.* 2013;106: 959–969. doi:10.1603/EC12284
 50. Mushtaq Ahmad ID and RHB. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag Sci.* 2006;62: 805–10. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.1225>
 51. Chen E-H, Hou Q-L, Dou W, Wei D-D, Yue Y, Yang R-L, et al. Genome-wide annotation of cuticular proteins in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*), changes during pupariation and expression analysis of CPAP3 protein genes in response to environmental stresses. *Insect Biochem Mol Biol.* Elsevier Ltd; 2018; doi:10.1016/j.ibmb.2018.04.009
 52. Koganemaru R, Miller DM, Adelman ZN. Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pestic Biochem Physiol.* Elsevier Inc.; 2013;106: 190–197. doi:10.1016/j.pestbp.2013.01.001

53. Bonizzoni M, Afrane Y, Dunn WA, Atieli FK, Zhou G, Zhong D, et al. Comparative Transcriptome Analyses of Deltamethrin-Resistant and -Susceptible *Anopheles gambiae* Mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. *PLoS One*. 2012;7: 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0044607
54. Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP, et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites and Vectors*. 2014;7. doi:10.1186/1756-3305-7-25
55. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: An urgent need. *Trends Parasitol*. 2002;18: 161–163. doi:10.1016/S1471-4922(01)02220-6
56. Oxborough RM. Trends in US President's Malaria Initiative-funded indoor residual spray coverage and insecticide choice in sub-Saharan Africa (2008-2015): Urgent need for affordable, long-lasting insecticides. *Malar J. BioMed Central*; 2016;15: 1–9. doi:10.1186/s12936-016-1201-1

CAPÍTULO 2: DADOS COMPLEMENTARES.

2.1. INTRODUÇÃO

Dentro das estratégias de controle dos mosquitos, temos o controle químico. O controle químico pode ser no estágio de larva e no estágio de adulto. Os compostos precisam ter certas características antes de serem liberados. No caso de larvicidas, tem que estar aprovado pela WHOPES (WHO Pesticide Evaluation Scheme) para uso em água potável. No caso dos adulticidas, eles precisam permanecer por algum tempo nas superfícies ou áreas onde são aplicados, entrar em contato com o mosquito e bloquear o ciclo de transmissão.

Mas, atualmente foi determinado resistência para diferentes compostos utilizados dentro do controle químico. Existem diferentes ensaios para avaliar a resistência nos mosquitos, entre os quais temos: ensaios dose-resposta, dose-diagnostics, ensaios bioquímicos e moleculares. Atualmente dois métodos são de uso generalizado para determinar a resistência nos mosquitos adultos: ensaio de impregnação no papel filtro (da OMS), ensaio de impregnação de garrafa (do CDC) (CDC, 2012; WHO, 1998). Os dois tem relação com o contato que é estabelecido entre o inseticida e o mosquito, diferindo na superfície, papel no primeiro caso e vidro no segundo caso. Portanto, decidimos avaliar o efeito de NTBC (um inibidor de HPPD) na sobrevivência do *A. aegypti* quando é aplicado em diferentes superfícies. Precisamente, no mundo real, os inseticidas convencionais podem penetrar no corpo do inseto principalmente por contato. Outros podem entrar por ingestão e por fumigantes.

O monitoramento da resistência é um elemento importante para a definição de políticas de controle de vetores. No caso de Brasil, no âmbito do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), existe uma rede para avaliar a resistência a inseticidas nos mosquitos nos diferentes municípios de Brasil, denominada Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas (MoReNAa) (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015), que é o maior programa desse tipo no mundo.

Nos parágrafos descritos acima está relacionado ao controle do vetor, que é uma maneira de lidar com doenças virais transmitidas pelos mosquitos, outra é o controle do vírus. Os compostos que atuam na replicação dos vírus, são chamados antivirais. Na seção anterior estudamos a ação dos inibidores de HPPD (principalmente NTBC) na viabilidade dos insetos, no entanto, considerando os

profundos efeitos destes compostos sobre a fisiologia dos vetores, mediados pela sua alteração do metabolismo de aminoácidos, especulamos se eles também afetariam o ciclo de replicação e disseminação de arbovírus nos mosquitos, especificamente o ZIKV.

Nesta seção de resultados complementares, incluímos assim resultados preliminares, que necessitam de uma replicação experimental mais robusta do que a que foi possível dentro do prazo da presente dissertação, mas que apesar dessa limitação, mostram informações de interesse, envolvendo ensaios de garrafas impregnadas com NTBC, papel filtro impregnado com NTBC e um experimento dedicado a avaliar o efeito da NTBC em *A. aegypti* infectado pelo ZIKV.

2.2. OBJETIVOS

- ❖ Testar e comparar diferentes formas de administração dos inibidores de HPPD. Para isso:
 - Fazer o bioensaio utilizando papéis impregnados com NTBC.
 - Determinar a curva dose-resposta de letalidade de NTBC em ensaio de garrafa impregnada.

- ❖ Avaliar o efeito da NTBC na infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus zika.

2.3. MÉTODOS

a) Mosquitos: Foram utilizadas fêmeas de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller e Red Eye strain de 3 dias de vida após a eclosão do adulto (LAFICAVE, 2008).

b) Impregnação do NTBC em papel de filtro: Para impregnar as soluções de NTBC (o NTBC foi diluído em acetona) no papel nós utilizamos a metodologia da OMS, utilizando óleo de silicone 556 (Dow Corning), assim como é feito com deltametrina. Depois fizemos a impregnação do NTBC no papel filtro 1MM da Whatman, com ajuda do aparato para impregnação (LAFICAVE, 2008; WHO, 1998). O papel controle foi somente impregnado com óleo. Depois 20 fêmeas da linhagem Red Eye strain eram transferidas aos tubos de exposição, onde previamente foram encaixados os papéis impregnados. Os mosquitos permaneciam nestes tubos por 1 hora e depois eram transferidos aos tubos de recuperação por 24 horas (WHO, 1998).

c) Impregnação do NTBC em garrafas de vidro: Neste teste utilizaram-se garrafas de vidro WHEATON de 250 ml, seguindo a metodologia do CDC, assim como

adaptada pelo grupo do LAFICAVE. O CDC trabalha com uma dose-diaognostica de 20 µg/garrafa e o LAFICAVE emprega uma dose-diaognostica de 50 µg/garrafa (LAFICAVE, 2017).Foram utilizadas fêmeas do linhagem Red Eye strain de 3-4 dias de idade após a eclosão do adulto, alimentadas com sangue.

A impregnação de garrafas controle era feita com 1 ml de acetona 100% e as garrafas experimentais foram tratadas com 1ml de solução de NTBC nas concentrações de 0.0195 mg/ml, 0.039mg/ml, 0.078 mg/ml, 0.15625mg/ml, 0.3125 mg/ml, 0.625 mg/ml, 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml e 10 mg/ml. Para a impregnação as garrafas eram giradas primeiro na posição vertical e depois na posição horizontal sobre uma superfície horizontal plana. As garrafas eram roladas nessa superfície até a completa evaporação da solução, de modo a produzir um filme de NTBC o mais homogêneo possível. As garrafas eram mantidas protegidas da luz e guardadas na posição horizontal, sendo utilizadas depois de 24 horas. Os testes foram realizados colocando entre 25-30 fêmeas (previamente alimentadas com sangue) por garrafa com ajuda de um sugador. As garrafas eram deixadas na posição vertical durante o teste, por aproximadamente 2 horas, sendo então os mosquitos transferidos de volta as gaiolas para avaliar a mortalidade durante sete dias.

d) Efeito do NTBC em *A. aegypti* (Red Eye strain) infetados com ZIKV.

O ZIKV utilizado foi obtido originalmente da Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz; Pernambuco, Brasil). Estoques virais foram propagados em células Vero em meio DMEM (Gibco life technologies), pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 3.7g/L de bicarbonato de sódio, 1% de L-glutamina 2% e 1% de penicilina / estreptomicina. Os sobrenadantes de cultura eram armazenados a -80 °C. Os estoques do ZIKV ficavam em torno de 2×10^7 PFU/ml. Era utilizado um título viral de 10^7 PFU/mL para infecção.

Para infecção oral de *A. aegypti* (Red Eye strain) com o ZIKV, foram usadas fêmeas de 3-4 dias após a eclosão das pupas (n=150). A partir de sangue heparinado colhido da orelha de coelhos, foram obtidas hemácias lavadas (3X) em PBS por centrifugação. A essa suspensão de hemácias lavadas foi adicionado uma preparação fresca do ZIKV, e mosquitos foram alimentados com um alimentador artificial mantido a 37° C em banho maria. Após 30 minutos, os mosquitos foram adormecidos na geladeira por 1-2 minutos, e apenas as fêmeas alimentadas eram selecionadas.

- **Avaliação da infecção de mosquitos pelo ZIKV:** Foi empregado o ensaio de placa, como descrito por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Quatro dias

após a alimentação, as fêmeas foram anestesiadas no frio, lavadas em etanol e PBS. Os intestinos eram dissecados e transferidos a tubos de polipropileno de 1.5 ml previamente autoclavados com pérolas de vidro (0.5 mm de diâmetro, Scientific Industries Inc. SI-BGO5) e 200 µl de meio DMEM, sendo mantidos a – 70°C até o momento de uso. Após o descongelamento, as amostras eram homogeneizadas no vórtex por 10 minutos, e centrifugadas a 13000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, eram feitas diluições seriadas de 20 µl do sobrenadante em 180 µl de DMEM e 100 µl de cada diluição eram transferidos a placas de 24 poços com cultura não-confluente células Vero (preparadas um dia antes). Posteriormente, as placas de células Vero eram mantidas em um agitador orbital por 15 minutos, e na incubadora por 45 minutos, após os quais eram adicionadas 750 µl de DMEM, 2 % de soro fetal bovino, 1 % penicilina e estreptomicina, e 0.8 % CMC (carboximetilcelulose, Sigma, 4.000 cP de viscosidade). As placas eram incubadas 4-5 dias a 37°C em estufa de CO₂. Finalmente, o sobrenadante era descartado e as placas eram coradas com cristal violeta 1 % em etanol:acetona (1:1) a temperatura ambiente e lavado com água para remover o excesso de corante. Posteriormente foram contadas visualmente as unidades formadoras de placas (PFU).

2.4. RESULTADOS

a. Testar e comparar diferentes formas de administração dos inibidores de HPPD.

❖ Fazer o bioensaio utilizando papéis impregnados com NTBC.

Na tentativa de adaptar o ensaio de impregnação de NTBC no papel filtro ao uso com NTBC, empregamos o protocolo semelhante a metodologia da OMS. Para deltametrina são utilizadas concentrações que vão de 5 mg/L até 45 mg/L. Em nossos experimentos, foram utilizadas cinco concentrações de NTBC (5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 250 mg/L e 500 mg/L) e como controle, óleo silicone 556 (Dow Corning). Em nenhuma das concentrações utilizadas foi observada mortalidade dos insetos (Figura 16). Uma vez que nossos resultados anteriores mostravam que o NTBC apresenta letalidade em aplicações tópicas, concluímos que o papel de filtro é um substrato com alta capacidade de retenção do NTBC, dificultando a sua transferência ao inseto.

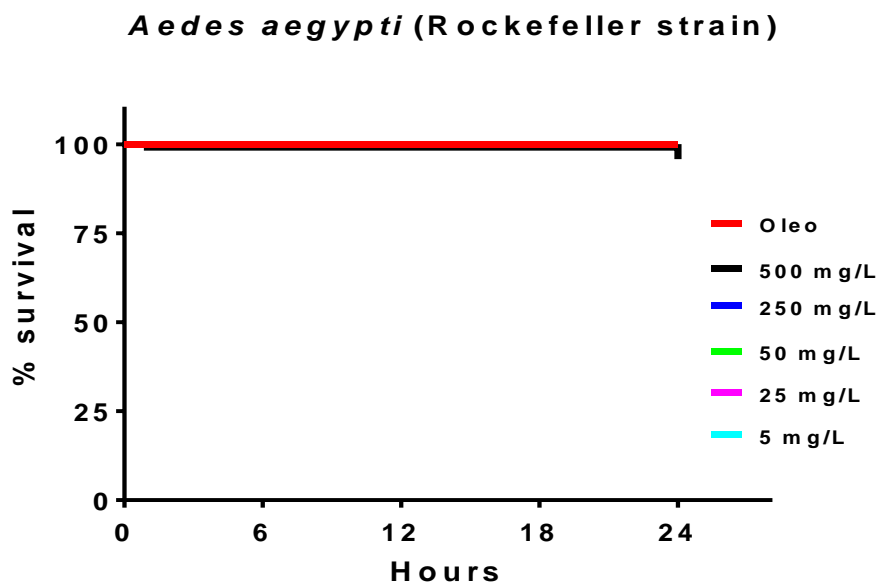


Figura 16. Bioensaio utilizando papéis impregnados com NTBC. Papel filtro foi impregnado com soluções de NTBC nas concentrações indicadas, como descrito na seção de Métodos e a sobrevivência foi avaliada a 1 hora e 24 horas. Foi utilizado o análise de sobrevivência de Kaplan–Meier.

❖ **Determinar a curva dose-resposta de letalidade de NTBC em ensaio de garrafa impregnada.**

O ensaio de impregnação de NTBC na garrafa de 250 ml foi baseado na metodologia do CDC. No grupo controle (acetona apenas) não se observou mortalidade, enquanto nos grupos tratados com NTBC foi observada mortalidade, mas sem que fosse obtida uma curva dose-resposta, indicando que o efeito máximo já havia sido atingido mesmo com as doses mais baixas (Figura 17).

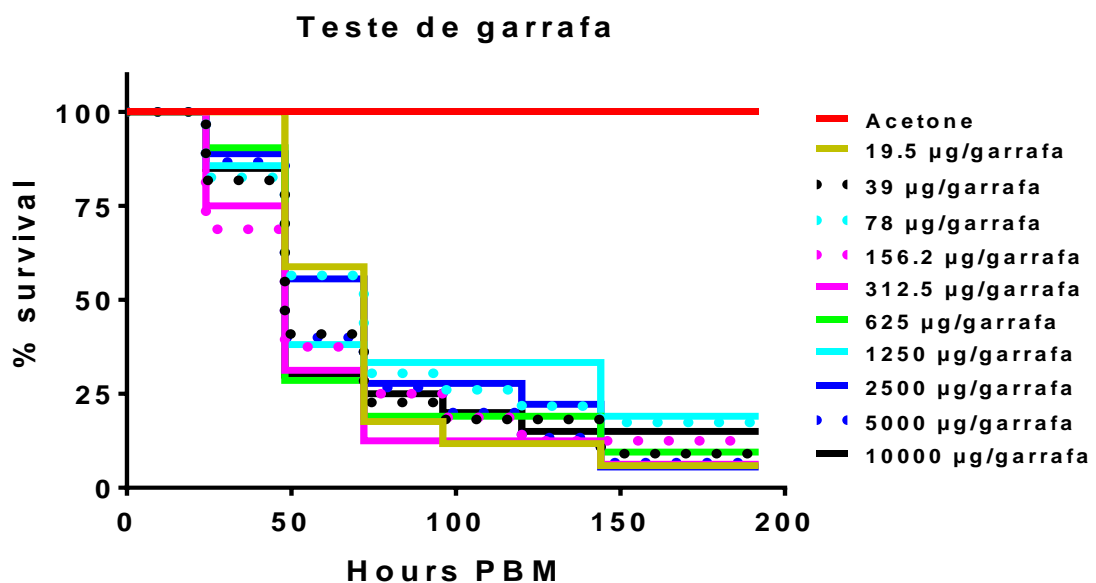


Figura 17. Curva dose-resposta de letalidade do *A. aegypti* (Red Eye strain) em ensaio de garrafa impregnada com NTBC. Garrafas de vidro foram impregnadas com soluções de NTBC nas concentrações indicadas, como descrito na seção de Métodos e a sobrevivência foi avaliada nos tempos indicados. Foi utilizado o análise de sobrevivência de Kaplan–Meier.

Em relação ao ensaio de infecção com o ZIKV temos que o mosquito *A. aegypti* foi alimentado oralmente com sangue contendo ZIKV e NTBC (grupo de NTBC) e também foi alimentado com sangue contendo ZIKV e PBS (grupo controle). Para avaliar o efeito da NTBC na infecção dos mosquitos pelo ZIKV foram utilizados mosquitos de 4 dias após infecção ou tratamento (dpi). Foram utilizadas duas doses de NTBC, 0,3 µg/ml (LD10) e 1 µg/ml (LD50), e como controle PBS. O efeito da LD10 sobre a infecção do intestino médio de *A. aegypti* mostrou uma queda significativa no número de mosquitos que se infetaram com o vírus (prevalência da infecção) em

relação ao grupo de controle ($p = 0.0073$), mas não houve diferença significativa entre a LD50 e o grupo controle ($p = 0.8867$) (Figura 18). Isso sugere que os mosquitos que recebem doses menores, subletais, são piores transmissores do ZIKV. Os mosquitos não morrem, mas apresentam menor taxa de infecção pelo vírus, o que poderia diminuir a taxa de transmissão da doença.

b. Avaliar o efeito da NTBC na infecção do *A. aegypti* (Red Eye strain) pelo vírus zika.

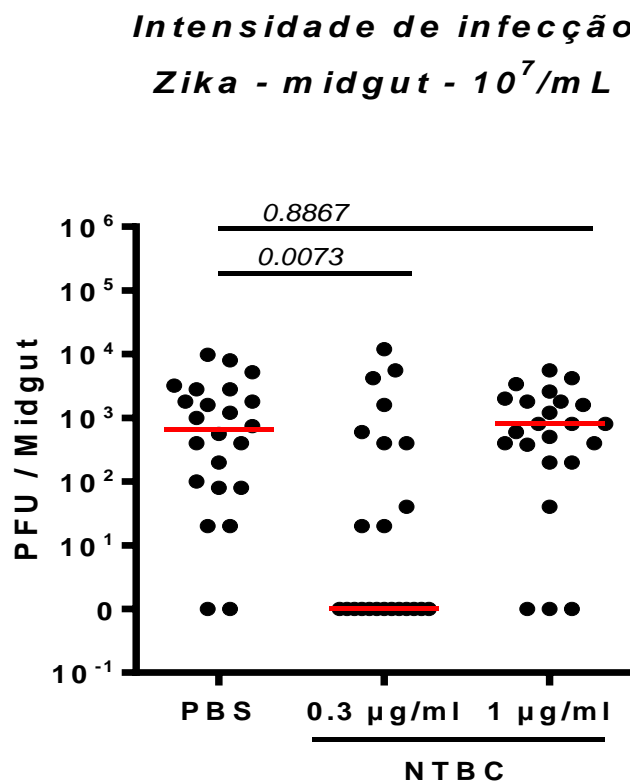


Figura 18. Efeito da NTBC na infecção do *A. aegypti* (Red Eye strain) pelo vírus zika. Fêmeas adultas de *A. aegypti* (Red Eye strain) foram alimentadas com sangue contendo 10^7 PFU/ml do ZIKV suplementado ou não com as doses indicadas de NTBC: 0.3 µg/ml (LD10) e 1 µg/ml (LD50). Depois de 4 dias de tratamento os mosquitos foram sacrificados e a quantidade de vírus no intestino foi analisado. Para o análise estadístico foi usado o teste U de Mann-Whitney para comparar intensidade da infecção.

2.5. Discussão

Existem dois testes de rotina para avaliar a resistência em populações de mosquitos coletadas no campo. Um é o teste de impregnação em papel de filtro da OMS e o ensaio de impregnação na garrafa da CDC (WHO, 2016b). Em ambos tipos de testes, os inseticidas são aplicados em certas superfícies, papel e vidro, em seguida, os mosquitos quando descansam nas superfícies entram em contato com os inseticidas. O ensaio do papel filtro foi padronizado pela OMS e o ensaio de impregnação nas garrafas foi sugerido por Brogdon e McAllister (BROGDON; MCALLISTER, 1998), como um método mais econômico e rápido. Com relação ao segundo tipo de teste, para deltametrina a dose diagnóstica é de 10 µg/garrafa e o tempo diagnóstico é de 30 minutos. Quando fizemos o teste de impregnação do NTBC nas garrafas, deixamos 2 h os mosquitos expostos a diferentes doses de NTBC (19.5 a 10000 µg/garrafa), tendo observado mortalidade semelhante em todos os casos, o que sugeriu que o efeito já foi máximo na menor dose testada (Figura 17). No entanto, 100% de mortalidade não foi observada, diferentemente do que foi observado na aplicação tópica ou no teste de alimentação artificial, apresentado no primeiro capítulo da dissertação. Embora preliminar, este resultado abre a possibilidade de fazer testes de impregnação em tecidos, como os usados em mosquiteiras, ou aplicações de superfícies, para simular o IRS. No caso do teste de papel filtro, existem dois tempos fixos para avaliar a sobrevivência, 1 h e 24 h. Nós decidimos fazer a impregnação do NTBC no papel, seguido por uma análise de sobrevivência, mas nenhuma mortalidade foi encontrada (Figura 16). Uma possível explicação é que o NTBC está associado ao óleo de silicone, permitindo que ele seja fortemente impregnado no papel, não afetando os mosquitos. Não obstante, mais replicações são necessárias, trabalhar com doses menores, tirar o óleo de silicone ou outras abordagens para encontrar uma resposta.

Com relação aos ensaios NTBC em *A. aegypti* infectados com o ZIKV, o resultado preliminar obtido por nós indica que doses subletais de NTBC podem reduzir a competência vetorial para transmissão do ZIKV. Isso sugere que mesmo o impacto sobre a circulação do patógeno pode ser maior do que o esperado apenas em decorrência da sua ação inseticida, ou seja, que o NTBC pode afetar a capacidade do mosquito para transmitir o vírus. Deve-se notar que no experimento realizado, trabalhamos com um título de 10^7 PFU/ml, o que é muito difícil que exista na natureza, por isso mais para frente pretendemos fazer testes com um título viral mais baixo.

Além disso, uma avaliação exata deste efeito exigirá antes de mais nada a replicação deste experimento maior número de vezes, como sua extensão a outras espécies virais, além de um esforço de modelagem que avalie o possível impacto na transmissão.

4 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Existem diferentes métodos para o controle de doenças transmitidas pelos mosquitos. Em alguns casos, foram desenvolvidos fármacos que agem nos patógenos causadores das doenças, como a quinina, cloroquina e artemisinina para o controle da malária (ASHLEY; PHYO, 2018; GACHELIN et al., 2017; TRAPE et al., 1998; TU, 2016). No caso das arboviroses não existem fármacos eficazes e, embora muitos grupos estejam tentando desenvolver vacinas, até agora não existem vacinas eficazes para dengue, zika e chikungunya, apenas para a febre amarela (SCOTT, 2016; TAN; PETTIGREW, 2017). Portanto, até o momento o controle do vetor é a medida mais utilizada para o controle destas doenças, onde o controle químico através do uso de inseticidas continua sendo um dos mais importantes. A maioria desses inseticidas empregados atualmente são neurotóxicos (COSTA et al., 2008; VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Mas, devido ao uso constante e indiscriminado, tem sido relatada resistência aos inseticidas comuns, portanto, são necessários compostos com mecanismos de ação diferentes (FERRARI, 1996; ZAIM; GUILLET, 2002). É por isso que nesta dissertação procuramos testar os inibidores químicos da HPPD em mosquitos.

No presente trabalho, observamos que os inibidores químicos da HPPD afetam a sobrevivência dos mosquitos. Três inibidores químicos da HPPD foram testados (NTBC, MES, IFT) em *A. aegypti*, tanto por aplicação tópica como por alimentação artificial. O mais potente foi NTBC. Portanto, este composto foi utilizado para os seguintes ensaios. NTBC também mostrou efeito em outras espécies de mosquitos, *A. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*. Também foi avaliado o NTBC em populações de *A. aegypti* de campo resistentes a inseticidas neurotóxicos, como OP e PI. Quando testes de alimentação artificial foram realizados, não foram encontradas diferenças entre as populações de campo e o controle (Rockefeller). Por outro lado, no teste de aplicação tópica, foi observada diferença entre as populações de *A. aegypti* resistentes a inseticidas e o linhagem Rockefeller. Uma discussão mais detalhada desses resultados foi feita no manuscrito anexo e não será repetida aqui.

É a primeira vez que o efeito dos inibidores químicos da HPPD é avaliado, a fim de procurar novas estratégias para o controle dos mosquitos. Um aspecto único desses compostos é que o seu efeito tóxico se manifesta apenas em insetos que foram previamente alimentados com sangue, sendo, seletivos para artrópodes de

hábitos hematófagos (STERKEL *et al.*, 2016). Esse aspecto os distingue dos compostos que atualmente são utilizados para o controle de mosquitos, uma vez que os inseticidas convencionais (OC, OP, CA, PI), atuam em todos os grupos de insetos, sejam fitófagos ou hematófagos ou de outro tipo de hábito alimentar. No presente trabalho, observamos que os três inibidores da HPPD reduziram a sobrevivência dos mosquitos. Curiosamente, embora o alvo dos três compostos testados seja a mesma enzima, os três inibidores tiveram uma resposta diferenciada.

Tanto nos testes de aplicação tópica quanto na alimentação artificial o NTBC apresentou maior toxicidade que os demais compostos. O fato de poder atravessar a cutícula oferece a possibilidade de ser aplicado de maneira semelhante à utilizada nos inseticidas utilizados atualmente no controle de mosquitos. Mas acreditamos que o uso da via oral de administração de um inseticida não tóxico para populações humanas não deve ser descartado como uma alternativa para controle de vetores de doenças humanas. Há experiências promissoras de administração massiva de ivermectina, que demonstram um efeito sistêmico para o controle de piolhos, mosquitos e outros artrópodes (AMEEN *et al.*, 2010). Em outro estudo se conseguiu diminuir a expectativa de vida de *A. gambiae* que se alimentam de indivíduos recentemente tratados com ivermectina, embora o efeito de droga persista por um período menor de seis dias (SMIT *et al.*, 2016, 2018). Recentemente, se relatara o uso oral da fluralaner e afoxolaner (grupo das isoxazolininas) em humanos, drogas de uso veterinário, para o controle de *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Phlebotomus* (MIGLIANICO *et al.*, 2018).

Tomados como um conjunto, os resultados aqui mostrados sugerem que o NTBC pode ser adotado como um “composto líder” (leading compound) a partir de qual podem-se desenvolver melhores compostos que atuem nesta enzima. Deve-se notar que não há relatos sobre os inibidores de HPPD de insetos. Esse caminho deve usar estratégias de docking molecular para selecionar os melhores inibidores de HPPD de mosquitos e, em seguida, seguir novos testes de laboratório.

Todos os métodos têm um grão de impacto ou risco, mesmo as metodologias atuais como as novas propostas. O controle químico tem efeito residual, que pode ser positivo ou negativo, prejudica muitas vezes a organismos não alvo, tais como organismos benéficos ou, no caso dos neonicotinóides, efeitos tóxicos têm sido relatados em abelhas (FAIRBROTHER *et al.*, 2014). O controle biológico é um método de grande importância, mas alguns estudos relataram o efeito do parasitoides

Compsilura concinnata sobre organismos não-alvo, o que pode originar um desequilíbrio ecológico (BOETTNER; ELKINTON; BOETTNER, 2000; ELKINTON; PARRY; BOETTNER, 2006). Os inibidores da HPPD também podem ter seus riscos, portanto, tem que ser estudados. Então até agora o que nós podemos concluir é que não existe uma “bala mágica” que extermine com todas as doenças espalhadas pelos mosquitos, de fato, se houver mais ferramentas seria muito melhor (ALPHEY *et al.*, 2013; VALLE, 2016). Essas ferramentas devem fazer parte de um controle integrado de vetores (CIV), onde a participação da comunidade é fundamental (VALLE, 2016).

Portanto, não devemos basear o controle dessas doenças somente num método, como por exemplo, só vacinas, só terapias com drogas, só inseticidas ou outro tipo de estratégia individualmente. Na história do controle da malária e seu mosquito vetor se tem que com o descobrimento do DDT houve uma diminuição nos casos, mas depois foi implementada a monoterapia com cloroquina contra o parasito *Plasmodium*, sem dar muita importância ao controle do vetor, relatando-se resistência na África (TRAPE *et al.*, 1998). Portanto, um aspecto importante é o desenvolvimento de ferramentas para o controle do agente etiológico e também do vetor.

Finalmente, da mesma forma que a maioria dos organismos, os insetos tendem a se adaptar a pressões seletivas variadas. Na época de Paul Muller, pensava-se que o DDT terminaria com as doenças como malária ou tifo, somente por mencionar algumas (MÜLLER, 1948). Depois apareceram os PI, que prometiam ser eficazes para o controle de insetos, e agora a resistência a estes compostos está bastante estabelecida em todo o globo para inúmeras espécies de insetos (ALI KHAN; AKRAM; LEE, 2018; MACORIS *et al.*, 2018; WANJALA *et al.*, 2015). Atualmente, os IGRs, especialmente os inibidores da síntese de quitina, estão sendo utilizados para o controle de larvas de *A. aegypti*, mas já existem alguns estudos mostrando tolerância ao diflubenzuron e pyriproxyfen, e também resistência ao metopreno no mosquito *Ochlerotatus nigromaculis* (CORNEL *et al.*, 2002; MARCOMBE *et al.*, 2011). Por outro lado, no controle de pragas agrícolas, vem-se utilizando a rotação de cultivos para fazer frente ao problema ocasionado pelos insetos, mas existem estudos que mostram a adaptação de *Diabrotica barberi* a rotação de soja-milho, que não é um método de controle químico (LEVINE *et al.*, 2002).

Portanto, se nós olhamos para todos esses exemplos mencionados acima à luz da hipótese da “rainha vermelha” inicialmente proposta por Leigh Van Vallen (VAN VALEN, 1973) no sentido de que, ao utilizar diferentes ferramentas, estamos

oferecendo uma pressão de seleção que vai favorecer populações resistentes ou outro mecanismo de adaptação por parte dos mosquitos. Para lidar com essa resposta, precisaremos de inseticidas mais potentes, maiores quantidades do mesmo inseticida ou estratégias alternativas de controle (correr mais rápido) para controlar esses insetos, evitar que estas doenças continuem se espalhando pelo planeta e, portanto, ficar livres dessas doenças (ficar no lugar). Depois possivelmente os mosquitos terminarão adaptando-se as novas estratégias e assim o círculo continuará. Mas não devemos ficar no mesmo lugar, temos que procurar novas soluções, implementando metodologias de acordo com cada realidade ou melhorar aquelas que já estão sendo usadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, Fernando; ZAMORA-PEREA, Elvira; LUZ, Sérgio L. B. Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–22, 2017.

AGRAWAL, V. K.; SASHINDRAN, V. K. Lymphatic filariasis in India: Problems, challenges and new initiatives. **Medical Journal Armed Forces India**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 359–362, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0377-1237\(06\)80109-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-1237(06)80109-7)>

AHRENS, Hartmut et al. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors in combination with safeners: Solutions for modern and sustainable agriculture. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 52, n. 36, p. 9388–9398, 2013.

ALI KHAN, H. A.; AKRAM, W.; LEE, S. Resistance to Selected Pyrethroid Insecticides in the Malaria Mosquito, *Anopheles stephensi* (Diptera: Muscidae), From Punjab, Pakistan. **J Med Entomol**, [s. l.], n. February, p. 1–4, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29346647>>

ALOUT, Haoues et al. Evaluation of ivermectin mass drug administration for malaria transmission control across different West African environments. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 13, p. 417, 2014.

ALPHEY, Luke et al. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 107, n. 4, p. 170–179, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773213Y.0000000095>>

AMEEN, Mahreen et al. Oral ivermectin for treatment of pediculosis capitis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 991–993, 2010.

ANDRIGHETTI, Maria T. M. et al. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INSETICIDA MALATHION APLICADO SOB A FORMA DE ULTRA BAIXO VOLUME COM EQUIPAMENTOS PORTÁTIL E PESADO SOBRE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 81–95, 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/23588>>

ANTONENKO, Anna M. et al. Mechanism of action of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide on homoterm animals and humans. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 149–154, 2015. Disponível em: <<http://2768.indexcopernicus.com/abstracted.php?level=5&ICID=1186496>>

APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. **J Econ Entomol**, [s. l.], v. 68, n. 2,

p. 153–157, 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1127166>>

ASHLEY, Elizabeth A.; PHYO, Aung Pyae. Drugs in Development for Malaria. **Drugs**, [s. l.], v. 78, n. 9, p. 1–19, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>>

BEATY, Barry; MARQUARDT, William. **The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996.

BEAUDEGNIES, Renaud et al. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors-A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 4134–4152, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.015>>

BELTRÁN, Estelle et al. Fate of isoxaflutole in soil under controlled conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 146–151, 2003.

BENELLI, Giovanni; JEFFRIES, Claire L.; WALKER, Thomas. Biological control of mosquito vectors: Past, present, and future. **Insects**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1–18, 2016.

BERENBAUM, May R.; JOHNSON, Reed M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, [s. l.], v. 10, p. 51–58, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>>

BLACK, William C.; ALPHEY, Luke; JAMES, Anthony A. Why RIDL is not SIT. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 362–370, 2011.

BOËTE, Christophe; REEVES, R. Guy. Alternative vector control methods to manage the Zika virus outbreak: More haste, less speed. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. e363, 2016.

BOETTNER, George H.; ELKINTON, Joseph S.; BOETTNER, Cynthia J. Effects of a biological control introduction on three nontarget native species of saturniid moths. **Conservation Biology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1798–1806, 2000.

BONIZZONI, Mariangela et al. Comparative Transcriptome Analyses of Deltamethrin-Resistant and -Susceptible *Anopheles gambiae* Mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 1–11, 2012.

BOTTINO-ROJAS, Vanessa et al. The redox-sensing gene Nrf2 affects intestinal homeostasis, insecticide resistance and Zika virus susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 293, p. jbc.RA117.001589, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29685890>>

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: inseticidas,

mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>

BRIGGS, JOHN D. Principles of Integrated Control of Disease Vectors. **American Zoologist**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 567–571, 1970. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/10.4.567>>

BRITO, Luiz Paulo et al. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2013.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 159–164, 1998.

BRUNET, P. C. J. Tyrosine Metabolism I N Insects. **Annals New York Academy of Sciences**, [s. l.], n. 1956, p. 1020–1034, 1961.

BURATTINI, M. N. et al. Modelling the control strategies against dengue in Singapore. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 136, n. 3, p. 309–319, 2008.

CABONI, Pierluigi; SAMMELSON, Robert E.; CASIDA, John E. Phenylpyrazole Insecticide Photochemistry, Metabolism, and GABAergic Action: Ethiprole Compared with Fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 24, p. 7055–7061, 2003.

CAMPOS, Gubio; BANDEIRA, Antonio; SARDI, Silvia. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1881, 2015.

CARDOSO, Vanessa E. S. et al. Liver damage induced by succinylacetone: A shared redox imbalance mechanism between tyrosinemia and hepatic porphyrias. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1297–1307, 2017.

CDC. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. **CDC Methods**, [s. l.], p. 1–28, 2012.

CHAE, Sang Heon et al. Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobancha minor*. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 328–337, 2004.

CHEN, Er-Hu et al. Genome-wide annotation of cuticular proteins in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*), changes during pupariation and expression analysis of CPAP3 protein genes in response to environmental stresses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174817302175>>

CHOSIDOW, Olivier et al. Oral Ivermectin versus Malathion Lotion for Difficult-to-Treat Head Lice. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 362, n. 10, p. 896–905, 2010. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0905471>>

CHOUIN-CARNEIRO, Thaís; SANTOS, Flavia Barreto Dos. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. In: **Biological Control of pest and vector insects**. [s.l.: s.n.].

CONSOLI, Rotraut A. G. B.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço De. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1995000100027&lng=pt&tlng=pt>

CORNEL, Anthony J. et al. High level methoprene resistance in the mosquito *Ochlerotatus nigromaculis* (Ludlow) in Central California. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 58, n. 8, p. 791–798, 2002.

COSTA, Lucio G. et al. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 13, n. FEBRUARY 2008, p. 1240–1249, 2008.

CRUZ, Luiza R. et al. Malaria in South America: A drug discovery perspective. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Malaria Journal>

DAVIES, T. G. E. et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 151–162, 2007.

DIXON, David P.; EDWARDS, Robert. Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 360–366, 2006.

DOS SANTOS DIAS, Luciana. **Avaliação da persistência e efeito do spinosad no desenvolvimento e reprodução de populações brasileiras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resistentes aos inseticidas temephos e deltametrina** Rio de Janeiro FIOCRUZ, , 2015.

DOS SANTOS DIAS, Luciana et al. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

DrugBank. [s.d.].

DU, W. et al. Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 179–183, 2005.

DUTRA, Heverton Leandro Carneiro et al. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021>>

ELKINTON, Joseph S.; PARRY, Dylan; BOETTNER, George H. Implicating an introduced generalist parasitoid in the invasive browntail moth's enigmatic demise. **Ecology**, [s. l.], v. 87, n. 10, p. 2664–2672, 2006.

ELLIS, M. K. et al. **Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-Chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione** **Toxicology and Applied Pharmacology**, 1995.

ESSANDOH, John; YAWSON, Alexander E.; WEETMAN, David. Acetylcholinesterase (Ace-1) target site mutation 119S is strongly diagnostic of Anopheles gambiae carbamate and organophosphate resistance across southern Ghana. **Submitted**, [s. l.], p. 1–10, 2013.

FAIRBROTHER, Anne et al. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 719–731, 2014.

FERRARI, James. Insecticide resistance. In: J.BEATY, Barry; C.MARQUARDT, William (Eds.). **The biology of disease vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996.

FIEDLER, Erich; SOLL, Jürgen; SCHULTZ, Gernot. The formation of homogentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. **Planta**, [s. l.], v. 155, n. 6, p. 511–515, 1982.

FLORES-MENDOZA, Carmen et al. Determinação das fontes alimentares de Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, pelo teste de precipitina. **Revista de Saude Publica**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 129–134, 1996.

FLORES, Adriana E. et al. Wide Spread Cross Resistance to Pyrethroids in Aedes aegypti(Diptera: Culicidae) from Veracruz State Mexico. **Journal of Economic Entomology**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 959–969, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jee/article-lookup/doi/10.1603/EC12284>>

FONTES, Gilberto et al. Lymphatic filariasis in Brazil: Epidemiological situation and outlook for elimination. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–11, 2012.

FOY, Brian D. et al. Endectocides for malaria control. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 423–428, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.05.007>>

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 87, p. 245–254, 1990.

GACHELIN, G. et al. Evaluating Cinchona bark and quinine for treating and

preventing malaria. **Journal of the Royal Society of Medicine**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 73–82, 2017.

GARCIA, Isabelle; JOB, Dominique; MATRINGE, Michel. Inhibition of p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by the Diketone of Isoxaflutole: A Case of Half-Site Reactivity. **Biochemistry**, [s. l.], v. 39, p. 7501–7507, 2000.

GROSSMAN, Klaus; EHRHARDT, Thomas. On the mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topramezone: a new inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 63, n. December 2006, p. 429–439, 2007.

GULLAND, Anne. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 352, n. February, p. i657, 2016.

GUZZO, Cynthia A. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 1122–1133, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com.sire.ub.edu/doi/10.1177/009127002237994/abstract;jsessionid=7F6056E37CA13A8B5D3B89F77896632E.f01t04>>

HALL, Michael G. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 169–177, 2001.

HEMINGWAY, Janet; FIELD, Linda; VONTAS, John. An overview of insecticide resistance. **Science**, [s. l.], v. 298, n. 5591, p. 96–97, 2002.

HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.**, [s. l.], v. 45, p. 371–391, 2000.

HENDRICHS, J. et al. Medfly Area-wide Sterile Insect Technique Programmes for Prevention, Suppression or Eradication: the Importance of Mating Behavior Studies. **Florida Entomologist**, [s. l.], v. 85, p. 1–13, 2002.

HERTLEIN, Mark B. et al. A Review of Spinosad as a Natural Product for Larval Mosquito Control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 67–87, 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.2987/09-5936.1>>

HILDEBRANDT, Tatjana M. et al. Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015.

HIRAI, Kenji; UCHIDA, Atsushi; OHNO, Ryuta. Major Synthetic Routes for Modern Herbicide Classes and Agrochemical Characteristics. [s. l.], 2002.

HUANG, Yan-Jang; HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana. Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. **Insects**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 21, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2075-4450/8/1/21>>

INTRONE, Wendy J. et al. A 3-year randomized therapeutic trial of nitisinone in alkaptonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 307–314, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.04.016>>

KIM STREATFIELD, P. et al. Malaria mortality in Africa and Asia: evidence from INDEPTH health and demographic surveillance system sites. **Global Health Action**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

KNUDSEN, Christopher G. Discovery of the triketone class of HPPD inhibiting herbicides and their relationship to naturally occurring β -triketones. In: **Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry**. [s.l: s.n.]. p. 101–111.

KOBYLINSKI, K. C.; FOY, B. D.; RICHARDSON, J. H. Ivermectin inhibits the sporogony of Plasmodium falciparum in Anopheles gambiae. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 11, n. 381, p. 1–9, 2012. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/87/5_Suppl_1/150.full.pdf+html%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed11&AN=71041136%5Cnhttp://eleanor.lib.gla.ac.uk:4550/resserv?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=0002-9637&isbn=&volum>

KOBYLINSKI, Kevin C. et al. The effect of oral anthelmintics on the survivorship and re-feeding frequency of anthropophilic mosquito disease vectors. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 119–126, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.06.001>>

KOBYLINSKI, Kevin C. et al. Ivermectin mass drug administration to humans disrupts malaria parasite transmission in Senegalese villages. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 3–5, 2011.

KOGANEMARU, Reina; MILLER, Dini M.; ADELMAN, Zach N. Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (cimex lectularius L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 190–197, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.001>>

KOMATSUBARA, Ken-ichi et al. Discovery and development of a new herbicide, benzobicyclon. **Journal of Pesticide Science**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 113–114, 2009. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jpestics/J09-01?from=CrossRef>>

KOOL, Jacob L. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], p. 2536–2543, 2009.

KOPÁČEK, Petr; PERNER, Jan. Vector Biology: Tyrosine Degradation Protects Blood Feeders from Death via La Grande Bouffe. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, n. 16, p. R763–R765, 2016.

KOTSAKIOZI, Panayiota et al. Population genomics of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*: insights into the recent worldwide invasion. **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 7, n. 23, p. 10143–10157, 2017.

LAFICAVE. **Bioensaios utilizando papéis impregnados com inseticida**Rio de JaneiroFIOCRUZ, , 2008.

LAFICAVE. **Bioensaio dose diagnostica com garrafas impregnadas com Malathion para avaliação de resistência de *Aedes aegypti***.Rio de JaneiroFIOCRUZ, , 2017.

LAURA DE SENE AMÂNCIO ZARA, Ana et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391>

LEHANE, Mike. **The Biology of Blood-sucking in insects**. Second Edi ed. [s.l: s.n.].

LEVINE, Eli et al. Adaptation of the Western Corn Rootworm to Crop Rotation: Evolution of a New Strain in Response to a Management Practice. **American Entomologist**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 94–107, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ae/article-lookup/doi/10.1093/ae/48.2.94>>

LI, Xianchun; SCHULER, Mary A.; BERENBAUM, May R. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 231–253, 2007. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>>

LINDBLAD, B.; LINDSTEDT, S.; STEEN, G. On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 74, n. 10, p. 4641–5, 1977. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=432003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

LINDSTEDT, HOLME E, LOCK EA, HJALMARSON O, Strandvik B. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Lancet**, [s. l.], p. 813–817, 1992.

LINSS, Jutta Gerlinde Birggitt et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2014.

LIU, Nannan. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 537–559, 2015. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-010814-020828>>

LOCK, E. A. et al. From toxicological problem to therapeutic use: The discovery of the mode of action of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), its toxicology and development as a drug. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 498–506, 1998.

LOCK, Edward; RANGANATH, Lakshminarayan R.; TIMMIS, Oliver. The Role of Nitisinone in Tyrosine Pathway Disorders. **Current Rheumatology Reports**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1–8, 2014.

MACORIS, M. L.; ANDRIGHETTI, M. T.; TAKAKU, L. Efeito residual de temephòs em larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 375–377, 1995.

MACORIS, Maria de Lourdes et al. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–18, 2018.

MAJORI, Giancarlo. Short history of malaria and its eradication in Italy with short notes on the fight against the infection in the Mediterranean basin. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2012.

MARCOMBE, Sébastien et al. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 118–126, 2011.

MARSHALL, Eliot. A renewed assault on an old and deadly foe. **Science**, [s. l.], v. 290, n. Cdc, p. 428–30, [s.d.].

MARTINS, Ademir de Jesus; VALLE, Denise. The Pyrethroid Knockdown Resistance. In: SOLONESKI, Sonia; LARRAMENDY, Marcelo (Eds.). **Insecticides – Basic and Other Applications**. First edit ed. Croatia: Dejan Grgur, 2012. p. 268.

MATSUMOTO, Hiroshi et al. Herbicide pyrazolate causes cessation of carotenoids synthesis in early watergrass by inhibiting 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Weed Biology and Management**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 39–45, 2002.

MESQUITA, Rafael D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 48, p. 14936–

14941, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1506226112>>

MESSINA, Jane P. et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. **eLife**, [s. l.], v. 5, n. APRIL2016, 2016.

MIGLIANICO, Marie et al. Repurposing isoxazoline veterinary drugs for control of vector-borne human diseases. [s. l.], n. 14, p. 1–7, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília.

MITCHELL, Glynn et al. Mesotrione: A new selective herbicide for use in maize. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 120–128, 2001.

MOIROUX, Nicolas et al. Changes in anopheles funestus biting behavior following universal coverage of long-lasting insecticidal nets in benin. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 206, n. 10, p. 1622–1629, 2012.

MOREIRA, Luciano A. et al. A Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, [s. l.], v. 139, n. 7, p. 1268–1278, 2009.

MÜLLER, Paul H. Dichloro-diphenyl-trichloroethane and newer insecticides. **Nobel Lecture**, [s. l.], 1948. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1948/muller-lecture.pdf>

MUSHTAQ AHMAD, Ian Denholm and Richard H. Bromilow. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of Helicoverpa armigera from China and Pakistan. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 62, n. December 2006, p. 805–10, 2006.

MUSSO, Didier; CAO-LORMEAU, Van Mai; GUBLER, Duane J. Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, [s. l.], v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61273-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61273-9)>

NKYA, Theresia Estomih et al. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 407–416, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>>

OLIVEIRA-FERREIRA, Joseli et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 9, n. 115, p. 2–15, 2010. Disponível em: <<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/47/6/2228>>

OLIVEIRA, Henrique M. et al. Catalase protects Aedes aegypti from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika Catalase

protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. [s. l.], n. April, 2017.

OMURA, Satoshi; CRUMP, Andy. Ivermectin and malaria control. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–3, 2017.

ONOJAFE, Felix et al. Nitisinone improves eye and skin pigmentation defects in a mouse model of oculocutaneous albinism Nitisinone improves eye and skin pigmentation defects in a mouse model of oculocutaneous albinism. [s. l.], v. 121, n. SEPTEMBER, 2011.

OOI, Eng Eong; GOH, Kee Tai; GUBLER, Duane J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 887–893, 2006.

ORR, Nailah et al. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 1–5, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.04.009>>

OUÉDRAOGO, André Lin et al. Efficacy and safety of the mosquitocidal drug ivermectin to prevent malaria transmission after treatment: A double-blind, randomized, clinical trial. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 357–365, 2015.

OXBOROUGH, R. M. et al. Evaluation of indoor residual spraying with the pyrrole insecticide chlorfenapyr against pyrethroid-susceptible *Anopheles arabiensis* and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 104, n. 10, p. 639–645, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.07.008>>

OXBOROUGH, Richard M. Trends in US President's Malaria Initiative-funded indoor residual spray coverage and insecticide choice in sub-Saharan Africa (2008-2015): Urgent need for affordable, long-lasting insecticides. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016.

PAHO/WHO. Epidemiological Update Increase of malaria in the Americas. In: 2018, **Anais...** : Pan American Health Organization/World Health Organization, 2018.

PALLET, K. E. et al. The Mode of Action of Isoxaflutole. **Pesticide biochemistry and physiology**, [s. l.], v. 124, p. 113–124, 1998.

PALLET, Kenneth E. et al. Isoxaflutole: The background to its discovery and the basis of its herbicidal properties. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 133–142, 2001.

PANAHI, Yunes; POURSALEH, Zohreh; GOLDUST, Mohamad. The efficacy

of topical and oral ivermectin in the treatment of human scabies. **Annals of parasitology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 11–6, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911032>>

PANCETTI, Filipe Gabriel Menezes et al. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: A rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 87–89, 2015.

PEREIRA, Thiago Nunes et al. Wolbachia significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 6889, 2018. Disponível em: <[10.1038/s41598-018-25236-8](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25236-8)>

POCHÉ, Richard M. et al. Preliminary efficacy investigations of oral fipronil against *Anopheles arabiensis* when administered to Zebu cattle (*Bos indicus*) under field conditions. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 176, n. April, p. 126–133, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.030>>

POMPON, Julien et al. A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

POODA, Hermann S. et al. Administration of ivermectin to peridomestic cattle: A promising approach to target the residual transmission of human malaria. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–12, 2015.

POSSAS, Cristina et al. Zika puzzle in Brazil: Peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 112, n. 5, p. 319–327, 2017.

PRUETT, Billy D. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): a weapon missing from the U.S. Department of Defense's Vector Control Arsenal. **Military medicine**, [s. l.], v. 178, n. 3, p. 243–5, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707108>>

RAGHAVENDRA, Kamaraju et al. Chlorfenapyr: A new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 16, 2011. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/10/1/16>>

RAIKHEL, Alexander S. et al. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: From basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1275–1286, 2002.

RASHED, Mohamed S. et al. Tandem mass spectrometric assay of succinylacetone in urine for the diagnosis of hepatorenal tyrosinemia. **Analytical**

Biochemistry, [s. l.], v. 339, n. 2, p. 310–317, 2005.

RAYMOND-DELPECH, Valérie et al. Ion channels: Molecular targets of neuroactive insecticides. **Invertebrate Neuroscience**, [s. l.], v. 5, n. 3–4, p. 119–133, 2005.

REINERT, J. F. Revised List of Abbreviations for Genera and Subgenera of Culicidae (Diptera) and Notes on Generic and Subgeneric Changes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 51–55, 2001.

RIBEIRO, M. C. et al. An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug , *Rhodnius prolixus*. [s. l.], v. 8, n. 1, 2014.

ROBINSON, Marion. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.

ROTH, Karl S. et al. Effects of succinylacetone on methyl ct-D-glucoside uptake by the rat renal tubule. [s. l.], v. 820, p. 140–146, 1985.

ROZE, Benoit et al. Guillain-Barre Syndrome Associated With Zika Virus Infection in Martinique in 2016: A Prospective Study. **Clinical infectious diseases**, [s. l.], v. 65, n. 9, p. 1462–1468, 2017.

SALGADO, V. L. Salgado 1998-Studies on the Mode of Avtion of Spinosad Insect Symptoms and Physiological Correlates.pdf. [s. l.], v. 102, p. 12, 1998.

SANDMANN, Gerhard; LINDEN, Hartmut; BÖGER, Peter. Enzyme-Kinetic Studies on the Interaction of Norflurazon with Phytoene Desaturase. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 44, n. 9–10, p. 787–790, 1989.

SANTRA, Saikat; BAUMANN, Ulrich. Experience of nitisinone for the pharmacological treatment of hereditary tyrosinaemia type 1. **Expert opinion on pharmacotherapy**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1229–36, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422479>>

SANTUCCI, Annalisa et al. 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase and Its Inhibition in Plants and Animals: Small Molecules as Herbicides and Agents for the Treatment of Human Inherited Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 10, p. 4101–4125, 2017.

SASSA, S.; KAPPAS, A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 625–634, 1983.

SCOTT, C. Ronald. The genetic tyrosinemias. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, [s. l.], v. 142C, n. 2, p. 121–126, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278881>>

SCOTT, Lesley J. Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease. **Drugs**, [s. l.], v. 76, n. 13, p. 1301–1312, 2016.

SIDDALL, J. B. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. **Variety registry**, [s. l.], v. vol.14, n. April, p. 119–126, 1976.

SINKA, Marianne E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 69, 2012. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/69>>

SMIT, Menno R. et al. Efficacy and Safety of High-Dose Ivermectin for Reducing Malaria Transmission (IVERMAL): Protocol for a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Finding Trial in Western Kenya. **JMIR Research Protocols**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e213, 2016. Disponível em: <<http://www.researchprotocols.org/2016/4/e213/>>

SMIT, Menno R. et al. Safety and mosquitocidal efficacy of high-dose ivermectin when co-administered with dihydroartemisinin-piperazine in Kenyan adults with uncomplicated malaria (IVERMAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 615–626, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30163-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30163-4)>

SOKHNA, Cheikh; NDIATH, Mamadou Ousmane; ROGIER, Christophe. The changes of mosquito vectors behavior and the emerging resistance to insecticide will challenge the decline of malaria. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 2, p. n/a-n/a, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12314>>

SOUGOUFARA, Seynabou et al. Biting by *Anopheles funestus* in broad daylight after use of long-lasting insecticidal nets: a new challenge to malaria elimination. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 13, p. 125, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

STERKEL, Marcos et al. Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, n. 16, p. 2188–2193, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.025>>

STERKEL, Marcos et al. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 633–644, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.008>>

SUWANNARAT, Pim et al. Use of nitisinone in patients with alkaptonuria.

Metabolism: Clinical and Experimental, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 719–728, 2005.

SYLLA, Massamba et al. Mass drug administration of ivermectin in south-eastern Senegal reduces the survivorship of wild-caught, blood fed malaria vectors. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2010.

TAN, Siang Yong; PETTIGREW, Kate. Max Theiler (1899–1972): Creator of the yellow fever vaccine. **Singapore Medical Journal**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 223–224, 2017.

THOMAS, Dean D. et al. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5462, p. 2474–2476, 2000.

TOMIZAWA, Motohiro; CASIDA, John E. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 247–268, 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>>

TRAPE, Jean François et al. Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III**, [s. l.], v. 321, n. 8, p. 689–697, 1998.

TSETSARKIN, Konstantin A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TU, Youyou. Artemisinin - A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 55, n. 35, p. 10210–10226, 2016.

VALLE, Denise. Sem bala mágica: cidadania e participação social no controle de *Aedes aegypti*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 629–632, 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000300629&scielo=S2237-96222016000300629>

VALLE, Denise; NACIF PIMENTA, Denise; AGUIAR, Raquel. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200419&scielo=S2237-96222016000200419>

VALLE, Denise; PIMENTA, Denise Nacif; CUNHA, Rivaldo Venâncio Da. **Dengue: Teorias e Práticas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2015.

VAN ALMSICK, Andreas. New HPPD-inhibitors - A proven mode of action as a new hope to solve current weed problems. **Outlooks on Pest Management**, [s. l.],

v. 20, n. 1, p. 27–30, 2009.

VAN VALEN, L. A new evolutionary law. **Evolutionary theory**, [s. l.], v. 1, p. 1–30, 1973. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/344864a0>>

VIJAYAN, V. A. et al. Efficacy of piperonyl butoxide (PBO) as a synergist with deltamethrin on five species of mosquitoes. **Journal of Communicable Diseases**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 159–163, 2007.

WANJALA, Christine L. et al. Pyrethroid and DDT Resistance and Organophosphate Susceptibility among Anopheles spp. Mosquitoes, Western Kenya. [s. l.], v. 21, n. 12, 2015.

WATSON, Gerald B. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 20–28, 2001.

WERMELINGER, Eduardo Dias; FERREIRA, Aldo Pacheco. Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 49–54, 2013. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232013000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>

WHO. **Report of the WHO Informal Consultation: Tests procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces**. Geneva: World Health Organization: Parasitic Diseases and Vector Control Geneva, Switzerland WHO, , 1998.

WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. **World Health Organization**, [s. l.], p. 1–41, 2005. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1>

WHO. Spinosad DT in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. [s. l.], p. 7, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/spinosadbg.pdf>

WHO. **World Malaria Report**. [s.l: s.n.].

WHO. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes**. Second ed. [s.l: s.n.].

WILLIAMS, C. M. Third-generation pesticides. **Scientific American**, [s. l.], v. 217, n. 1, p. 13–17, 1967.

WOOD, O. R. et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in

the major malaria vector *Anopheles funestus*. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–7, 2010.

WORLD HEALTH ORGANISATION; NIH. Methods in *Anopheles* Research. **Mr4**, [s. l.], p. 1–6, 2014. Disponível em: <<https://www.beiresources.org/Publications/MethodsInAnophelesResearch.aspx>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. **Mr4**, [s. l.], p. 1–30, 2013. Disponível em: <<http://www.mr4.org/Publications/MethodsInAnophelesResearch/tabid/336/>>

YAHOUÉDO, Gildas A. et al. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZAIM, Morteza; GUILLET, Pierre. Alternative insecticides: An urgent need. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 161–163, 2002.

ZINSZER, Kate et al. Reconstruction of zika virus introduction in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 92–94, 2017.

<https://courses.cit.cornell.edu/ipm444/lec-notes/extra/ipm-history.html>

<https://www.cdc.gov/malaria/about/history/>

<http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=96>

<http://www.eliminatedengue.com/brasil>