

NADJA BIONDINE MARRIEL

EFEITOS SUBLETAIS DA DELTAMETRINA EM LARVAS DE
Aedes aegypti

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

Coorientador: Raul Narciso Carvalho Guedes

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Viçosa

T

M359e Marriel, Nadja Biondine, 1989-
2020 Efeitos subletais da deltametrina em larvas de *Aedes aegypti* /
Nadja Biondine Marriel. - Viçosa, MG, 2020.
97 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Aedes aegypti*. 2. Resistência aos inseticidas. 3. Estresse oxidativo. 4. Intestinos. 5. Cabeça. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.4323

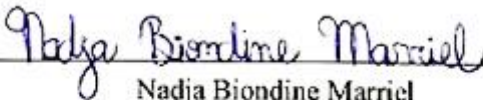
NADJA BIONDINE MARRIEL

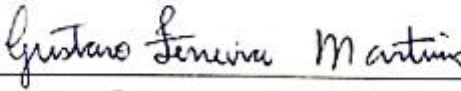
EFEITOS SUBLETAIS DA DELTAMETRINA EM LARVAS DE
Aedes aegypti

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2020.

Assentimento:


Nadja Biondine Marriel
Autora


Gustavo Ferreira Martins
Orientador

DEDICATÓRIA

*“Porque se chamavam homens também se chamavam sonhos
e sonhos não envelhecem...” (Marcio Borges, Lô Borges e Milton Nascimento)*

Dedico

*Aos meus pais, Mauro e Lúcia,
aos meus irmãos Lucas e Thais
e aos meus amigos Luiz e Palloma.
Pelo apoio, paciência, confiança, dedicação,
e companheirismo.
Eu amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

- À CAPES pela bolsa de Doutorado (código 001).
 - Ao Gustavo pelo carinho, companheirismo, paciência, excelente orientação e pelo aprendizado adquirido ao trabalhar com você. Muito Obrigada!
 - Aos professores Mariella, Eugênio, Leandro, Margareth Capurro e Helena que me acolherem e me ajudaram durante a execução dos experimentos. Certamente aprendi muito com vocês. Muito Obrigada pelo apoio e confiança.
 - À toda equipe do Núcleo de Microscopia pelo aprendizado e oportunidade de realização dos meus trabalhos.
 - Aos meus pais Mauro e Lúcia e aos meus irmãos Lucas e Thais pelo amor incondicional, apoio e confiança. Foi através dos princípios e ensinamentos aprendidos com vocês que fui capaz de chegar até aqui. Sei que não mediram esforços e sempre estiveram ao meu lado acompanhando cada passo, me incentivando, apoiando e alertando durante esse percurso. Obrigada por me ajudarem a tornar esse sonho realidade! Amo vocês!
 - Ao Luiz, que contribuiu muito para meu crescimento! Sempre presente em minha vida, ele é muito importante para mim. Durante essa jornada me acompanhou e vibrou comigo nas vitórias e me ajudou nos momentos difíceis. Muito obrigada pela paciência, apoio e carinho. Amo você!
 - Palloma pela amizade sincera, ensinamentos, risos e companheirismo, sem dúvidas a jornada foi mais leve, pois você esteve ao meu lado. Com você aprendi que na vida tudo é uma questão de equilíbrio. É isso aí! Deus no comando e a gente aqui na Terra. Muito obrigada por tudo!
 - Ao Rafael, Luiz, Andréia e Sarah, pelo apoio e todo carinho nessa reta final. Amo Vocês!
 - À Renata, Wagner Barbosa, Roberto, Kenner, Raquel e Taís por me acompanharem nessa caminhada, e por me permitir fazer parte de um time vencedor. Muito obrigada por me ajudarem na execução dos experimentos, pela acolhida, amizade, aprendizado, preocupação e momentos de alegria.
 - À Luiza, Bárbara, Thiago, Gabriela, Camila, Sabrina, Guigo, Índio e Filipe, pelo companheirismo, amizade, carinho e principalmente compreensão e paciência por entender pela minha ausência. Já compartilhamos aflições e vitórias ao longo de nossa caminhada e muito sucesso ainda está por vir para todos nós! Muito obrigada por tudo!
- Obrigada a todos vocês que contribuíram para essa realização, assim sigo meu caminho na certeza de que nunca caminharei sozinha!

RESUMO

MARRIEL, Nadja Biondine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2020. **Efeitos subletais da deltametrina em larvas de *Aedes aegypti***. Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

O *Aedes aegypti* tem sido objeto de inúmeros estudos devido à sua relevância epidemiológica. Nesse sentido, vários trabalhos têm considerado a relação da utilização de inseticidas e mecanismos de resistência no mosquito. Tendo em vista que, a deltametrina é um dos compostos usados no controle do mosquito, a presente tese constitui um estudo dos efeitos subletais da deltametrina em larvas de quarto instar (L4) de linhagens resistentes e suscetíveis de *Ae. aegypti*, avaliando o estresse oxidativo e os danos teciduais no intestino e gânglio cerebral. O primeiro capítulo da tese é um artigo de revisão sobre os efeitos subletais da deltametrina, focado em *Ae. aegypti*. Nele são detalhados o mecanismo de ação do inseticida, aspectos relacionados à resistência, tais como mutações, resistência metabólica, cuticular e os efeitos subletais propriamente ditos. O segundo capítulo versa sobre a análise comparativa dos efeitos subletais da deltametrina em larvas L4 resistentes e suscetíveis de *Ae. aegypti*. O terceiro capítulo embora tenha como objeto de estudo o *Ae. aegypti*, não trata de experimentos referentes ao assunto principal da tese. Ele trata dos resultados obtidos com a infecção da glândula salivar de fêmeas de *Ae. aegypti* pelo Zika vírus.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Deltametrina. Estresse oxidativo. Intestino. Cabeça.

ABSTRACT

MARRIEL, Nadja Biondine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2020. **Sublethal effects of deltamethrin in *Aedes aegypti* larvae.** Advisor: Gustavo Ferreira Martins. Co-adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes.

Aedes aegypti has been the subject of numerous studies due to its epidemiological importance. In this sense, several studies have considered the relationship between the use of insecticides and resistance mechanisms in mosquitos. Considering that deltamethrin is one of the most compounds used in water to control mosquito immature, the present work studied the sublethal effects of deltamethrin in fourth instar larvae (L4) of a resistant strain and a susceptible strain of *Ae. aegypti*, evaluating oxidative stress and tissue damage in the midgut and head of the L4. This work has three chapters: the first chapter is a review article about the sublethal effects of deltamethrin in *Ae. aegypti*. It details the mechanism of action of the insecticide, aspects related to resistance, including mutations, metabolic, cuticular resistance, and sublethal effects. The second chapter regards the comparative analysis of the sublethal effects of deltamethrin in resistant and susceptible L4 of *Ae. aegypti*. The third chapter is an extra chapter that brings the results obtained at the beginning of the doctorate, in which the infection of the salivary gland in females of *Ae. aegypti* by the Zika virus was performed.

Keywords: *Aedes aegypti*. Deltamethrin. Oxidative stress. Intestine. Head.

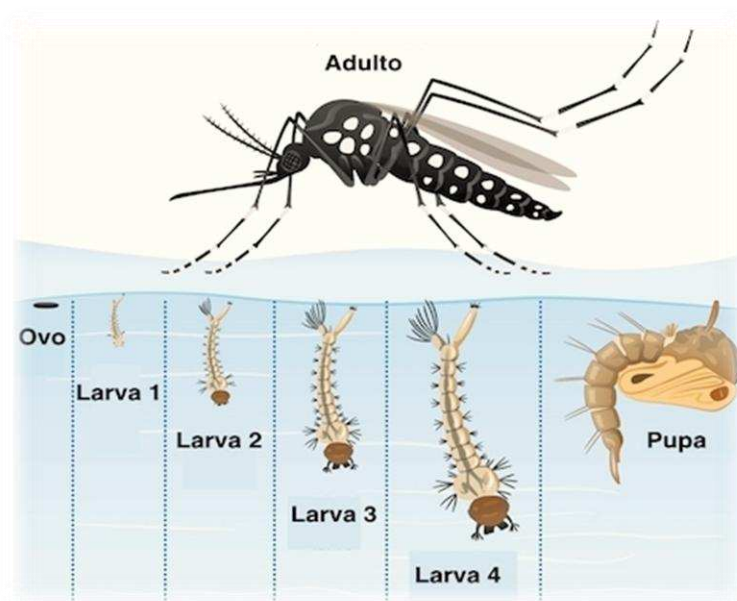
SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO GERAL	8
1. JUSTIFICATIVA.....	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.1.1 Objetivos específicos.....	14
3. REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 1 – Review: The sublethal effects of deltamethrin in <i>Aedes aegypti</i>	19
ABSTRACT	19
1. INTRODUCTION.....	20
2. RESISTANCE.....	21
2.1 <i>Metabolic resistance</i>	22
2.2 <i>Mutation</i>	22
2.3 <i>Cuticular resistance</i>	23
3. SUBLETHAL EFFECTS	24
4. CONCLUSION	27
5. REFERENCES.....	28
CAPÍTULO 2 – Efeitos subletais da deltametrina em larvas L4 de <i>Aedes aegypti</i>	41
RESUMO	41
1. INTRODUÇÃO	42
4. DISCUSSÃO.....	60
5. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 3 EXTRA - A glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i> e o Zika Vírus	72
1. JUSTIFICATIVA.....	77
2.OBJETIVOS	77
2.1 Objetivo geral.....	77
2.1.1. Objetivos específicos.....	77
3. REFERÊNCIAS	78
RESUMO	84
1. INTRODUÇÃO	85
2. MATERIAIS E MÉTODOS	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4. REFERÊNCIAS	93

APRESENTAÇÃO GERAL

O *Aedes aegypti*, comumente conhecido no Brasil como mosquito da Dengue, é uma espécie pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Consoli et al., 1994). Devido à sua grande capacidade de adaptação aos ambientes urbanos este mosquito está distribuído por quase todo o mundo, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (Consoli et al., 1994). Essa espécie possui um ciclo de vida com duração de 15 a 30 dias (que pode variar dependendo das condições ambientais), que compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adultos, como indicado na Figura 1 (Bezerra et al., 2006). Os ovos são depositados em lugares úmidos, próximos a linha d'água, os embriões levam cerca de dois a três dias para se desenvolverem e eclodirem se as condições forem adequadas (Costa, 2001).

Figura 1 - Desenho esquemático do ciclo de vida de *Aedes aegypti*.



Fonte: Disponível em: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti>. Acesso em 05 de jun. 2020.

O *Ae. aegypti* é um mosquito de hábito diurno com maior atividade no período vespertino. Apenas as fêmeas são hematófagas e utilizam as mais diversas categorias de vertebrados, mas preferencialmente o homem como fonte de alimento, desde que estejam próximos a seus criadouros e abrigos (Consoli et al., 1994). A rápida urbanização, a expansão geográfica de *Ae. aegypti* e o aumento da mobilidade humana, contribuem para o aumento da

transmissão do vírus da Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela e Mayaro pelo mosquito (Bhatt et al., 2013; Lednicky et al., 2016; Kraemer et al., 2015; Wikan, 2016; Grobbelaar et al., 2016). Sendo assim, o combate ao vetor se apresenta como a maneira de controlar as doenças transmitidas pelo mosquito. Para isso, o governo realiza campanhas que estimulam a participação da população, e por meio de ações da vigilância sanitária promove a remoção de criadouros larvares (Zara et al., 2016).

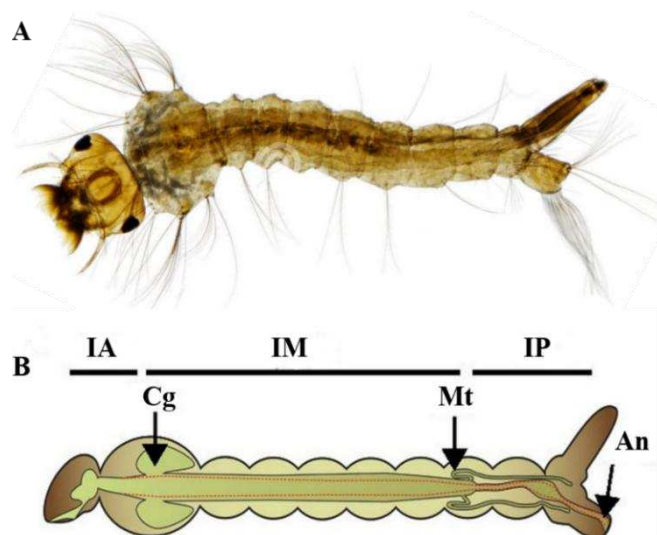
O uso de controle químico com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica ainda é um dos métodos mais adotados no controle de vetores em Saúde Pública, incluindo os mosquitos (Rose, 2001). Dentre os compostos orgânicos utilizados destacam-se aqueles pertencentes principalmente aos grupos dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (Braga & Valle, 2007), sendo que todos atuam sobre o sistema nervoso central (Mellon & Georghiou, 1984; Palchick, 1996). Embora o uso de inseticidas seja a estratégia de controle mais adotada, ela apresenta como principais problemas o aparecimento de populações resistentes e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (Polanczyk et al., 2003; Luna et al., 2004; Haddi et al., 2017).

A deltametrina, piretroide tipo II, é utilizado como inseticida e acaricida em todo o mundo devido à sua potência inseticida e baixa toxicidade para aves e mamíferos (Anadón et al., 2009; Chargui et al., 2012; Anadón et al., 2013). Os insetos apresentam diferentes mecanismos de resistência a inseticidas incluindo a resistência metabólica (quando o inseticida é metabolizado em uma taxa mais alta do que o habitual), sensibilidade reduzida dos locais alvo de ação do inseticida, resistência cuticular, e resistência comportamental (Kushwah et al., 2020). Dos mecanismos relatados, em *Ae. aegypti*, o aumento na desintoxicação em função da atividade das enzimas P450-monooxigenases e mutações nos genes dos canais de sódio dependentes de voltagem, são as mais documentadas como responsáveis pela resistência aos piretroides (Valle et al., 2015). Esses fatores alertam a comunidade científica para que haja um devido acompanhamento e avaliação dos métodos de controle utilizados.

Muitos dos inseticidas usados no controle de *Ae. aegypti* são administrados em larvas em seu ambiente natural ou em condições de laboratório, sendo este estágio o principal período de alimentação e crescimento. Nesse sentido, tendo em vista que o intestino médio é altamente representativo da interconexão entre as larvas e seu ambiente (Klowden, 2013), vários estudos tem relatado os efeitos de diferentes classes de inseticidas no intestino médio de insetos tais como imidaclopride, espinosade, e também de compostos naturais com efeitos larvicidas (Alves et al., 2010; Fernandes et al., 2015; Silva Costa et al., 2016; Paiva et al., 2017; Fernandes et al., 2019).

O *Ae. aegypti* possui um intestino médio composto por uma única camada celular circundada por uma membrana basal, fibras musculares, fibras nervosas e traqueias (Figura 2). O epitélio intestinal é composto por diferentes tipos celulares: células digestivas, regenerativas e enteroendócrinas. As células digestivas possuem microvilosidades, produzem enzimas digestivas e absorvem produtos de digestão. Entre essas células estão células-tronco, pequenas e indiferenciadas, que podem ser isoladas, em pares ou em pequenos grupos, por todo o intestino médio (Hecker et al., 1971,1977; Brown et al., 1985). Trata-se de um órgão importante para os insetos, uma vez que desempenha papéis críticos na fisiologia tais como: digestão, resposta imune, homeostase de eletrólitos, além de ser alvo de patógenos (Black IV et al., 2002; Abraham e Jacobs-Lorena, 2004; Terra et al., 2006; Wen et al., 2018; Kumar et al., 2018).

Figura 2 - Larva L4 de *Aedes aegypti*



(A) Larva L4 de *Aedes aegypti* e (B) Desenho esquemático do trato digestório. IA: intestino anterior; IM: intestino médio; IP: intestino posterior; Cg: ceco gástrico; Mt: microtúbulos; An: anus. Fonte: Adaptado de Valzania et al., 2018.

Durante a metamorfose, o epitélio do intestino médio de *Ae. aegypti* passa pelo processo de remodelação. Nesse período ocorre a diferenciação e proliferação celular, no qual o epitélio larval é renovado e as células diferenciadas são substituídas a partir da diferenciação de células-tronco ou células regenerativas (Fernandes et al., 2014). O tratamento com inseticidas pode interferir nesse processo, danificar o epitélio e pode ser prejudicial ao adulto. Em larvas de quarto ínstar de *Ae. aegypti*, o tratamento com imidaclopride, afetou a remodelação do intestino médio inibindo a proliferação e diferenciação de células regenerativas (Fernandes et al., 2015).

Sabe-se que vários estressores químicos (pesticidas, drogas e metais) físicos (radiação, temperatura e ruído) e fisiológicos (doenças, lesões, envelhecimento e inflamação) podem provocar uma situação de estresse que perturba a homeostase. Uma dessas situações é denominada estresse oxidativo e é caracterizada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kodrík et al., 2015). O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio, na qual a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora (Barbosa et al., 2010).

Não só agentes externos podem provocar estresse oxidativo, mas também as atividades inerentes ao estilo de vida aeróbico promovem um desequilíbrio no balanço de oxigênio. A geração de EROs constitui um processo biológico essencial no organismo e estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade, defesa celular e síntese de substâncias biológicas. Dessa maneira, sua produção ocorre por fontes endógenas do sistema enzimático, NADPH no retículo endoplasmático e nos peroxissomos, ATP e subprodutos do metabolismo celular (Ferreira et al., 1997; Barbosa et al., 2010).

Concentrações aumentadas de EROs resultam em dano oxidativo para proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e, portanto, funções de células, órgãos ou todo o organismo podem ser seriamente interrompidos, levando à morte. Para controlar esses danos, os organismos desenvolveram sistemas de defesa eficazes controlados por centros nervosos e endócrinos. Em mamíferos, as vias de resposta ao estresse são controladas a partir do centro cerebral hipotalâmico-hipofisário com a ajuda de um conjunto de hormônios correspondentes. Já nos insetos, as reações anti-estresse oxidativo parecem ser reguladas predominantemente por hormônios adipocinéticos (AKHs) que são secretados pela *corpora cardiaca* - uma pequena glândula neuroendócrina conectada ao cérebro (Kodrík et al., 2015).

Os insetos possuem um sistema de defesa antioxidante que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático e não-enzimático (Barbosa et al., 2010). As enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione transferase e glutathione redutase (GST; GSR) são bem caracterizadas em insetos (Felton & Summers, 1995). A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais enzimas que atua no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio (Chandran et al., 2005). Eucariotos apresentam duas formas da enzima: uma contendo manganês, encontrada na mitocôndria e

outra com zinco e cobre, localizada no citoplasma (Berg et al. 2004). O substrato da SOD é o radical superóxido gerado, normalmente, nos organismos aeróbicos durante o processo de oxidação. As SODs convertem o ânion radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Wang et al., 2018).

O peróxido de hidrogênio também é gerado endogenamente pela xantina oxidase, aminoácido oxidase e NAD (P) H oxidase em peroxissomos, e ele pode facilmente se difundir através da membrana plasmática (Kodrík et al., 2015). A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, contribuindo com uma radical hidroxila (Aebi, 1984).

A Glutathione S-transferase (GST) está envolvida na desintoxicação de compostos endógenos e exógenos e tem papel fundamental no metabolismo de inseticidas (Hayes et al., 1995; Ranson & Hemingway, 2005). A GST desempenha um papel nas reações da fase II, estando envolvida com a transformação de moléculas, principalmente aldeídos produzidos em lipídios, peroxidação, contribuindo para a desintoxicação do corpo. Assim, as moléculas tornam-se mais solúveis em água e, portanto, pode ser excretado mais facilmente (Hayes et al., 2004). As GSTs também conferem resistência devido à sua atuação na desintoxicação de produtos de peroxidação lipídica induzida por piretroides, protegendo, dessa maneira, os tecidos do dano oxidativo (Vontas et al., 2001).

A exposição ao inseticida além provocar danos teciduais, comportamentais e fisiológicos, também provoca estresse oxidativo. A exposição do gafanhoto *Nilaparvata lugens* a diferentes concentrações permetrina e λ -cialotrina induziu à peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. As GSTs elevadas nas linhagens resistentes do gafanhoto atenuaram a peroxidação lipídica induzida pelo piretroide e reduziram a mortalidade (Vontas et al., 2001).

A atividade de CAT aumentou nos coleópteros *Pyrrhocoris apterus* e *Tribolium castaneum* após a exposição a pirimifos-metilo e deltametrina, o que indica que a superprodução de peróxido de hidrogênio não é exclusivamente atribuível à atividade da enzima SOD. Além disso os inseticidas estimularam a atividade da enzima GST (Kodrík et al., 2015). Estes dados mostram que piretroides, além de serem neurotóxicos, induzem estresse oxidativo e peroxidação lipídica em insetos.

Os efeitos subletais dos inseticidas podem repercutir sobre as atividades cruciais dos insetos tais como: a respiração, forrageamento, busca de refúgio e evasão, alimentação e desenvolvimento. Por exemplo, larvas e pupas de *Ae. aegypti* expostas a concentrações crescentes de deltametrina, imidaclopride e espinosade reduziram a velocidade de natação e movimentos de contorção (Tomé et al., 2014). Uma tendência semelhante foi também

observada para pupas expostas, com exceção de imidacloprid, o que aumentou a atividade de natação (Tomé et al., 2014). Esses efeitos devem ser avaliados para melhor entendimento da biologia do mosquito e a partir desses dados contribuir para uma avaliação dos métodos de controle.

1. JUSTIFICATIVA

O *Ae. aegypti* é o vetor dos vírus causadores da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya, Mayaro e Zika. Dentre as medidas de controle do mosquito está a utilização de inseticidas, como o piretroide deltametrina. O uso intensivo e prolongado de inseticidas pode selecionar espécimes resistentes nas populações de vetores naturais, diminuindo a frequência de indivíduos suscetíveis e reduzindo a variabilidade das populações de campo. Nesse sentido, os estudos direcionados ao esclarecimento dos aspectos envolvidos nos efeitos do inseticida em populações suscetíveis e resistentes contribuem para um melhor entendimento da biologia do mosquito.

O principal ponto de ação da deltametrina são os canais de sódio, onde ela atua provocando alterações nas funções desses canais, interferindo na abertura e fechamento deles, prolongando a entrada dos íons Na^+ para o interior do neurônio. Esse mecanismo de ação já é bem estudado e descrito em níveis moleculares, no entanto os efeitos no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* ainda foram pouco explorados. O estágio larval é o principal período de alimentação e crescimento desses insetos e muitos dos inseticidas testados para o controle populacional são administrados em larvas em seu ambiente natural. Por isso, usamos esse estágio como modelo experimental e direcionamos o estudo para análise de possíveis efeitos da deltametrina, avaliando aspectos bioquímicos em termos de estresse oxidativo e expressão de proteínas no intestino médio de larvas resistentes e suscetíveis. Essas análises são fundamentais para elucidar os aspectos fisiológicos dos insetos vetores de interesse epidemiológico submetidos a doses subletais de inseticida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar os efeitos subletais da deltametrina em larvas do quarto ínstar (L4) de *Ae. aegypti* das linhagens suscetíveis e resistentes.

2.1.1 Objetivos específicos

- Estabelecer a curva de sobrevivência após o tratamento das L4 das duas populações com concentrações subletais de deltametrina;
- Descrever os efeitos subletais da deltametrina no intestino médio e cabeça de L4 das duas populações após 24h e 48h de exposição.
- Avaliar o status oxidante por meio das dosagens das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione transferase e glutathione reductase (GST) nas L4 das duas populações;
- Investigar a expressão de proteínas *in situ* por métodos imunocitoquímicos no intestino médio das L4 das duas populações tratadas com deltametrina.

3. REFERÊNCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. In Methods in Enzymology (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press.
- Abraham, E. G., & Jacobs-Lorena, M. (2004). Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34(7), 667-671.
- Alves, S. N., Serrão, J. E., & Melo, A. L. (2010). Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. Micron, 41(6), 592-597.
- Anadon, A., Arés, I., Martínez, M. A., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2013). Pyrethrins and synthetic pyrethroids: use in veterinary medicine. Handbook of Natural Products. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1-25.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. The Veterinary Journal, 182(1), 7-20.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, 23(4), 629-643.

- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L. (2004). Bioquímica. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Beserra, E. B., Fernandes, C., Castro Jr, F. P., Santos, J. W., & Santos, T. S. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35, 853-860.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., & Myers, M. F. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.
- Black IV, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M., & Beaty, B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, 33(4), 379-388.
- Braga I A., & Valle D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 279-293.
- Brown, M. R., Raikhel, A. S., & Lea, A. O. (1985). Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue and Cell*, 17(5), 709-721.
- Chargui, I., Grissa, I., Bensassi, F., Hrira, M. Y., Haouem, S., Haouas, Z., & Bencheikh, H. (2012). Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): a molecular assessment. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(6), 672-683.
- Consoli, R. A., & de Oliveira, R. L. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. SciELO-Editora FIOCRUZ.
- Costa M A R. (2001). A ocorrência do *Aedes aegypti* na região noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí-1999, na perspectiva da geografia médica [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita/Presidente Prudente.
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29 (2), 187-197.
- Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2014). *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, 63(3), 506-512.
- Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2015). *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, 63(3), 506-512.

- Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Miranda, F. R., Gonçalves, W. G., Pascini, T. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2019). *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, 221, 464-470.
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61-68.
- Grobbelaar, A. A., Weyer, J., Moolla, N., van Vuren, P. J., Moises, F., & Paweska, J. T. (2016). Resurgence of yellow fever in Angola, 2015–2016. *Emerging Infectious Diseases*, 22(10), 1854.
- Haddi, K., Tomé, H. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., & Oliveira, E. E. (2017). Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific Reports*, 7, 46549.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2004). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 51-88.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445-520.
- Hecker, H. (1971). Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta Diptera) Imagines. *Acta Tropica*, 28, 80-104.
- Hecker, H. (1977). Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). *Cell and Tissue Research*, 184(3), 321-341.
- Klowden MJ. *Physiological Systems in Insects*. (2013.) 3rd edition. Elsevier Academic Press: San Diego.
- Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25788-25816.
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., & Hendrickx, G. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, 4, e08347.

- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P. D. N. N., Dubey, S., Kumar, R., Shrinet, J., & Sunil, S. (2018). Mosquito Innate Immunity Insects, 9(3), 95.
- Kushwah, R. B. S., Kaur, T., Dykes, C. L., Kumar, R. H., Kapoor, N., & Singh, O. P. (2020). A new knockdown resistance (kdr) mutation, F1534L, in the voltage-gated sodium channel of *Aedes aegypti*, co-occurring with F1534C, S989P and V1016G. *BioRxiv*, 740829.
- Lednicky, J., De Rochars, V. M. B., Elbadry, M., Loeb, J., Telisma, T., Chavannes, S., & Salemi, M. (2016). Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(11), 2000.
- Luna, J. E. D., Martins, M. F., Anjos, A. F. D., Kuwabara, E. F., & Navarro-Silva, M. A. (2004). Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 38, 842-843.
- Mellon R B, Georghiou G P. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. (1984). *Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association*, 65-67.
- Paiva, D. R., Lima, D. P., Avvari, N. P., Arruda, E. J., Cabrini, I., Marques, M. R., & Beatriz, A. (2017). A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(1), 373-382.
- Palchick S. Chemical Control of Vectors. (1996). *The Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado.
- Polanczyk, R. A., Garcia, M. D. O., & Alves, S. B. (2003). Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, 37(6), 813-816.
- Ranson H Hemingway J. (2005). Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 226-241.
- Rose R I. (2001). Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 17.
- Silva Costa, M., de Paula, S. O., Martins, G. F., Zanoncio, J. C., Santana, A. E. G., & Serrão, J. E. (2016). Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. *PLOS One*, 11(8), e0160928.

- Terra, W. R., Costa, R. H., & Ferreira, C. (2006). Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(2), 255-269.
- Tomé, H. W., Tales, V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. (2014). Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 7, 195.
- Valle, D., Belinato, T. A., & Martins, A. J. (2015). Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. *Dengue: teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 93-126.
- Valzania, L., Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2018). Hypoxia-induced transcription factor signaling is essential for larval growth of the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(3), 457-465.
- Vontas, J. G., Graham, J., & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357(1), 65-72.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915-1928.
- Wen, D., Li, S., Dong, F., Zhang, Y., Lin, Y., Wang, J., & Zheng, A. (2018). N-glycosylation of viral E protein is the determinant for vector midgut invasion by flaviviruses. *MBio*, 9(1), e00046-18.
- Wikan, N., & Smith, D. R. (2016). Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e119-e126.
- Zara, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 391-404.

CAPÍTULO 1 – Review: The sublethal effects of deltamethrin in *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main vector of the viruses that cause Yellow Fever, Dengue, Chikungunya, and Zika. One of the ways to control the transmission of these pathogens is to control the vector through the use of insecticides. Deltamethrin is a pyrethroid that has been widely used in vector control due to its fast mechanism of action and low toxicity to mammals. One of the major problems related to this strategy is the emergence of resistance. Therefore, numerous studies describe mutations and mechanisms of resistance to pyrethroids in different populations of *Ae. aegypti*. Besides resistance, several studies have reported sublethal effects on viability, reproduction, behavior, and development, associated with the use of deltamethrin in susceptible and resistant populations of the mosquito. Therefore, this review is intended to complement the articles that address the effects of deltamethrin on *Ae. aegypti* and summarize the main results described so far focusing on the sublethal effects of this pyrethroid.

Keywords: *Aedes aegypti*, pyrethroid, deltamethrin, resistance.

1. INTRODUCTION

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of the dengue, chikungunya, Zika, and yellow fever viruses and is responsible for almost 100 million cases of arboviruses worldwide (Martinez et al., 2019). So far, the control of this vector is the main way to control dengue and other diseases. Among the control methods, the use of insecticides is one of the most widely used in the fight against vectors in public health (Rose, 2001).

Pyrethroids are the synthetic derivatives of pyrethrins, which in turn are toxic esters isolated from the flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae), popularly known as daisy, and related species (Nasuti et al., 2003; Spencer et al., 2001; Valentine, 1990). They are the most widely used insecticides, since they are effective against a wide spectrum of insects, have low toxicity in mammals, low environmental impact, and also low amounts are required for their performance, have a short half-life in the environment and do not bioaccumulate (Santos et al., 2007).

Pyrethroids affect the peripheral and central nervous system of insects, stimulating nerve cells to produce repetitive discharges and eventually cause paralysis and a shock effect called *knockdown* (Braga & Valle, 2007; Santos et al., 2007). These insecticides are divided into two groups: type I, which does not have the *alpha-cyanophenoxybenzyl* group; and type II, which contains the *alpha-cyanophenoxybenzyl* group, which makes the insecticide more effective (Osti et al., 2007). The mechanism of action of type I pyrethroids is based on altering the conformation of sodium channels during their opening and closing in neuronal membranes. In addition to the effects on these channels, type II pyrethroids affect the chloride channels, including GABA (gamma-aminobutyric acid) dependent. Pyrethroids are 2250 times more toxic to insects than to vertebrates (Soderlund et. al., 2002; Bradberry et al., 2005).

Deltamethrin, (*S*) -*alpha*-cyano-3-*phenoxybenzyl*- (*1R*) -*cis*-3- (2,2-dibromovinyl) -2,2 dimethylcyclopropanecarboxylate, is a type II pyrethroid used as an insecticide and acaricide (Anadón et al., 2009). This insecticide was first described in 1974 and is used to control plant ectoparasites, parasites in terrestrial animals and to control vectors of the genera *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* (Elliott et al., 1974; Kumar et al., 2011; Chandra et al., 2013; Guardiola et al., 2014).

The metabolism of deltamethrin and other xenobiotics by the target insect occurs in a process that takes place in up to three stages: in the first stage, there is the so-called phase I reactions, in which enzymes such as oxidases (for example, enzymes belonging to the large family of cytochrome P450) and esterases transform the primary compound (xenobiotic) by oxidation, reduction or hydrolysis into a more water-soluble and less toxic product than the

primary. In the second stage, known as phase II reactions, enzymes such as glutathione-s-transferases (GSTs), conjugate the resulting compound from phase 1 to an amino acid, sugar, or glutathione, to make it more soluble in water and reduce the toxicity of the product. In the last stage, the metabolites of phase 2 are converted into secondary conjugates for extracellular transport (Parkinson, 2001).

Given the importance of *Ae. aegypti*, numerous studies have evaluated the *Aedes*-deltamethrin relationship, in which aspects such as mechanisms of resistance, identification of mutations, as well as their evolution and distribution in different countries are considered (Bariami et al., 2012; Despres et al., 2014; Bonizzoni et al., 2015; Haddi et al., 2017; Estep et al., 2017; Biduda et al., 2019; Chen et al., 2019; Guedes et al., 2020). In addition to resistance, several studies have reported the sublethal effects on viability, reduction, behavior, and development, linked to the use of deltamethrin in susceptible and resistant mosquito populations (Antonio et al., 2009; Belinato et al., 2009, 2012; Belinato & Valle, 2015; Agramonte et al., 2017; Saingamsook et al., 2019). This study is based on articles addressing the effect of deltamethrin on *Ae. aegypti* and it summarizes the main results described so far.

2. RESISTANCE

Resistance is a genetic phenomenon, which involves mutations that affect the target proteins of insecticides and/or their metabolism (Li et al., 2007). The selective pressure exerted by exposure to toxic compounds, as well as the frequency of their use and the characteristics inherited from the species involved, contribute to the spread of insecticide resistance in insects (Hemingway & Ranson, 2000). Progress has been made in the development of vaccines against mosquito-borne viruses, however, several limitations remain (Deng et al., 2020; Lecouturier et al., 2020; Schrauf et al., 2020), which makes vector control, from the elimination of larval habitats and chemical control with insecticides, the main strategy to interrupt disease transmission (WHO, 2018). Two of the main mechanisms that cause resistance in mosquitos are changes in the target site of the insecticide, including mutations in the voltage-gated sodium channel gene (knockdown mutations - *kdr*) and increased metabolic resistance (Brito et al., 2013).

2.1 Metabolic resistance

Metabolic resistance in insects is caused by an increase in the detoxification activity of enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYPs for genes), carboxyl/cholinesterases (CCEs), glutathione S-transferases (GSTs) and UDP-glycosyl transferases (UDPGTs) (Hemingway et al., 2004; Ranson & Hemingway, 2005; Feyereisen, 2005; Marcombe et al., 2012; David et al., 2013; David et al., 2014). Resistance to pyrethroids is correlated with changes in the activities of the enzymes MFO and GST, which has also been observed in *Ae. aegypti* (Marcombe et al., 2009, 2012; Ranson et al., 2010; Polson et al., 2011; Viana-Medeiros, 2017; Azambuja et al., 2018; Amelia-Yap et al., 2019). In the genome of *Ae. aegypti* genome, it was found that, of the 160 genes coding for P450, 44 of them belong to the CYP6 family (Strode et al., 2008). The CYP6M6, CYP6Z8, and CYP6M11 genes have been identified as inducible by permethrin and pollutants (Marcombe S et al., 2009).

Although the enzymes of the GSTs family do not act directly on the metabolism of pyrethroids, they reduce the peroxidative damage caused by lipid peroxidation products (Vontas et al., 2001). In mosquitos, about 30 GST genes have been identified in different subfamilies. In *Ae. aegypti*, members of the epsilon GST subfamily (GSTe7 and GSTe2) were identified in strains resistant to DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and deltamethrin (Ranson et al., 2002; Lumjuan et al., 2005; 2011).

The activity of enzymes related to insecticide resistance varies between *Ae. aegypti* larvae and adults. The activity of esterase (α EST and β EST) and mixed-function oxidase (MFO) was higher in adults resistant to propoxur, temephos, and deltamethrin, treated with these insecticides. The differences observed between the stages in their levels of resistance to insecticides and the biochemical mechanisms involved must be included as part of the monitoring and surveillance activities in vector control (Bisset et al., 2014).

2.2 Mutation

Insecticides are the most effective tools to rapidly decrease the density of vector populations during disease outbreaks. However, the intense use of insecticides, mainly pyrethroids, has selected populations of resistant mosquitos worldwide. Mutations in the sodium channel-dependent of voltage are among the main mechanisms of resistance to pyrethroids and DDT, also known as resistance to “knockdown” or kdr (Brito et al., 2018; Hemingway et al., 2004).

The kdr mutation has a globally spread, since it has been reported in different countries, from America to Asia (Garcia et al., 2009; Lima et al., 2011; Linss et al., 2014; Ishak et al.,

2015; Li et al., 2015; Haddi et al., 2017; Biduda et al., 2019). There are different mutations for the sodium channels in insects, of which dozens of these sequences are found in *Ae. aegypti* (Kushwah et al., 2015, 2019; Lien et al., 2018; Chen et al., 2019). In addition, the co-occurrence of multiple mutations seems to be a common phenomenon in populations resistant to pyrethroids. So far 13 mutations have been identified in the voltage-gated sodium channel (Chen et al., 2020). Five of the mutations already described for *Ae. aegypti* have been associated with sensitivity to pyrethroids and DDT: S989P, I1011M, V1016G, F1534C, and V410L (Chen et al., 2019).

ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) act as ATP-dependent efflux pumps. They carry the transport of drugs and xenobiotics out of cells, thereby decreasing the intracellular concentration of these compounds (Chang 2003, Porretta et al, 2008, Lima et al., 2014). Although this cellular mechanism contributes to insecticide detoxification, deltamethrin-resistant *Ae. aegypti* do not depend on ABC transporters, as they present mutations that confer insensitivity to the target site and high activity of the cytochrome P450 enzyme, compared to the susceptible strain (Estep et al., 2017; Rault et al., 2019A).

Factors such as age and sex are also associated with resistance to deltamethrin. Enzymatic assays using *Ae. aegypti* males and females with different ages of resistant and susceptible strains to pyrethroid revealed that the genes CYP9J10, CYP9J19, and CYP9J28 were more expressed in resistant individuals in all ages and sexes, indicating that they may be essential for resistance. The expression of the CYP9J24, CYP9J26, CYP9J27, and CYP9J32 genes was higher in males than in females. The increased expression in males, suggests that these genes may have different functions from those linked to resistance, involved in the reproduction of insects. However, this still needs to be tested (Scott, 2008; Rault et al., 2019B).

2.3 Cuticular resistance

The insect cuticle is a natural mechanical barrier against dehydration, support for muscle fixation, as well as where pheromones are released (Gibbs, 1998,2002; Tillman et al., 1999; Howard & Blomquist, 2005; Benoit et al, 2010). Cuticular resistance is characterized by the modification of the insect's cuticle, reducing the penetration of the insecticide and consequently the number of insecticide molecules in the insect. For instance, this resistance mechanism was evidenced in the pyrethroid-resistant *Helicoverpa armigera* cotton caterpillar and other insects (Gunning et al., 1995; Ahmad et al., 2006; Juárez et al., 2010; Puinean et al., 2010; Strycharz et al., 2013). However, the details of changes in cuticular structure or composition have not been fully elucidated.

In *Anopheles gambiae* resistant to pyrethroids and DDT, mosquitos were found to reshape the cuticles in the legs by depositing cuticular proteins and chitin, making the cuticle in the legs thicker. This change in the legs is associated with reduced uptake of insecticides, contributing to resistance (Balabanidou et al., 2019).

Most insecticides, due to their lipophilic nature, penetrate insects through the cuticle. Cuticle thickening has been reported as a resistance mechanism in mosquitoes (Vontas et al., 2007; Djouaka et al., 2008; Wood et al., 2010). In *Ae. aegypti*, larvae exposed to sublethal doses of imidacloprid for 48 hours, the expression of genes encoding cuticular proteins, such as hexamerins, was induced by the treatment (David et al., 2010). The expression of genes of larvae of susceptible and resistant strains of *Ae. aegypti* increased the tolerance to imidacloprid. In this case there is an association with changes in levels of gene transcription, with genes encoding families of proteins involved in cuticle synthesis, detoxification and xenobiotic transport (Riaz et al., 2013).

In adult mosquitoes, the comparison between strains of *Ae. aegypti* susceptible and resistant to permethrin showed that there was no difference in the rate of penetration of the insecticide by the cuticle (Kasai et al., 2014). Therefore, depending on the treatment and the stage of development of the mosquito, there is a differential expression of genes that encode cuticular proteins. Although cuticular resistance may have a primary role in resistance, it commonly acts in combination with other mechanisms, and in *Ae. aegypti* is still the least understood (Ahmad et al., 2006; David et al., 2010; Kasai et al., 2014).

3. SUBLETHAL EFFECTS

Insecticides not only act on the primary target site but can also interact elsewhere in the body of the insect. This interaction may not lead to death, but it causes sublethal effects that interfere with survival, affecting its physiology, behavior, ecology, and communication (Desneux et al. 2007). In general, the determination of acute toxicity of pesticides to arthropods has been largely based on the determination of a lethal dose. However, the lethal dose may be only a partial measure of the deleterious effects. In addition to direct insecticide-induced mortality, sublethal effects must be considered for a complete analysis of their impact (Desneux et al., 2007).

Deltamethrin is known for its high residual activity and persistence in the environment (De Jong et al., 2008). Thus, the diffuse environmental pollution caused by the insecticide can lead to direct or indirect exposure of the body surface of insects (Soderlund 2004). Sublethal doses of deltamethrin interrupt various biological processes in insects. In bees, it was found that

treatment with the insecticide harmed learning, memory and resulted in cognitive impairment. Deltamethrin interfered in the foraging activity and consequently compromised the healthy development of the colony (Li et al., 2020). For instance, in aquatic insects, sublethal exposure to deltamethrin reduced the ability of *Belostoma anurum* to capture and attack *Ae. aegypti* larvae, compromising the effectiveness of these insects as natural mosquito control agents (Valbon et al., 2018). In *Callibaetis radiatus*, exposure to the pyrethroid affected the cells of the midgut, causing retraction of the muscle layer, vacuolization of the cytoplasm, disorganization of the nucleus and the striated border, in addition to inducing changes in the brain in the thoracic ganglia (Gutiérrez et al., 2016; Santos et al., 2018).

The use of pyrethroids to control vectors and pests also has different effects. Sub-lethal doses of deltamethrin in resistant *Anopheles gambiae* interfere with the development of *Plasmodium falciparum* in mosquitos, significantly reducing the proportion of infected mosquitos and the intensity of infection (Kristan et al., 2016). In pests, in addition to the sublethal effects that compromise the physiology of insects, the occurrence of hormesis has been reported, a phenomenon in which exposure to a low dose of a chemical agent or environmental factor that is harmful at higher doses, induces an effect beneficial adaptive in the cell or organism (Mattson, 2008; Cordeiro et al., 2013; Vélez et al., 2018; Lalouette et al., 2020).

It is known that resistance to insecticides can compromise the *fitness* and reproduction of the vectors (Antonio et al., 2009; Belinato et al., 2009; Belinato et al., 2012; Martins et al., 2012; Diniz et al., 2015; Brito et al., 2013; Belinato & Valle, 2015). In *Ae. aegypti* resistant to deltamethrin, changes in biological and population parameters, represent a cost associated with resistance. Probably the accumulation of deleterious or harmful effects related to detoxifying enzymes, especially those that encode MFO, and the co-occurrence of mutations V1016I and F1534C contributed to the cost of fitness (Alvarez-Gonzalez et al., 2017).

Treatment with deltamethrin interferes with the reproduction of resistant *Ae. aegypti*, which after exposure to the insecticide exhibited a 73-88% reduction in the duration of gonotrophic cycles compared to the susceptible strain. There was also a considerable decrease in egg production and hatching rates in the resistant strains compared to the susceptible strains after the treatment. Probably the reduced fecundity occurred due to the penetration of insecticides in the eggs during their formation in the ovaries (Kumar et al., 2009).

The amount of blood ingested influences the number of parasites ingested and the number of eggs laid by the insect (Belinato et al., 2009,2012; Belinato & Valle, 2015; Agramonte et al., 2017). *Ae. aegypti* females resistant to deltamethrin and temephos ingest less blood and consequently produce fewer eggs compared to the susceptible lineage (Viana-

Medeiros et al., 2017). Strains of *Ae. aegypti* resistant to DDT, permethrin, and deltamethrin have reduced egg production, in addition to the prolongation in larval development time (Saingamsook et al., 2019). Developmental delay can interfere with larvae survival, exposing them to predators or parasites for longer (Charlesworth, 1980; Agnew & Koella 1999). In addition, exposure to deltamethrin also reduced the longevity of adult resistant females. This is an important fact since the vector mosquito's longevity is related to the extrinsic incubation period of a pathogen, which is a major aspect of vector capacity (Martins et al, 2012).

Sublethal exposure to neurotoxic compounds can negatively affect the sensory organs and reduce the efficiency of the host's location. One way to affect the sensory capacity of mosquitos is through residual application and aerial spraying of pyrethroids (Kongmee et al., 2004; Cooperband, & Allan 2009; Boonyuan et al., 2011; Manda et al., 2013; Sathantriphop et al., 2020). Clothes treated with pyrethroids (deltamethrin, etofenprox, and permethrin) also have a repellent action both on landing and on the blood supply of *Ae. aegypti* *kdr*-resistant (Bowman et al., 2018).

In addition to deltamethrin, other pyrethroids have sublethal effects on the behavior and physiology of mosquitos. *Ae. aegypti* and *Aedes albopictus* exposed to sublethal concentrations of transfluthrin vapors showed reduced fecundity, fertility, and dispersal behavior of eggs by females. Both species showed a 50 to 75% reduction in egg viability, while *Ae. albopictus* showed a significant proportion of melanized oocytes. Responses to stress caused by treatment may explain melanization, reinforcing that exposures to volatile pyrethroids may have implications for mosquito populations (Bibbs et al., 2018).

During the search for the host, mosquitos can find sublethal doses of neurotoxic compounds by contact with treated substrates or aerosol insecticides (Cohnstaedt, & Allan, 2011). *C. quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus*, and *Ae. aegypti* treated with sublethal doses of permethrin and deltamethrin presented greater difficulty in identifying host stimuli. Exposed *C. quinquefasciatus* individuals were slower, spent more time on the flight, and spanned more frequently (Cohnstaedt, & Allan, 2011). The reduction in orientation can be caused in the sensory nerves by pyrethroid (Geier et al., 1999).

Metofluthrin is a volatile pyrethroid effective in reducing *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* bites (Kawada et al., 2005,2006; Lucas et al., 2007; Buhagiar et al., 2017). Metofluthrin has no repelling or expelling effects. The bite reduction is due to the compound's ability to confuse, drop, and kill the insect (Rapley et al., 2009; Ritchie & Devine, 2013). Due to its mechanism of action, it could act as an effective tool to reduce the transmission of dengue by the vector (Ritchie & Devine, 2013).

Many of the insecticides tested on adult mosquitos for *Ae. aegypti* control are also administered to its larvae in their natural environment or the laboratory since the larval stage is the main period of feeding and growth (Klowden, 2013). The effects of different insecticides including pyrethroids, spinosad, imidacloprid, and azadirachtin on *Ae. aegypti* larvae and pupae include changes in behavior, in which cases of lethargy and reduced swimming movement (Tomé et al., 2014; Marriel et al., 2016). The evaluation of the survival and swimming behavior of *Ae. aegypti* and *Anopheles pseudopunctipennis* larvae exposed to increasing concentrations of temephos, permethrin, and eucalyptus essential oil (*Eucalyptus nitens*) indicated that *Ae. aegypti* larvae were more sensitive to treatments than *An. pseudopunctipennis*. There was a decrease in the swimming movement of the larvae of both surviving species. This effect may have ecological relevance in their natural habitats, increasing the chance of predation and decreasing the ability to obtain food (Alvarez Costa et al., 2018).

Resistant *Ae. aegypti* to deltamethrin kept swimming longer and covering greater distances, in addition to taking longer to be captured by the predator of (*Belostoma anurum* nymphs), in comparison with the susceptible strain. The abilities to survive natural environmental challenges, as well as the greater detoxification activity by glutathione-S-transferases and general esterases in the resistant larvae, express the physiological and behavioral changes associated with multiple resistance to insecticides (Valbon et al., 2019).

4. CONCLUSION

Despite being a neurotoxic insecticide, deltamethrin also causes sublethal effects in *Ae. aegypti*, compromising fitness, feeding, reproduction, viability, development, and behavior. These damages are verified both in the larval and adult phases. Despite the presence of mutations and/or increased activity of detoxifying enzymes detected in populations resistant to deltamethrin, there is a cost in fitness associated with resistance. Thus, detailing the different sublethal effects caused by deltamethrin in *Ae. aegypti* is important for a better understanding of mosquito biology, and this can be used to assist in vector control strategies.

5. REFERENCES

- Agnew P, Koella JC (1999) Life history interactions with environmental conditions in a host-parasite relationship and the parasite's mode of transmission. *Evolutionary Ecology* 13: 67–89.
- Ahmad, M., Denholm, I., & Bromilow, R. H. (2006). Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 62(9), 805-810.
- Alvarez-Gonzalez, L. C., Briceño, A., Ponce-Garcia, G., Villanueva-Segura, O. K., Davila-Barboza, J. A., Lopez-Monroy, B., & Flores, A. E. (2017). Assessing the effect of selection with deltamethrin on biological parameters and detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* (L.). *Pest Management Science*, 73(11), 2287-2293.
- Alvarez Costa, A., Gonzalez, P. V., Harburguer, L. V., & Masuh, H. M. (2018). Effects of Temephos, Permethrin, and Eucalyptus nitens essential oil on survival and swimming behavior of *Aedes aegypti* and *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) Larvae. *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1098-1104.
- Amelia-Yap, Z. H., Sofian-Azirun, M., Chen, C. D., Suana, I. W., Lau, K. W., Elia-Amira, N. M. R., & Low, V. L. (2019). Pyrethroids use: threats on metabolic-mediated resistance mechanisms in the primary dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 56(3), 811-816.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182(1), 7-20.
- Antonio, G. E., Sanchez, D., Williams, T., & Marina, C. F. (2009). Paradoxical effects of sublethal exposure to the naturally derived insecticide spinosad in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 65(3), 323-326.
- Agramonte, N. M., Bloomquist, J. R., & Bernier, U. R. (2017). Pyrethroid resistance alters the blood-feeding behavior in Puerto Rican *Aedes aegypti* mosquitoes exposed to treated fabric. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), e0005954.
- Azambuja Garcia, G., David, M. R., de Jesus Martins, A., Maciel-de-Freitas, R., Linss, J. G. B., Araújo, S. C., & Valle, D. (2018). The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), e0006227.

- Balabanidou, V., Kefi, M., Aivaliotis, M., Koidou, V., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., & Nikolaou, C. (2019). Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1907), 20191091.
- Bariami, V., Jones, C. M., Poupardin, R., Vontas, J., & Ranson, H. (2012). Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(6).
- Belinato, T. A., Martins, A. J., & Valle, D. (2012). Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 916-922.
- Belinato, T. A., Martins, A. J., Lima, J. B. P., Lima-Camara, T. N. D., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 43-47.
- Belinato, T. A., & Valle, D. (2015). The impact of selection with diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. *PLOS One*, 10(6).
- Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Phillips, Z. P., Patrick, K. R., & Denlinger, D. L. (2010). Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. *Journal of Insect Physiology*, 56(2), 151-156.
- Bibbs, C. S., Hahn, D. A., & Kaufman, P. E. (2018). Sublethal effects of a vapour-active pyrethroid, transfluthrin, on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) fecundity and oviposition behaviour. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-9.
- Bisset, J. A., Rodríguez, M. M., French, L., Severson, D. W., Gutiérrez, G., Hurtado, D., & Fuentes, I. (2014). Insecticide resistance and metabolic mechanisms involved in larval and adult stages of *Aedes aegypti* insecticide-resistant reference strains from Cuba. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 30(4), 298-304.
- Biduda, S., Lin, C. H., Saleh, F., Konradsen, F., Hansson, H., Schiøler, K. L., & Alifrangis, M. (2019). Temporal pattern of mutations in the knockdown resistance (kdr) gene of *Aedes aegypti* mosquitoes sampled from Southern Taiwan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(5), 973-975.

- Bonizzoni, M., Ochomo, E., Dunn, W. A., Britton, M., Afrane, Y., Zhou, G., & Fass, J. (2015). RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites & Vectors*, 8(1), 474.
- Brengues, C., Hawkes, N. J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., & Hemingway, J. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), 87-94.
- Brito, L. P., Carrara, L., Freitas, R. M. D., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2018). Levels of resistance to pyrethroid among distinct kdr alleles in *Aedes aegypti* laboratory lines and frequency of kdr alleles in 27 natural populations from Rio de Janeiro, Brazil. *Biomed Research International*, 2018.
- Brito, L. P., Linss, J. G., Lima-Camara, T. N., Belinato, T. A., Peixoto, A. A., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2013). Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLOS One*, 8(4).
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24(2), 93-106.
- Braga I A, & Valle D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 279-293.
- Boonyuan, W., Kongmee, M., Bangs, M. J., Prabaripai, A., & Chareonviriyaphap, T. (2011). Host feeding responses of *Aedes aegypti* (L.) exposed to deltamethrin. *Journal of Vector Ecology*, 36(2), 361-372.
- Bowman, N. M., Akialis, K., Cave, G., Barrera, R., Apperson, C. S., & Meshnick, S. R. (2018). Pyrethroid insecticides maintain repellent effect on knock-down resistant populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLOS One*, 13(5).
- Buhagiar, T. S., Devine, G. J., & Ritchie, S. A. (2017). Effects of sublethal exposure to metofluthrin on the fitness of *Aedes aegypti* in a domestic setting in Cairns, Queensland. *Parasites & Vectors*, 10(1), 274.

- Chandra, N., Jain, N. K., Sondhia, S., & Srivastava, A. B. (2013). Deltamethrin induced toxicity and ameliorative effect of alpha-tocopherol in broilers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(6), 673-678.
- Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS letters*, 555(1), 102-105.
- Charlesworth B (1980) *Evolution in age-structured populations*. London: Cambridge University Press.
- Chen, M., Du, Y., Wu, S., Nomura, Y., Zhu, G., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2019). Molecular evidence of sequential evolution of DDT-and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007432.
- Chen, M., Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2020). Chronology of sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(2), e21686.
- Cohnstaedt, L. W., & Allan, S. A. (2011). Effects of sublethal pyrethroid exposure on the host-seeking behavior of female mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 36(2), 395-403.
- Cooperband, M. F., & Allan, S. A. (2009). Effects of different pyrethroids on landing behavior of female *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 46(2), 292-306.
- Cordeiro, E. M. G., De Moura, I. L. T., Fadini, M. A. M., & Guedes, R. N. C. (2013). Beyond selectivity: are behavioral avoidance and hormesis likely causes of pyrethroid-induced outbreaks of the southern red mite *Oligonychus ilicis*? *Chemosphere*, 93(6), 1111-1116.
- David, J. P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A., & Paine, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120429.
- David, J. P., Faucon, F., Chandor-Proust, A., Poupardin, R., Riaz, M. A., Bonin, A., & Reynaud, S. (2014). Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics*, 15(1), 174.
- David, J. P., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M. A., Chandor-Proust, A., & Reynaud, S. (2010). Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, 11(1), 216.

- Deng, S. Q., Yang, X., Wei, Y., Chen, J. T., Wang, X. J., & Peng, H. J. (2020). A Review on Dengue Vaccine Development. *Vaccines*, 8(1), 63.
- Després, L., Stalinski, R., Tetreau, G., Paris, M., Bonin, A., Navratil, V. & David, J. P. (2014). Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins. *BMC Genomics*, 15(1), 926.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81-106.
- De Jong F.M.W, De Snoo G. R, Van De Zande J. C. (2008). Estimated nationwide effects of pesticide spray drift on terrestrial habitats in the Netherlands, *Journal Environ Manage*, 86:721–730.
- Diniz, D. F. A., de Melo-Santos, M. A. V., de Mendonça Santos, E. M., Beserra, E. B., Helvecio, E., de Carvalho-Leandro, D., & Ayres, C. F. J. (2015). Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites & Vectors*, 8(1), 662.
- Djouaka, R. F., Bakare, A. A., Coulibaly, O. N., Akogbeto, M. C., Ranson, H., Hemingway, J., & Strode, C. (2008). Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* ss. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics*, 9(1), 1-10.
- Elliott, M., Farnham, A. W., Janes, N. F., Needham, P. H., & Pulman, D. A. (1974). Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature*, 248(5450), 710-711.
- Estep, A. S., Sanscrainte, N. D., Waits, C. M., Louton, J. E. & Becnel, J. J. Resistance Status and Resistance Mechanisms in a Strain of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology*, 54, 1643–1648 (2017).
- Feyereisen R, (2005). Insect cytochrome P450. Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 4. Oxford, United Kingdom: Elsevier, 1–77.
- García, G. P., Flores, A. E., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solis, G., Lozano-Fuentes, S., & Domínguez-Galera, M. (2009). Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(10).
- Gibbs, A. G. (1998). Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist*, 38(3), 471-482.

- Gibbs, A. G. (2002). Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *Journal of Insect Physiology*, 48(4), 391-400.
- Guardiola, F. A., González-Párraga, P., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M. A. (2014). Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 120-129.
- Geier, M., Bosch, O. J., & Boeckh, J. (1999). Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. *Journal of Experimental Biology*, 202(12), 1639-1648.
- Guedes, R. N. C., Beins, K., Navarro Costa, D., Coelho, G. E., & Bezerra, H. S. D. S. (2020). Patterns of insecticide resistance in *Aedes aegypti*: meta-analyses of surveys in Latin America and the Caribbean. *Pest Management Science*.
- Gunning, R.V., Devonshire, A.L., Moores, G.D., 1995. Metabolism of esfenvalerate by pyrethroid-susceptible and -resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51, 205-213.
- Gutiérrez, Y., Santos, H. P., Serrão, J. E., & Oliveira, E. E. (2016). Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiatus*. *PLOS One*, 11(3).
- Haddi, K., Tomé, H. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., & Oliveira, E. E. (2017). Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific Reports*, 7, 46549.
- Hemingway J & Ranson H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 371-391.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 653-665.
- Howard, R. W., & Blomquist, G. J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, 50, 371-393.
- Ishak, I. H., Jaal, Z., Ranson, H., & Wondji, C. S. (2015). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors*, 8(1), 181.

- Juárez MP, Pedrini N, Girotti JR, Mijailovsky SJ (2010) Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. Resistance Pest Management Newsletter 19(2):59–61.
- Kasai, S., Komagata, O., Itokawa, K., Shono, T., Ng, L. C., Kobayashi, M., & Tomita, T. (2014). Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. PLOS Neglected Tropical Diseases, 8(6).
- Kawada H, Yen NT, Hoa NT, Sang TM, Dan NV, Takagi M. (2005). Field evaluation of spatial repellency of metofluthrin impregnated plastic strips against mosquitoes in Hai Phong city. Vietnam. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 73(2):350–3.
- Kawada H, Iwasaki T, Loan LL, Tien TK, Mai NTN, Shono Y, et al. (2006). Field evaluation of spatial repellency of metofluthrin-impregnated latticework plastic strips against *Aedes aegypti* (L.) and analysis of environmental factors affecting its efficacy in My Tho City, Tien Giang, Vietnam. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 75(6):1153–7.
- Klowden MJ. Physiological Systems in Insects. (2013.) 3rd edition. Elsevier Academic Press: San Diego.
- Kumar, S., Thomas, A., & Pillai, M. K. K. (2011). Deltamethrin: Promising mosquito control agent against adult stage of *Aedes aegypti* L. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(6), 430-435.
- Kongmee, M., Prabaripai, A., Akwatanakul, P., Bangs, M. J., & Chareonviriyaphap, T. (2004). Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. Journal of Medical Entomology, 41(6), 1055-1063.
- Kristan, M., Lines, J., Nuwa, A., Ntege, C., Meek, S. R., & Abeku, T. A. (2016). Exposure to deltamethrin affects development of *Plasmodium falciparum* inside wild pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* ss mosquitoes in Uganda. Parasites & Vectors, 9(1), 100.
- Kushwah, R. B. S., Dykes, C. L., Kapoor, N., Adak, T., & Singh, O. P. (2015). Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 9(1).
- Kushwah, R. B. S., Kaur, T., Dykes, C. L., Kumar, R. H., Kapoor, N., & Singh, O. P. (2019). A new knockdown resistance (kdr) mutation F1534L in *Aedes aegypti* associated with insecticide resistance. BioRxiv, 740829.

- Lalouette, L., Pottier, M. A., Wycke, M. A., Boitard, C., Bozzolan, F., Maria, A., & Maibeche, M. (2016). Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3073-3085.
- Lecouturier, V., Pavot, V., Berry, C., Donadieu, A., de Montfort, A., Boudet, F. & Heinrichs, J. (2020). An optimized purified inactivated Zika vaccine provides sustained immunogenicity and protection in cynomolgus macaques. *NPJ Vaccines*, 5(1), 1-10.
- Li X, Schuler M A & Berenbaum M R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231-253.
- Li, C. X., Kaufman, P. E., Xue, R. D., Zhao, M. H., Wang, G., Yan, T., & Zhang, H. D. (2015). Relationship between insecticide resistance and kdr mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. *Parasites & Vectors*, 8(1), 325.
- Li, Z., Huang, Q., Zhang, X. W., Ke, L., Yan, W. Y., Zhang, L. Z., & Zeng, Z. J. (2020). Deltamethrin Impairs Honeybees (*Apis mellifera*) Dancing Communication. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 78(1), 117-123.
- Lien N. T. K, Ngoc N. T. H, Hien N. T, Hoang N. H, Binh N. T. H, (2018). Two novel mutations in the voltage-gated sodium channel associated with knockdown resistance (kdr) in the dengue vector *Aedes aegypti* in Vietnam. *Journal of Vector Ecology*. 43: 184–189.
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., Da Silva, E. V., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., & de Melo Santos, M. A. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*, 4(5), 2-12.
- Lima, E. P., Goulart, M. O. F., & Rolim Neto, M. L. (2014). Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporters as a defence mechanism against temephos in populations of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 961-963.
- Linss, J. G. B., Brito, L. P., Garcia, G. A., Araki, A. S., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., ... & Martins, A. J. (2014). Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vectors*, 7(1), 25.
- Lucas J, Shono Y, Iwasaki T, Ishiwatari T, Spero N, Benzon G. (2007). U.S. laboratory and field trials of metofluthrin (SumiOne) emanators for reducing mosquito biting outdoors. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 23(1):47–54.

- Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L. A., Hemingway, J., & Ranson, H. (2005). Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(8), 861-871.
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L. A., & Ranson, H. (2011). The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3), 203-209.
- Manda, H., Shah, P., Polsomboon, S., Chareonviriyaphap, T., Castro-Llanos, F., Morrison, A., & Achee, N. L. (2013). Contact irritant responses of *Aedes aegypti* using sublethal concentration and focal application of pyrethroid chemicals. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(2).
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., & David, J. P. (2009). Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*, 10(1), 494.
- Marcombe, S., Mathieu, R. B., Pocquet, N., Riaz, M. A., Poupardin, R., Sélisior, S., & David, J. P. (2012). Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLOS One*, 7(2).
- Martins, A. J., Bellinato, D. F., Peixoto, A. A., Valle, D., & Lima, J. B. P. (2012). Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLOS One*, 7(3), e31889.
- Martinez, J. D., Cardenas-de la Garza, J. A., & Cuellar-Barboza, A. (2019). Going viral 2019: Zika, chikungunya, and dengue. *Dermatologic Clinics*, 37(1), 95-105.
- Marriel, N. B., Tomé, H. V. V., Guedes, R. C. N., & Martins, G. F. (2016). Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). *Acta Tropica*, 158, 88-96.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1-7.
- Nasuti C, Cantalamessa F, Falcioni G & Gabbianelli R. (2003). Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*, 191(2), 233-244.

- Osti, S. C., Varoli, F., Matushima, E., & Bernardi, M. (2007). Comparative studies of delthametrin acute toxicity in exotic and Brazilian fish. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2, 101-6.
- Parkinson, A. (2001). *Biotransformation of xenobiotics* (pp. 133-224). New York: McGraw-Hill.
- Polson, K. A., Brogdon, W. G., Rawlins, S. C., & Chadee, D. D. (2011). Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Tropica*, 117(1), 31-38.
- Porretta, D., Gargani, M., Bellini, R., Medici, A., Punelli, F., & Urbanelli, S. (2008). Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(1), 48-54.
- Puinean, A. M., Foster, S. P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L. M., Millar, N. S., & Bass, C. (2010). Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genetics*, 6(6).
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., & Black IV, W. C. (2010). Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA. net* [online], 1(1).
- Ranson H, Hemingway J, 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 226–241.
- Ranson H, Claudianos C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179–181.
- Rapley, L. P., Russell, R. C., Montgomery, B. L., & Ritchie, S. A. (2009). The effects of sustained release metofluthrin on the biting, movement, and mortality of *Aedes aegypti* in a domestic setting. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 94-99.
- Rault, L. C., Johnson, E. J., O’Neal, S. T., Chen, R., McComic, S. E., Swale, D. R., & Anderson, T. D. (2019). Age-and sex-related ABC transporter expression in pyrethroid-susceptible and-resistant *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. A
- Rault, L. C., O’Neal, S. T., Johnson, E. J., & Anderson, T. D. (2019). Association of age, sex, and pyrethroid resistance status on survival and cytochrome P450 gene expression in *Aedes aegypti* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 156, 96-104. B

- Riaz, M. A., Chandor-Proust, A., Dauphin-Villemant, C., Poupardin, R., Jones, C. M., Strode, C., & Reynaud, S. (2013). Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquatic Toxicology*, 126, 326-337.
- Ritchie, S. A., & Devine, G. J. (2013). Confusion, knock-down and kill of *Aedes aegypti* using metofluthrin in domestic settings: a powerful tool to prevent dengue transmission? *Parasites & Vectors*, 6(1), 262.
- Rose R. I. (2001). Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 17.
- Saingamsook, J., Yanola, J., Lumjuan, N., Walton, C., & Somboon, P. (2019). Investigation of Relative Development and Reproductivity Fitness Cost in Three Insecticide-Resistant Strains of *Aedes aegypti* from Thailand. *Insects*, 10(9), 265.
- Santos, M. D., Areas, M. A., & Reyes, F. G. R. (2007). Piretróides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(3), 339-349.
- Santos, H. P., Gutiérrez, Y., Oliveira, E. E., & Serrão, J. E. (2018). Sublethal dose of deltamethrin damage the midgut cells of the mayfly *Callibaetis radiatus* (Ephemeroptera: Baetidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1418-1427.
- Sathantriphop, S., Paeporn, P., Ya-umphan, P., Mukkhun, P., Thanispong, K., Chansang, C., & Tainchum, K. (2020). Behavioral Action of Deltamethrin and Cypermethrin in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Implications for Control Strategies in Thailand. *Journal of Medical Entomology*.
- Schrauf, S., Tschismarov, R., Tauber, E., & Ramsauer, K. (2020). Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika and Chikungunya virus infections. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Scott, J. G. (2008). Insect cytochrome P450s: thinking beyond detoxification. *Recent advances in insect physiology, Toxicology and Molecular Biology*, 1, 17-124.
- Strycharz, J. P., Lao, A., Li, H., Qiu, X., Lee, S. H., Sun, W., & Clark, J. M. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(2), 207-217.

- Spencer C I, Yuill K H, Borg J J, Hancox J C & Kozlowski R Z. (2001). Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 1067-1082.
- Strode, C., Wondji, C. S., David, J. P., Hawkes, N. J., Lumjuan, N., Nelson, D. R., & Ranson, H. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 113-123.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D & Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 3-59.
- Soderlund DM (2004) Pyrethroids and sodium channels. In: Beadle DJ, Mellor IR, Usherwood PNR (eds) *Neurotox' 03: neurotoxicological targets from functional genomics and proteomics*. Society of Chemical Industry, London, p 79e86.
- Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A., & Blomquist, G. J. (1999). Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(6), 481-514.
- Tomé, H. V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. (2014). Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 195.
- Valbon, W. R., Cruz, F. M., Ramos, G. S., Tomé, H. V., & Oliveira, E. E. (2018). Sublethal exposure to deltamethrin reduces the abilities of giant water bugs to prey upon *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, 191, 350-356.
- Valbon, W. R., Haddi, K., Souza, R. A., Carvalho, G. A., Guedes, R. N. C., Martins, G. F., & Oliveira, E. E. (2019). “Armed to the teeth”: The multiple ways to survive insecticidal and predatory challenges in *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 156, 87-95.
- Valentine W M. (1990). Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*, 20(2), 375-382.

- Vélez, M., Botina, L. L., Turchen, L. M., Barbosa, W. F., & Guedes, R. N. C. (2018). Spinosad- and Deltamethrin-Induced Impact on Mating and Reproductive Output of the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *Journal of Economic Entomology*, 111(2), 950-958.
- Viana-Medeiros, P. F., Bellinato, D. F., Martins, A. J., & Valle, D. (2017). Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (*Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 340-350.
- Vontas, J. G., Small, G. J., & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357(1), 65-72.
- Vontas, J., David, J. P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G. K., Louis, C., & Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*, 16(3), 315-324.
- WHO. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. Geneva: World Health Organization; 2018.
- Wood, O. R., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L. L., & Brooke, B. D. (2010). Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 1-7.

CAPÍTULO 2 – Efeitos subletais da deltametrina em larvas L4 de *Aedes aegypti*.

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o principal vetor dos vírus causadores da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika. Uma das principais formas de se controlar a transmissão desses patógenos é o combate do vetor com inseticidas. Um dos grandes problemas relacionados à essa estratégia é o surgimento de resistência. Os efeitos subletais dos inseticidas podem repercutir sobre as atividades cruciais dos insetos e podem provocar uma situação de estresse que perturba a homeostase. O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos subletais da deltametrina em larvas de quarto instar (L4) de *Ae. aegypti*. Larvas de quarto instar (L4) de populações susceptível e resistente à deltametrina foram expostas a diferentes concentrações e diferentes tempos ao inseticida. Após a exposição, a taxa de sobrevivência foi aferida e o estresse oxidativo foi estudado no intestino médio e cabeça, por meio da medição da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) 24h e 48h após a exposição. A presença de células positivas para diferentes proteínas (Caspase 3; c-Jun N-terminal quinase –JNK, Wingless-Wnt, Fosfohistona H3-PH3) também foi investigada nos órgãos das duas populações. A exposição induziu estresse oxidativo no intestino médio e cabeça de L4 susceptíveis 48h após a exposição, induzindo o aumento na atividade de SOD e GST. A atividade da enzima catalase não foi afetada pelo tratamento e tempo de exposição. A atividade das enzimas não diferiu nas L4 resistentes após a exposição em relação ao controle (não expostas). Não foram detectadas células positivas para caspase 3. O número de células PH3-positivas aumentou nas L4 susceptíveis 48h após a exposição em relação ao controle. Para as L4 resistentes, o número de células PH3-positivas foi superior no controle em relação às expostas. O número de células JNK-positivas no intestino médio de L4 resistentes expostas por 24h à deltametrina foi superior às L4 susceptíveis. Além da JNK, verificou-se a presença de células WNT-positivas nas L4 suscetíveis não expostas. Em conjunto, nossos dados mostram como as duas linhagens diferem quanto à sobrevivência, desenvolvimento, estresse oxidativo e imunomarcações, frente aos efeitos subletais da deltametrina.

Palavras chave: *Aedes aegypti*, deltametrina, estresse oxidativo, intestino, cérebro.

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor dos vírus da dengue, chikungunya, Zika, mayaro e febre amarela, e é responsável por quase 100 milhões de casos de arboviroses em todo o mundo (Martinez et al., 2019). Até o momento, o controle desse vetor se apresenta como a principal forma de controlar a dengue e as outras doenças transmitidas por ele. Entre os métodos de controle, o uso de inseticidas de origem orgânica, ainda é um dos mais adotados no combate aos vetores em Saúde Pública (Rose, 2001). Nesse contexto, um dos principais desafios no uso de inseticidas é a seleção de insetos resistentes (Hemingway & Ranson, 2000). Em vários países, resistência a inseticidas piretroides tem sido relatada em *Ae. aegypti*, provavelmente devido ao seu uso intensivo pelos programas de controle de vetores por mais de duas décadas (Smith et al., 2016).

A deltametrina é um inseticida orgânico neurotóxico, classificado como piretroide tipo II em que seu principal alvo são os canais de sódio nos neurônios (Nahrashi, 1996; Ray & Fry 2006). O inseticida afeta o sistema nervoso periférico e central do inseto, estimulando as células nervosas a produzirem descargas repetitivas e, eventualmente, causam paralisia e um efeito de choque denominado *knock down* (Braga & Valle, 2007; Santos et al., 2007). O uso desse inseticida contra as larvas de mosquitos é recomendado devido à sua eficácia no controle de insetos e apresentam baixa toxicidade em mamíferos (Santos et al., 2007).

Os xenobióticos não atuam apenas no alvo primário, mas podem também interagir em outros sítios (Parkinson, 2001). Essa interação pode não levar à morte, mas provoca reações subletais que interferem na sobrevivência, afetando sua fisiologia, comportamento, ecologia e comunicação (Desneux et al. 2007). Embora a deltametrina seja neurotóxica, seu efeito não é restrito ao sistema nervoso, o intestino médio também é afetado, como tem sido descrito em insetos (Gutiérrez et al 2016; Majumdar et al., 2016; Yasmeen & Amir, 2016; Santos et al., 2018).

O epitélio do intestino médio de mosquitos consiste de células digestivas, também chamadas enterócitos, células regenerativas, também chamadas células-tronco, localizadas na porção basal, e células enteroendócrinas (Fernandes et al., 2014; Godoy et al., 2015). Tendo em vista a importância dessas células para a fisiologia do órgão e durante o desenvolvimento larval, o intestino tem sido alvo de estudos para a avaliação dos efeitos de diferentes classes de inseticidas em *Ae. aegypti* e outros insetos (Alves et al., 2010; Klowden, 2013; Fernandes et al., 2015; Silva Costa et al., 2016; El Sobky et al., 2016; Paiva et al., 2017; Yang et al., 2017; Fernandes et al., 2019).

A exposição à deltametrina provoca danos teciduais, comportamentais e fisiológicos em insetos. Além disso, provoca estresse oxidativo, que é definido como um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes (Betteridge, 2000; Tomé et al., 2014; Shekhar, 2014; Marriel et al., 2016; Lu et al., 2019). Em insetos, as enzimas que atuam no sistema de defesa antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione transferase e glutathione reductase (GST; GSR) (Felton & Summers, 1995). Concentrações subletais de piretroides aumentam a atividade das enzimas desintoxicantes e o custo metabólico associado à desintoxicação em insetos (Vontas et al., 2001; Kodrík et al., 2015; Plavšín et al., 2015). Em *Ae. aegypti* os indivíduos resistentes, por meio do aumento na desintoxicação de inseticidas, são capazes de degradar xenobióticos em compostos inertes com maior eficácia do que os indivíduos suscetíveis, sendo que nesse processo a ação da enzima P450 é fundamental (Smith et al., 2016; Valbon et al., 2019).

Estudos direcionados ao entendimento das estratégias utilizadas como mecanismo de resistência são fundamentais para elucidar os aspectos fisiológicos dos insetos vetores de interesse epidemiológico. Em *Ae. aegypti* os aspectos moleculares de ação da deltametrina no sistema nervoso é bem descrito na literatura (Soderlund., 2002; Bradberry et al., 2005). No entanto, informações referentes ao status de estresse oxidativo provocado pelo tratamento com piretroide na cabeça, local onde está concentrado o tecido nervoso ou gânglio nervoso, um dos principais alvos da deltametrina, ainda não foram explorados, por isso esse órgão foi escolhido como objeto de estudo. Além disso, devido à importância fisiológica do intestino médio, a identificação de efeitos subletais causados por inseticidas é fundamental para o entendimento completo do mecanismo de ação desses compostos. O presente trabalho teve como objetivo descrever os efeitos subletais da deltametrina no intestino médio e cabeça de larvas do quarto instar (L4) de *Ae. aegypti* de populações resistentes e susceptíveis após 24h e 48h de exposição ao inseticida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Insetos

Foram utilizadas larvas de quarto instar (L4) e pupas de *Ae. aegypti* susceptíveis (linhagem PPCampos - Campos dos Goytacazes) e resistentes a piretroide (população F2 Oiapoque) gentilmente doados por Ademir Martins (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ). As larvas foram provenientes de colônias mantidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil). As larvas foram mantidas em um recipiente plástico 500 ml, preenchidos com 300 mL de água da torneira sem cloro, alimentadas com comida de tartaruga Fed (Reptolife, Alcon Pet, Camburiú, SC, Brasil), sob temperatura controlada (25 ± 2 °C), umidade relativa (60 ± 2 %) e fotoperíodo (12:12 L:D).

2.2 Curva de sobrevivência e desenvolvimento

Cem L4 foram mantidas em recipientes de vidro de 500mL, com 200 mL de água e 5 mg de ração e foram submetidas às diferentes concentrações de deltametrina (3, 5 e 7 ppb). O grupo controle foi submetido aos mesmos tratamentos, exceto pela exposição ao inseticida. Utilizou-se a deltametrina (Decis 25CE, 25 g/L, concentrado para emulsão, Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil). O inseticida foi diluído em água destilada para se obter as concentrações desejadas. Após a exposição, as larvas foram acompanhadas e avaliadas até a emergência dos adultos. Durante o acompanhamento, foram anotados os dias de emergência dos adultos nas duas linhagens, para a avaliação do desenvolvimento.

2.3 Estresse oxidativo

Para análises do estresse oxidativo, as larvas L4 foram expostas à concentração de 7 ppb de deltametrina e analisadas após 24h e 48h de exposição. Foram feitas 5 repetições com *pool* de 30 intestinos e cabeças cada, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado das populações susceptível e resistente. Após o período de exposição, os órgãos foram dissecados em PBS, armazenados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e mantidas a -80°C até o momento da preparação do homogenato.

2.3.1 Preparação do homogenato

As amostras foram homogeneizadas em 0,2 mol / L de tampão fosfato, 1 mmol / L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 7,4 utilizando um homogeneizador (OMNI). Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g por 20 min a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para análise de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione transferase (GST).

2.4. Atividade enzimática

2.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método baseado na redução do superóxido (O_2) e do peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000). A mistura reacional contém 99 μ L de tampão fosfato de potássio PBS (5 mmol / L, pH 7) e 30 μ L de amostra. A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L de pirogalol (100 μ mol / L). A mistura reacional foi medida por absorbância a 570 nm. A atividade da SOD foi calculada como unidades por miligrama de proteína, com um U de SOD definido como a quantidade que inibiu a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50%. Cada amostra foi processada em duplicata.

2.4.2 Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada usando H_2O_2 como substrato (Aebi, 1984). Resumidamente, 1 mL de H_2O_2 foi adicionado à mistura reacional contendo 5 μ L do homogenato em 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (50 mmol / L, pH 7,0). Após adição, a mistura reacional foi feita a 240 nm durante 1 min a um intervalo de 30 s. Um coeficiente de extinção de $\epsilon_{240} = 0,036 \text{ mmol / L} \times \text{cm}$ foi usado para os cálculos. Uma unidade de atividade CAT foi definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 mmol de H_2O_2 por 1 min. A atividade da catalase foi calculada como U por miligrama de proteína. Cada amostra foi processada em triplicata.

2.4.3 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida de acordo com a formação de 2,4-dinitroclorobenzeno conjugado com glutathione (CDNB) (Habig et al. 1974). Resumidamente: 1 mmol / L de CDBN foi adicionado ao tampão contendo 1 mmol / L de GSH e a alíquota de 10 μ L da amostra a ser testada. Após adição de CDBN, a alteração foi monitorizada com absorvância a 340 nm durante 90 segundos. O coeficiente de extinção molar usado para CDBN foi $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol / L} \times \text{cm}$. Uma unidade de atividade da GST foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de um μ mol de produto / min / mL. A atividade da GST foi expressa em U por miligrama de proteína. Cada amostra foi processada em triplicata.

2.5 Análises estatísticas – estresse oxidativo

Os dados de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência pelo teste Log-Rank e as curvas de sobrevivência, estimadas pelos estimadores Kaplan-Mayer, foram comparadas aos pares pelo método de Bonferroni. A atividade das diferentes enzimas e o tempo até a emergência dos adultos foram analisados usando modelos lineares generalizados que foram ajustados com diferentes distribuições dos erros (distribuições gama ou gaussiana). Além

disso, o teste F foi usado para discriminar os tratamentos. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% e realizadas com o software R. Os resultados referentes a contagem de células foram submetidos à análise de variância (ANOVA) two-way, seguida do teste posthoc de Tukey. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% e realizadas no software GraphPad Prism 8.

2.6 Microscopia de fluorescência

Os intestinos foram dissecados em tampão fosfato (PBS 0.1 M, pH 7,2), fixados em Zamboni (paraformaldeído/ácido pícrico) (Stefenini *et al.*, 1967) durante 1h e armazenadas em PBS na geladeira até o momento do processamento. Para a análise de microscopia de fluorescência, os intestinos das larvas expostas ao inseticida e as do controle (5 intestinos para cada marcação) foram lavadas 3 vezes durante 30 minutos com 1% de PBST (solução salina tamponada com fosfato com Tween a 1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após lavagem, foram incubados durante 48h a 4 ° C para cada anticorpo primário. Foram feitas duplas marcações utilizando anticorpos de coelho e camundongos nas combinações: a) Caspase 3 (1:300) (Cell Signalling) / P-SAP/JNK (c-Jun N-terminal cinase) (1:300) (Cell Signalling); b) Phospho histone H3 (1:300) (Cell Signalling) / 4D4 Wingless protein – WNT (1:400) (Developmental Studies Hybridoma Bank).

Após incubação, as amostras foram lavadas três vezes em PBS e depois incubadas durante 24 horas ao abrigo da luz a 4°C EM solução de anticorpo secundário anti-coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) diluído em PBS.

Após a incubação com anticorpos primários, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas por mais 24h no anticorpo secundário anti-mouse TRITC (Millipore). Após o processamento com os anticorpos, o material ficou incubado overnight em DAPI (1:000) para marcação dos núcleos. A seguir, os intestinos foram lavados 3 vezes, lamínulas foram montadas utilizando meio de montagem Mowiol® (Aldrich), observadas e fotografadas no microscópio ThermoFisher Scientific EVOSM5000 Imaging System, no Laboratório de Microbiologia Ambiental, Departamento de Microbiologia - UFV. Como controle negativo, foram utilizados cinco intestinos médios para cada imunomarcação, submetidos aos mesmos procedimentos, porém, sem os anticorpos primários.

3. RESULTADOS

3.1 Sobrevivência

O acompanhamento da sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* ocorreu desde a exposição ao inseticida até a emergência de todos os adultos (Fig. 1). A sobrevivência de larvas (L4) de *Ae. aegypti* da população susceptível à deltametrina foi afetada pela exposição ao inseticida (teste de Log-Rank: $\chi^2 = 84,52$, $df = 3$, $P < 0,0001$) (Fig.1 A). Na linhagem susceptível, todas as concentrações de deltametrina reduziram a sobrevivência das L4 ao longo do tempo. As L4 tratadas expostas à 3 e 5 ppb de deltametrina tiveram 80 e 72% de sobrevivência, respectivamente. Já a deltametrina na concentração de 7 ppb causou o efeito mais drástico quando comparado ao controle, e apenas 43% dos insetos emergiram em adultos (Fig.1 A).

A sobrevivência de L4 resistentes à deltametrina também foi significativamente afetada pela exposição ao inseticida (teste de Log-Rank: $\chi^2 = 40,45$, $df = 3$, $P < 0,0001$) (Fig.1 B). No entanto, apenas a deltametrina a 7 ppb foi capaz de reduzir a sobrevivência das L4 resistentes ($P < 0,0001$), e cerca de 87% dos sobreviventes originaram adultos (Fig.1 B).

Indivíduos suscetíveis tiveram seu desenvolvimento atrasado com o aumento da concentração de deltametrina ($F_{1,288} = 146,06$, $P < 0,001$) (Fig.2 A). Cinco dias após o início do ensaio, inicia-se a emergência dos adultos controle (deltametrina 0 ppb), enquanto que para as concentrações de 3; 5 e 7 ppb, a emergência inicia-se com dias de atraso em relação ao controle, cerca de seis, sete e oito dias respectivamente. Os indivíduos resistentes apresentam uma atraso na emergência em comparação aos suscetíveis ($F_{1,385} = 5,60$, $P = 0,018$) (Fig.2 B).

3.2 Estresse oxidativo

3.2.1 População susceptível

A atividade da SOD foi significativamente maior no intestino médio de L4 suscetíveis após a exposição à deltametrina em relação ao controle após 24h (Fig.3 A) e 48h (Fig.3 B). A deltametrina não afetou a atividade da CAT no intestino médio das L4 suscetíveis (Fig.3 C, D). A exposição à deltametrina aumentou a atividade de GST tanto em 24h (Fig.3 E) quanto em 48h de exposição (Fig.3 F). Além disso, a atividade dessa enzima foi significativamente maior em 48h do que 24h em larvas expostas ao piretoide.

A deltametrina aumentou a atividade da SOD na cabeça de larvas susceptíveis tanto em 24h (Fig.4 A) quanto em 48h de exposição (Fig.4 B). O efeito na atividade da da CAT foi menor em relação ao controle nos grupos tratados em ambos tempos de exposição (Fig.4 C, D). A deltametrina aumentou a atividade de GST, independentemente do tempo de exposição (Fig.4 E, F).

3.2.2 População resistente

O tratamento com a deltametrina e o tempo de exposição não afetaram significativamente a atividade das enzimas SOD (Fig.5 A, B), CAT (Fig.5 C, D) e GST (Fig.5 E, F) no intestino médio de L4 resistentes.

Assim como observado no intestino, no cérebro de larvas resistentes, o tratamento com o piretoide e o tempo de exposição (24h e 48h), também não afetaram significativamente a atividade das enzimas SOD (Fig.6 A, B), CAT (Fig.6 C, D) e GST (Fig.6 E, F).

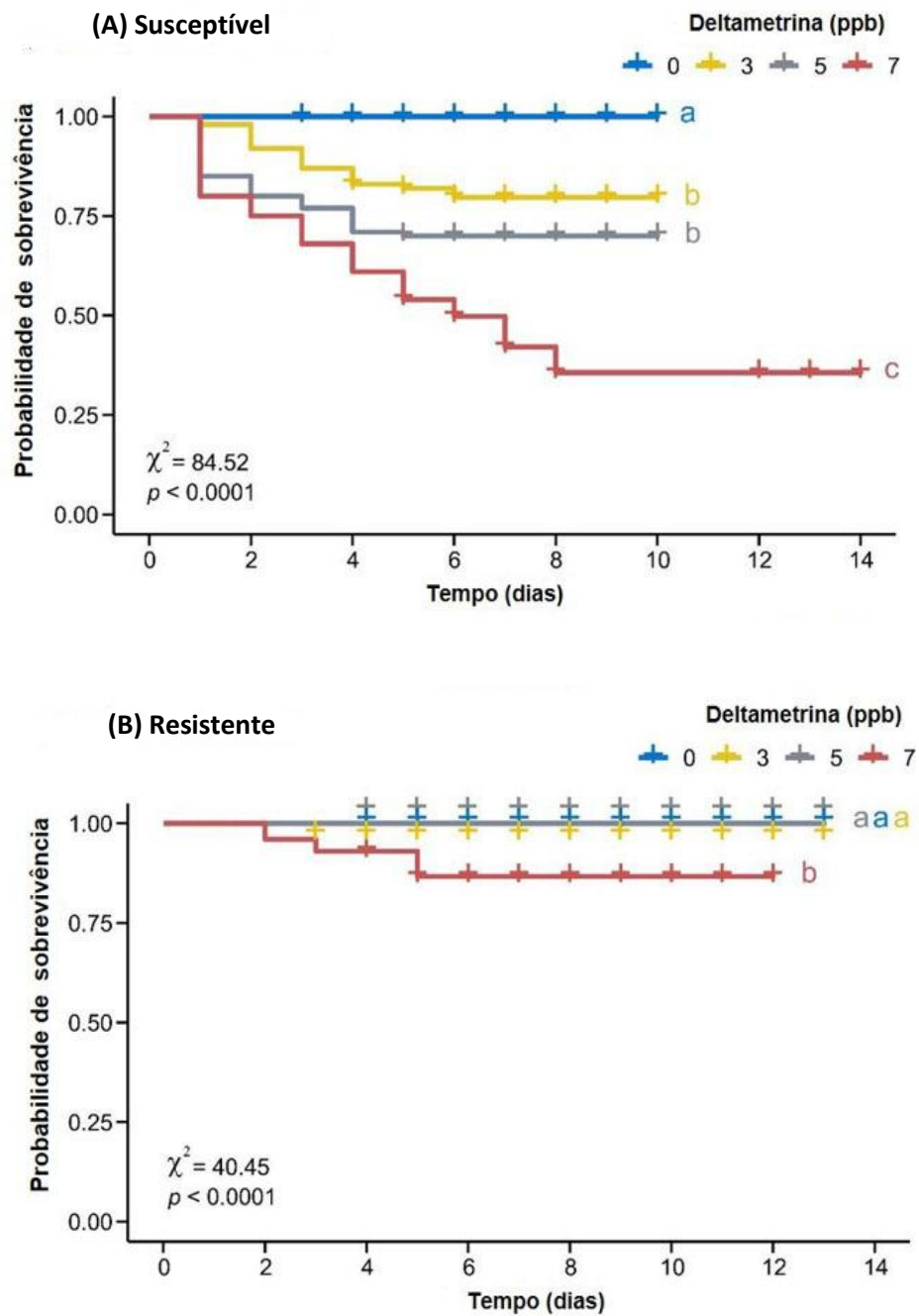


Figura 1: Sobrevivência para L4 de *Ae. aegypti* susceptível (A) e resistente (B) a deltametrina submetidas a concentrações subletais crescentes do inseticida. **Azul:** controle; **Amarelo:** concentração 3 ppb; **Cinza:** concentração 5 ppb; **Vermelho:** concentração 7 ppb. Letras diferentes indicam curvas significativamente diferentes pelo método de Bonferroni ($P < 0.05$).

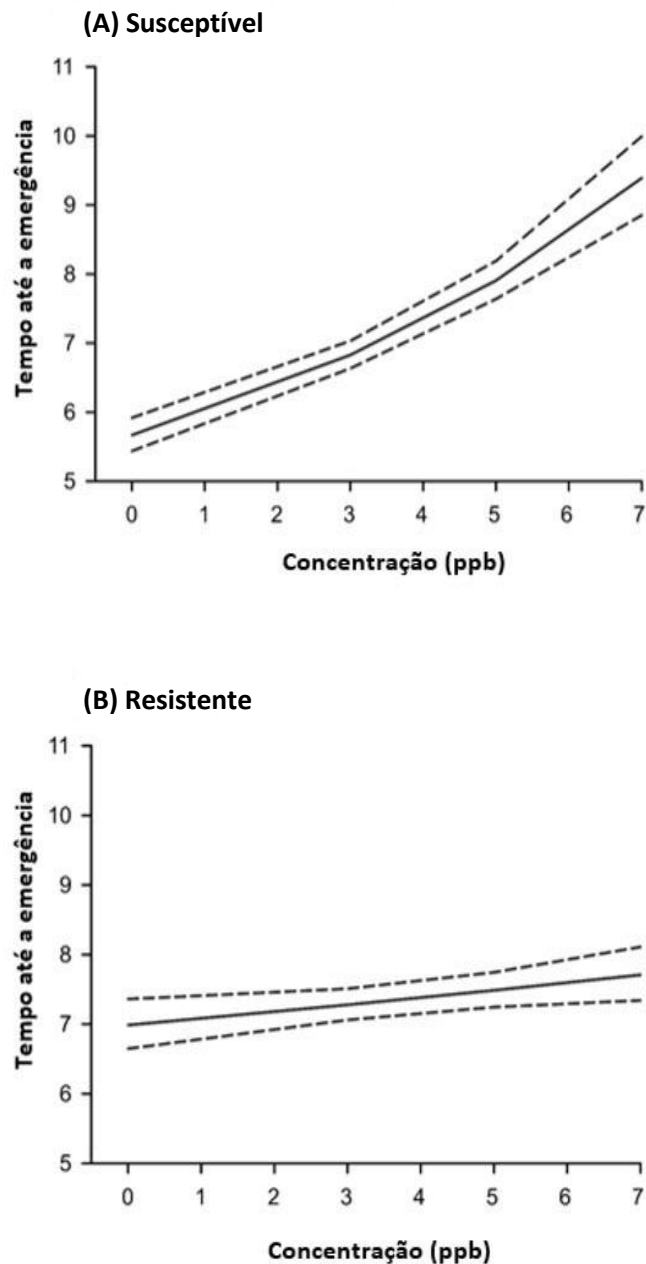


Figura 2: Regressão linear representando o tempo de emergência para adultos de *Ae. aegypti* susceptível (A) e resistente (B) a deltametrina que emergiram de L4 expostas a concentrações subletais crescentes do inseticida. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança, e a linha completa é a estimativa média de tendência, na qual está representada da média da tendência de emergência. Todas as análises foram realizadas no software R. Nível de significância = 5%.

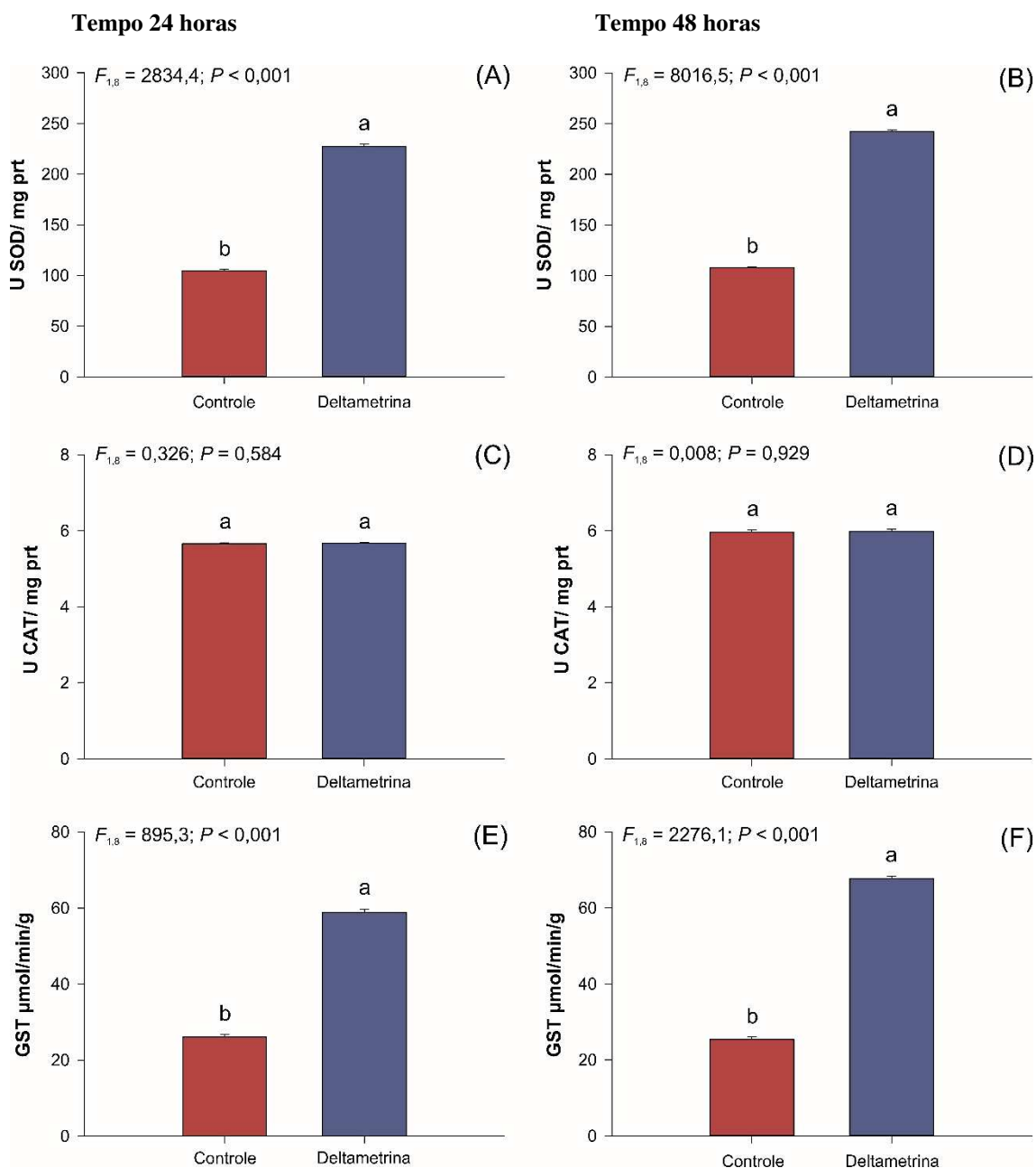


Figura 3: Atividades das enzimas envolvidas nas respostas antioxidantes do intestino médio de L4 de *Ae. aegypti* da cepa susceptível submetidas a concentração de 7 ppb deltametrina após diferentes tempos de exposição **24h** (A; C; E) e **48h** (B; C; F) **A-B:** Atividade da superóxido dismutase (SOD) medida em unidades (U) por miligrama de proteína. **C-D:** Atividade da catalase (CAT) medida em unidade (U) de catalase por miligrama de proteína. **E-F:** Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) medida em micromol/por minuto/por grama de tecido. Letras diferentes a/b: indicam que há diferença estatística. Nível de significância = 5%.

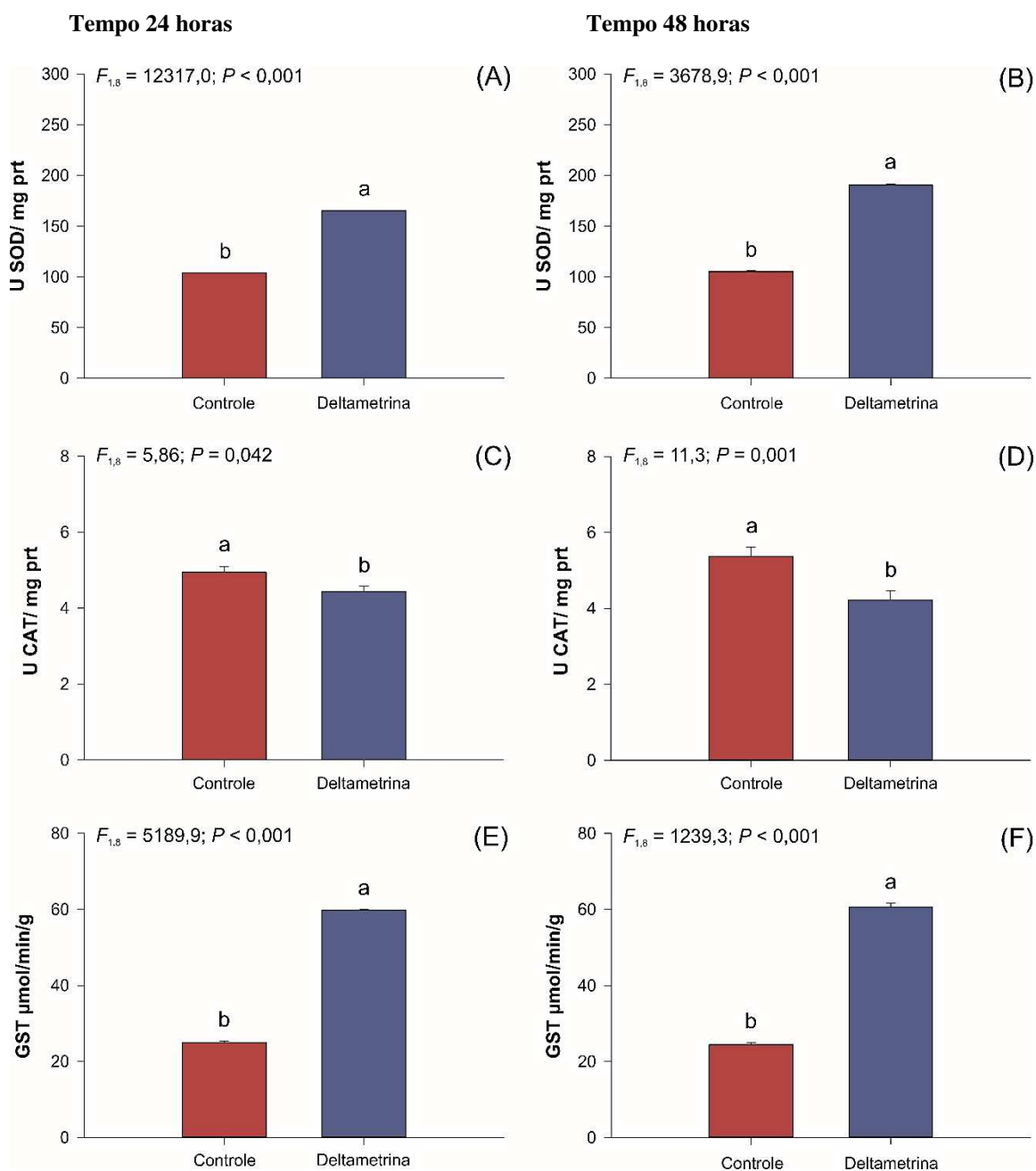


Figura 4: Atividades das enzimas envolvidas nas respostas antioxidantes da cabeça de L4 de *Ae. aegypti* da cepa susceptível submetidas a concentração de 7 ppb de deltametrina após diferentes tempos de exposição **24h** (A; C; E) e **48h** (B; C; F). **A-B:** Atividade da superóxido dismutase (SOD) medida em unidades (U) por miligrama de proteína. **C-D:** Atividade da catalase (CAT) medida em unidade (U) de catalase por miligrama de proteína. **E-F:** Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) medida em micromol/por minuto/por grama de tecido. Letras diferentes a/b: indicam que há diferença estatística. Nível de significância = 5%.

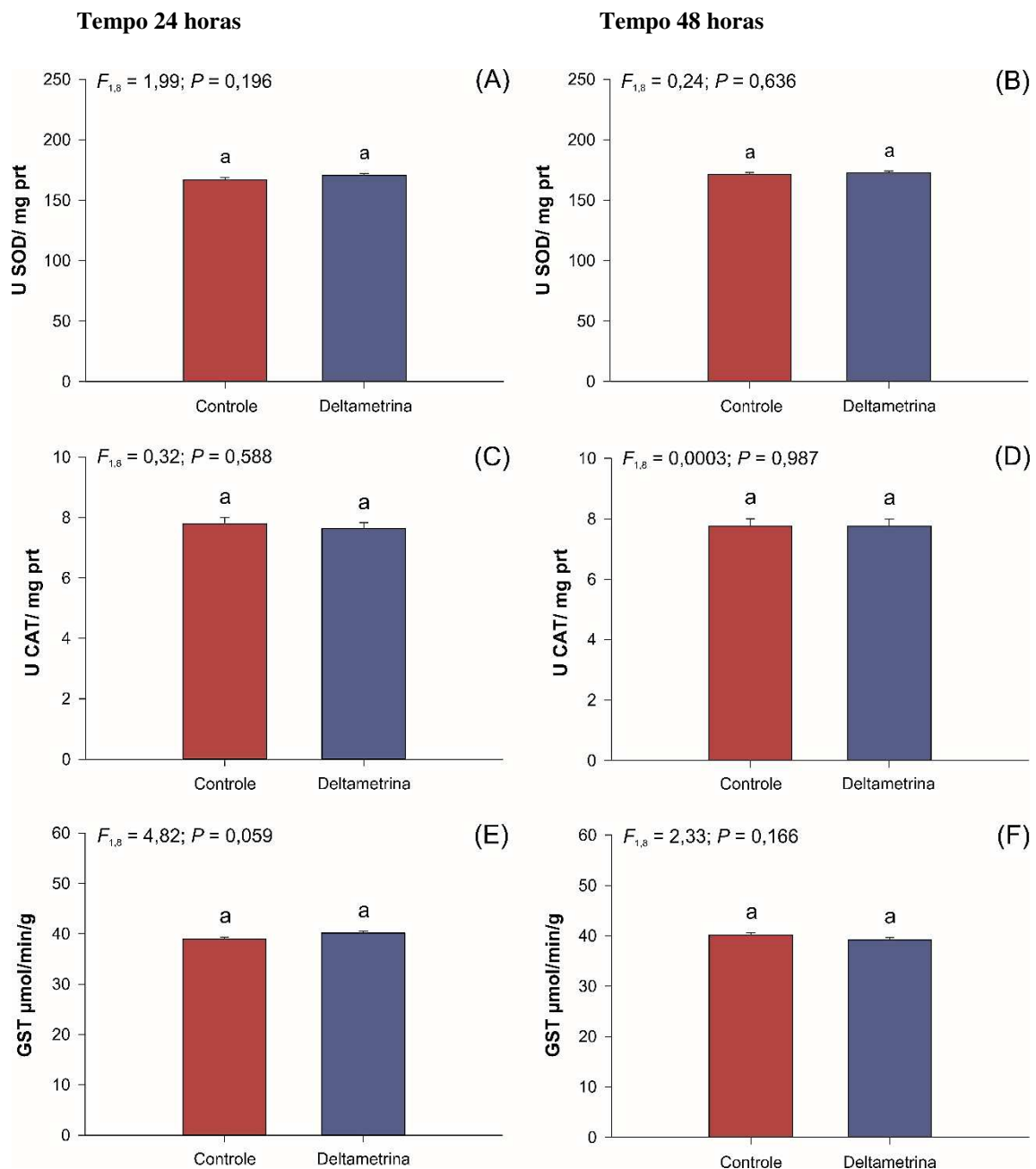


Figura 5: Atividades das enzimas envolvidas nas respostas antioxidantes do intestino de L4 de *Ae. aegypti* da cepa resistente submetidas à concentração de 7 ppb de deltametrina após diferentes tempos de exposição **24h** (A; C; E) e **48h** (B; C; F). **A-B:** Atividade da superóxido dismutase (SOD) medida em unidades (U) por miligrama de proteína. **C-D:** Atividade da catalase (CAT) medida em unidade (U) de catalase por miligrama de proteína. **E-F:** Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) medida em micromol/por minuto/por grama de tecido. Letras diferentes a/b: indicam que há diferença estatística. Nível de significância = 5%.

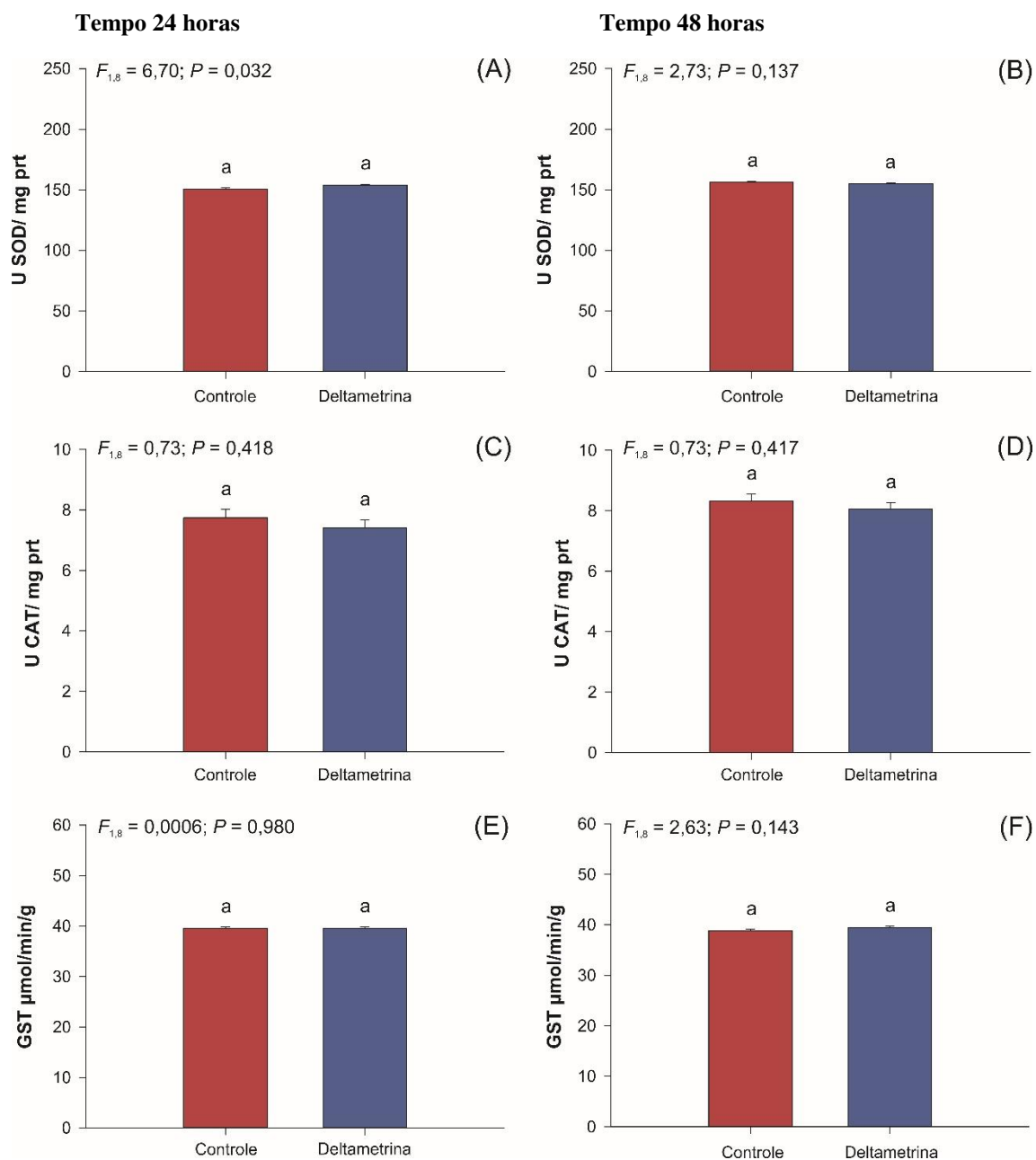


Figura 6: Atividades das enzimas envolvidas nas respostas antioxidantes da cabeça de L4 de *Ae. aegypti* da cepa resistente submetidas à concentração de 7 ppb de deltametrina após diferentes tempos de exposição **24h** (A; C; E) e **48h** (B; C; F). **A-B:** Atividade da superóxido dismutase (SOD) medida em unidades (U) por miligrama de proteína. **C-D:** Atividade da catalase (CAT) medida em unidade (U) de catalase por miligrama de proteína. **E-F:** Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) medida em micromol/por minuto/por grama de tecido. Letras diferentes a/b: indicam que há diferença estatística. Nível de significância = 5%.

3.3 Morfologia

3.3.1 Apoptose – caspase 3

Não foram detectadas células positivas para caspase 3 no intestino médio das L4 expostas por 24h e 48h, em ambas linhagens susceptível (Fig.7 A-F; Fig8. A-F) e resistente (Fig.7 G-L; Fig.8 G-L).

3.3.2 Proteína JNK

Foram detectadas células JNK-positivas no intestino médio de L4 susceptíveis do controle (Fig.7 C) e expostas (Fig.7 E-F) após 24h de exposição à deltametrina. O número de células não diferiu significativamente entre os grupos ($17,4 \pm 1,74$ e $16,6 \pm 2,35$ células, respectivamente) (Fig. 11 A). Também foram detectadas marcações positivas nas L4 resistentes do grupo controle (Fig.7 G-I) e nas tratadas 24h após a exposição (Fig.7 J-L). O número de células JNK-positivas reduziu nas L4 tratadas ($71,6 \pm 16,91$ células, Fig. 11 A), em comparação com o controle ($138 \pm 18,38$ células, Fig. 11 A). Não foram encontradas células JNK-positivas nas populações susceptíveis (Fig.8 A-F) e resistentes (Fig.8 G-L) expostas por 48h.

3.3.3 Proteína WNT

Não foram detectadas células WNT-positivas nas L4 susceptíveis (Fig.9 A-F) e resistentes (Fig.9 G-L) expostas por 24h. Células WNT-positivas foram detectadas apenas em L4 susceptíveis não expostas (controle) expostas por 48h (Fig.10 A-C; $132 \pm 21,51$ células, Fig.11 B).

3.3.4 Mitose - PH3

Não foram detectadas células positivas para PH3 as L4 susceptíveis (Fig.9 A-F) e resistentes (Fig.9 G-L) expostas por 24h. Células positivas foram detectadas apenas em L4 susceptíveis e expostas por 48h (Fig.10 D-E; $38,6 \pm 3,99$ células, Fig.11 C). Células positivas foram detectadas no intestino médio de L4 resistentes do controle (Fig.10 H-I) e expostas à deltametrina (Fig. 10 L-K). O número de células PH3-positivas foi superior nas L4 controle ($49,6 \pm 3,58$ células, Fig.11 C) em relação às L4 tratadas ($18,8 \pm 1,81$ células, Fig.11 C).

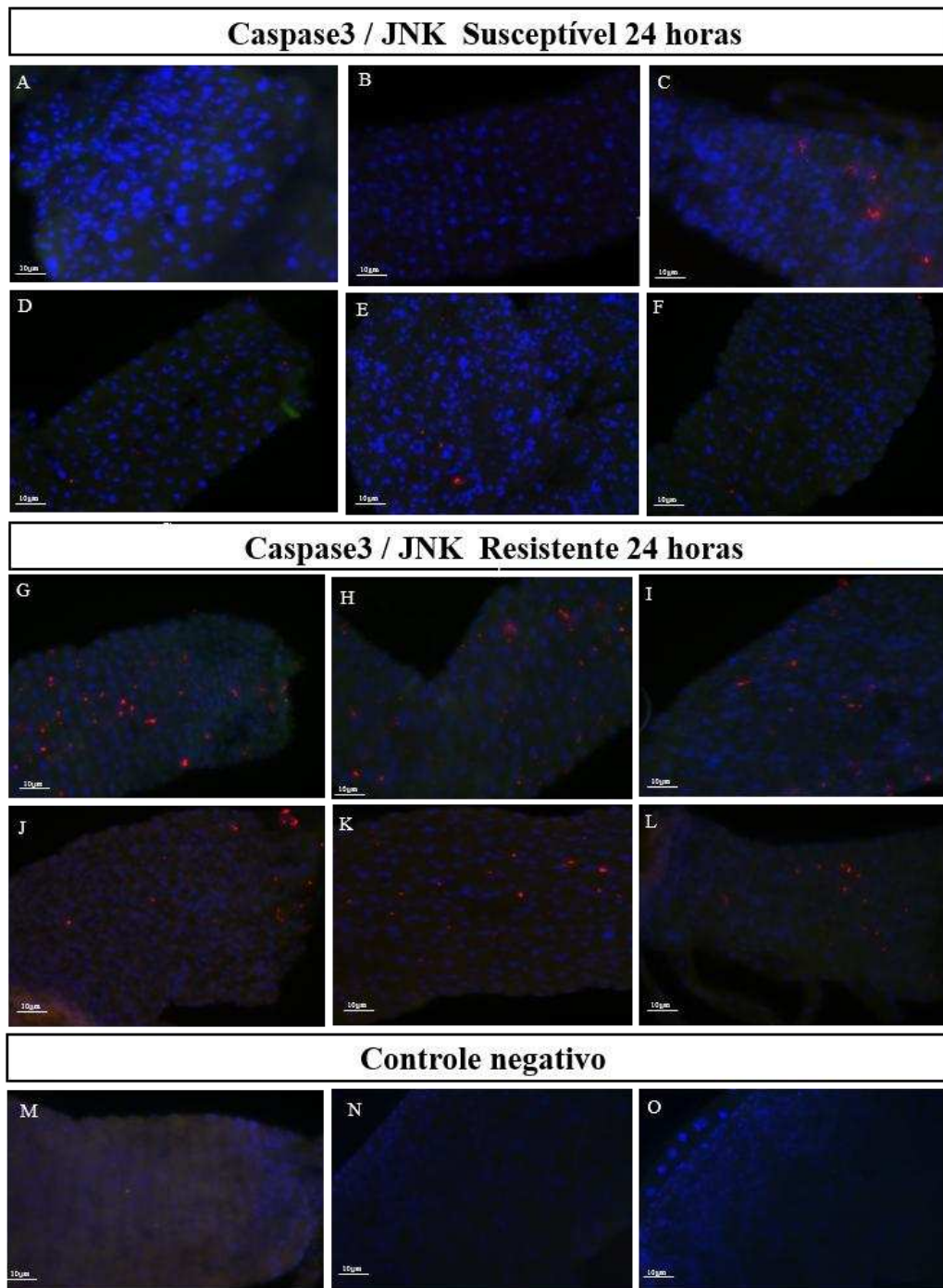


Figura 7: Imunomarcacão para caspase 3 e JNK no intestino médio de larvas L4 de *Ae. aegypti* das linhagens susceptível e resistentes após 24h de exposição à deltametrina. **A-C:** controle ou não exposto; **D-F:** grupo tratado; **G-I:** grupo controle; **J-L:** grupo tratado; **M-O:** controle negativo. **Vermelho:** marcação positiva para JNK; **Azul:** núcleos corados com DAPI; **A, D, G, F, M:** região anterior **B, E, H, K, N:** região mediana; **C, F, L, O:** região posterior do intestino médio.

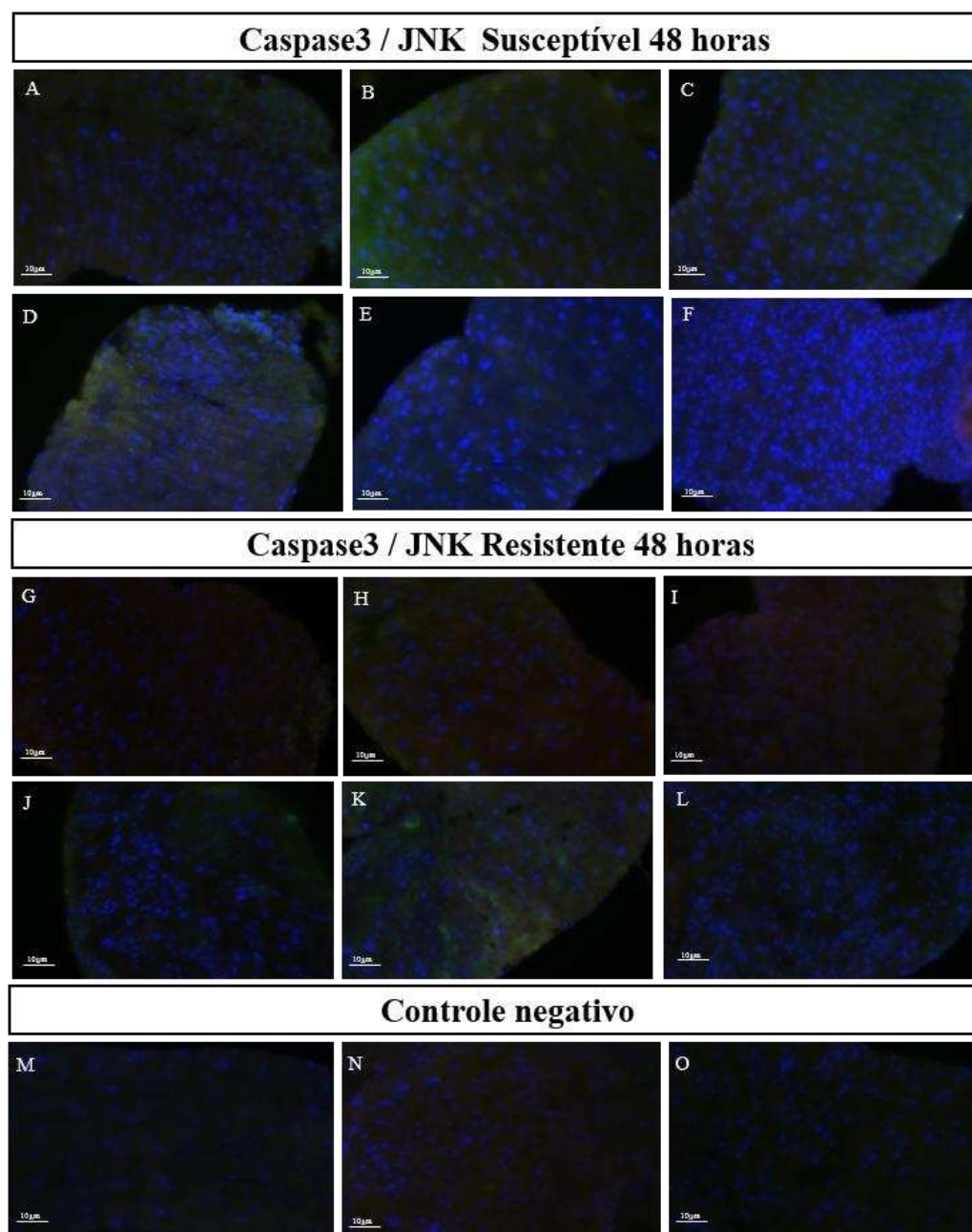


Figura 8: Imunomarcacão para caspase 3 e JNK no intestino médio de larvas L4 de *Ae. aegypti* das linhagens susceptível e resistentes após 48h de exposição à deltametrina.

A-C: controle ou não exposto; D-F: grupo tratado; G-I: controle ou não exposto; J-L: grupo tratado; M-O: controle negativo; **Azul:** núcleos corados com DAPI; A,D,G,F,M: região anterior B,E,H,K,N: região mediana; C,F,L,O: região posterior do intestino médio.

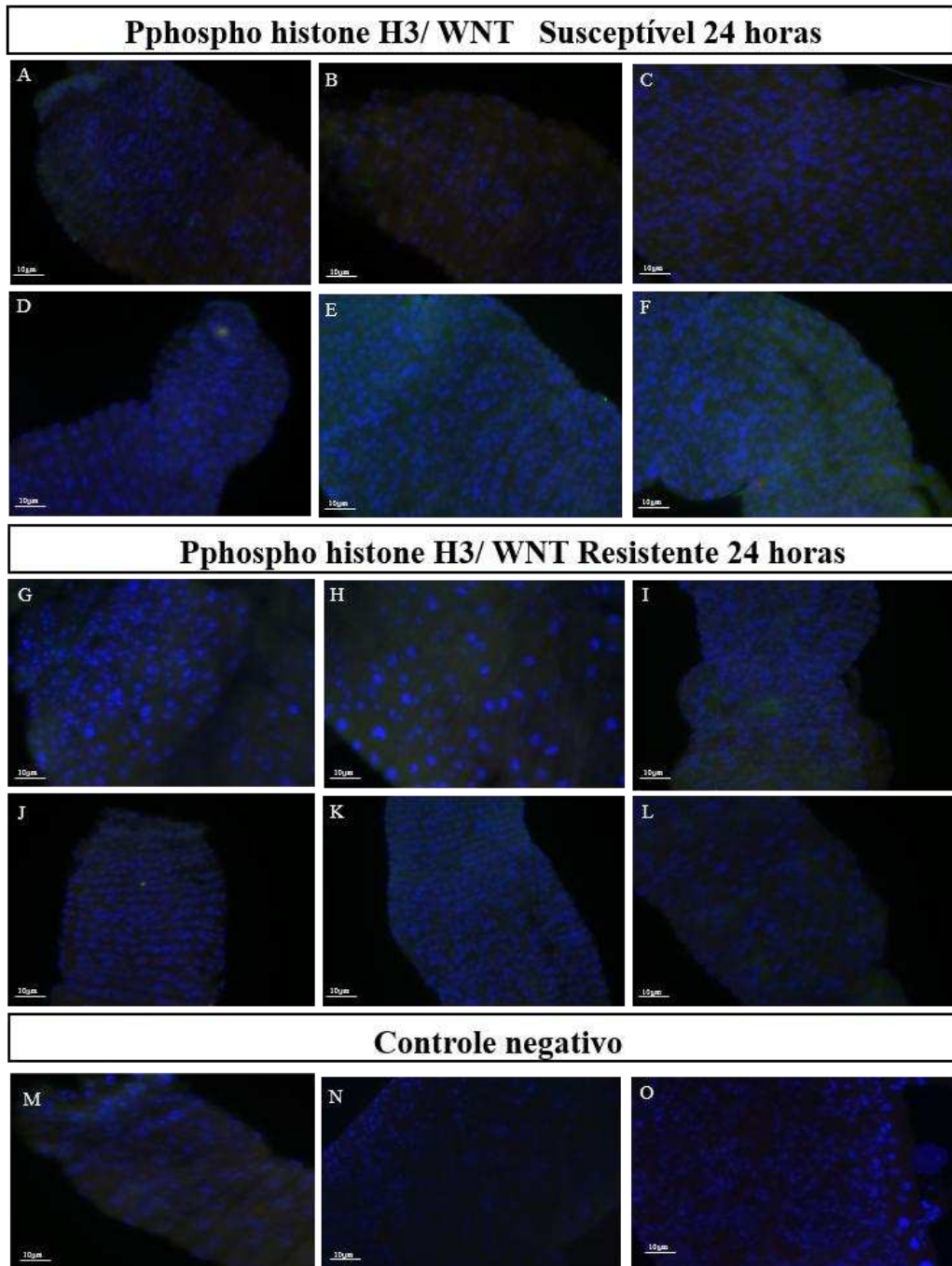


Figura 9: Imunomarcção para Phospho histona H3 e WNT no intestino médio de larvas L4 de *Ae aegypti* das linhagens susceptível e resistentes após 24h de exposição à deltametrina. **A-C:** controle ou não exposto; **D-F:** grupo tratado; **G-I:** controle ou não exposto; **J-L:** grupo tratado; **M-O:** controle negativo. **Azul:** núcleos corados com DAPI; **A,D,G,F,M:** região anterior **B,E,H,K,N:** região mediana; **C,F,L,O:** região posterior do intestino médio.

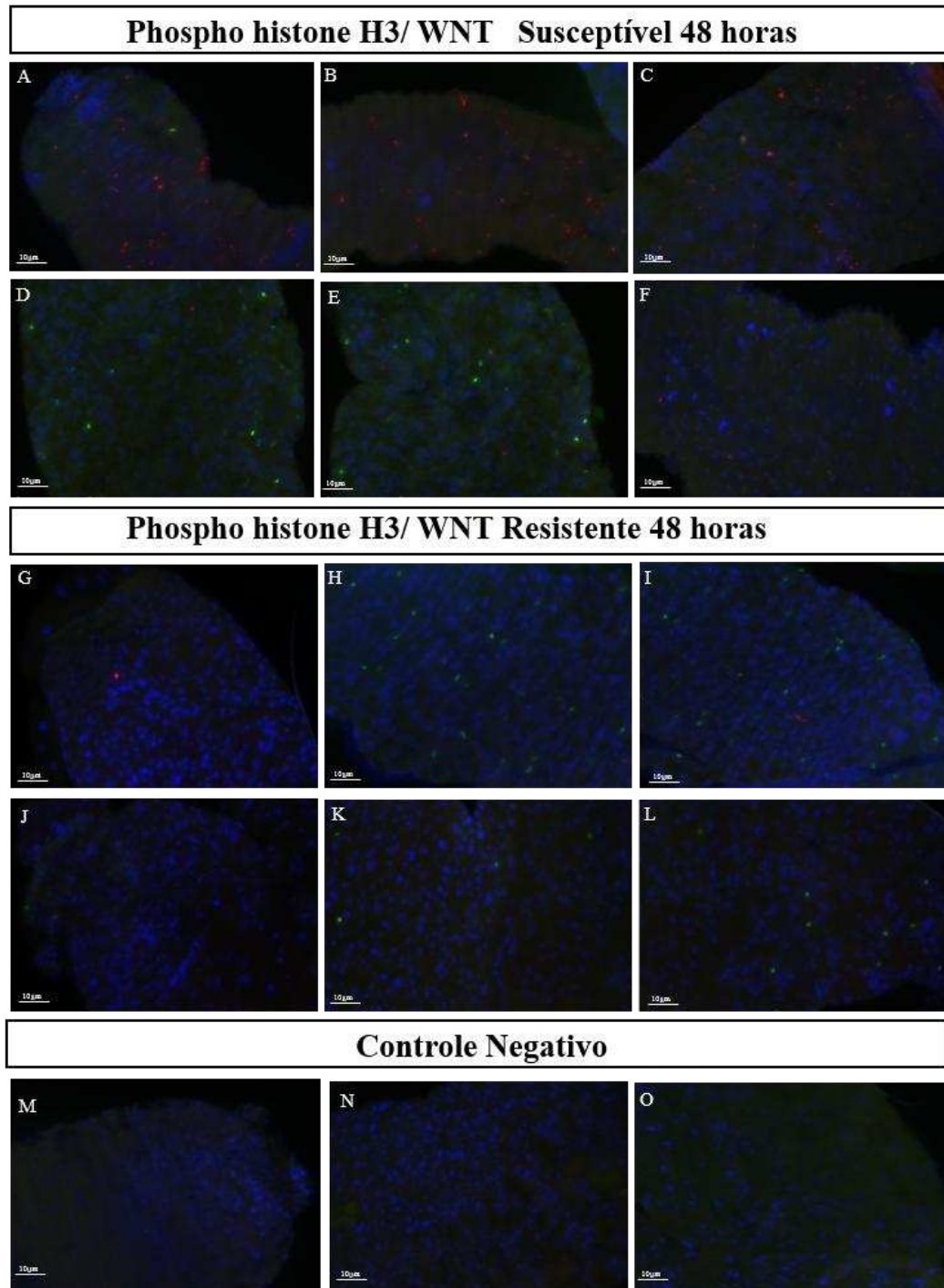


Figura 10: Imunomarcção para Phospho histona H3 e WNT no intestino médio de larvas L4 de *Ae aegypti* das linhagens susceptível e resistentes após 48h de exposição à deltametrina. **A-C:** controle ou não exposto; **D-F:** grupo tratado; **G-I:** controle ou não exposto; **J-L:** grupo tratado; **M-O:** controle negativo. **Verde:** marcação positiva para PH3; **Vermelho:** marcação positiva para WNT; **Azul:** núcleos corados com DAPI; **A,D,G,F,M:** região anterior **B,E,H,K,N:** região mediana; **C,F,L,O:** região posterior do intestino médio.

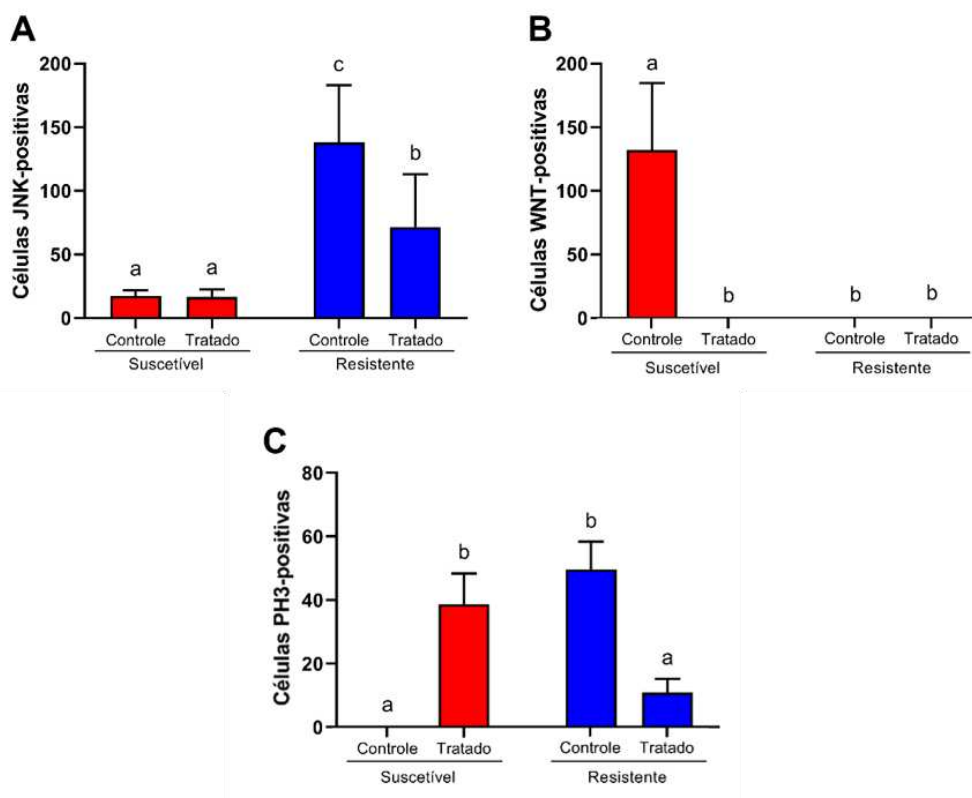


Figura 11: Número de células positivas para as proteínas no intestino médio de L4 de *Ae. aegypti* susceptíveis e resistentes à deltametrina, expostas por 24h e 48h a deltametrina. **A:** Células JNK-positivas após 24h de exposição; **B:** Células WNT-positivas após 48h de exposição; **C:** Células- PH3positivas após 48h de exposição; Barras verticais representam o desvio padrão ($\pm$ SD). Letras diferentes indicam diferenças significativas com base no teste de Tukey's ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Para as concentrações de deltametrina testadas (3, 5 e 7 ppb), as L4 susceptíveis e resistentes apresentaram diferentes níveis de mortalidade, proporcionais ao aumento na concentração e tempos de exposição. Nossos dados concordam com os da literatura, que apontam a deltametrina como um dos inseticidas mais tóxicos e que afeta a sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* (Tomé et al. 2014; Viana-Medeiros et al., 2017; Valbon et al., 2018). Apesar dos piretroides serem pouco absorvidos pelo tegumento, eles são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a administração oral ou pelo trato respiratório através da inalação. Após a absorção, esse inseticida age causando paralisia e morte, efeito de choque denominado “*knock down*” (Soderlund, 2002; Santos, 2007).

Além de afetar a sobrevivência, a exposição à deltametrina interferiu no desenvolvimento. As L4 tratadas da população susceptível, apresentaram um atraso na emergência de adultos em relação ao controle. O desenvolvimento prolongado de larvas é desvantajoso, pois aumenta o risco de exposição a fatores ambientais como predação e xenobióticos, os quais podem reduzir a sobrevivência (Janssens et al., 2012). Para os indivíduos resistentes, o impacto da exposição no tempo de emergência dos adultos foi pouco expressiva para os indivíduos derivados de L4 expostas em comparação aos não expostos. Em *Ae. aegypti*, a velocidade do desenvolvimento larval tem sido relacionada aos níveis de resistência à inseticidas como deltametrina e temefós em condições de laboratório (Martins et al., 2012; Brito et al., 2013; Diniz et al., 2015; Saingamsook et al., 2019).

A deltametrina interfere no comportamento de larvas suscetíveis e resistentes (Marriel et al 2016). Somando-se a esse fato, nossos dados evidenciam que o piretroide também apresenta efeitos subletais que impactam no desenvolvimento de L4 de *Ae. aegypti* das duas linhagens testadas. As complicações no comportamento podem levar à dificuldade no forrageamento e alimentação. Logo, a larva com dificuldade para se alimentar, demoraria mais para se desenvolver, além dos efeitos neurotóxicos, anteriormente apontados, que poderiam impactar na homeostase da larva.

Vários estudos têm sido direcionados para a análise dos efeitos letais e mecanismos de resistência à deltametrina em *Ae. aegypti* (Rodríguez et al., 2005; Martins et al., 2009; Kumar et al., 2011; Lima et al., 2011; Stevenson et al., 2012; Lien et al., 2018; Chen et al., 2019; Amelia-Yap et al., 2019), no entanto, pouco se sabe sobre a toxicidade e os efeitos subletais da deltametrina em larvas de *Ae. aegypti*. Aqui demonstramos, pela primeira vez, dados referentes ao quadro de estresse oxidativo na cabeça (cérebro) de larvas das linhagens resistente e susceptível tratadas com deltametrina, 24 e 48h após a exposição.

A exposição à deltametrina induziu o estresse oxidativo no intestino das L4 suscetíveis, o que foi evidenciado pelo aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST em relação ao controle. Diferente das L4 suscetíveis, a exposição ao piretroide não interferiu na atividade das respectivas enzimas nas L4 suscetíveis. O aumento na atividade da enzima SOD é resultante da grande quantidade de radical superóxido em função do estresse oxidativo. Dessa maneira, a enzima estaria tamponando o excesso de superóxido por meio da reação de dismutação, a qual irá converter esse radical instável em peróxido de hidrogênio, substrato que posteriormente será alvo de atuação da catalase e glutatona (Wang et al., 2018).

Considerando o aumento significativo na atividade de GST na cabeça e no intestino médio das L4 suscetíveis, pode-se inferir que, provavelmente, o efeito da toxicidade da

deltametrina envolve a superprodução do substrato, como o peróxido de hidrogênio, estimulando assim o aumento na atividade (Hayes & Pulford 1995). Considerando que a GST está envolvida com a biotransformação de moléculas, principalmente aldeídos e lipídios resultantes da peroxidação (Hayes et al., 2004), a atividade enzimática pode ter atuado para conter os danos provenientes da peroxidação lipídica. A exposição não interferiu na atividade da enzima nas L4 resistentes. Linhagens de *Ae aegypti* resistentes à deltametrina tem sido caracterizadas pelo aumento na atividade e níveis elevados das enzimas desintoxicantes como a GST (Viana-Medeiros et al., 2017; Valbon et al., 2019; Amelia-Yap et al 2019).

Não foi observada diferença na atividade da CAT entre as L4 expostas e controle das linhagens susceptível e resistente no intestino médio e cabeça. A via metabólica dos substratos provenientes da ação da SOD, como o peróxido de hidrogênio, sofre ação tanto da GST quanto da CAT (Barbosa et al., 2010). Podemos inferir que o aumento da atividade da GST em relação à atividade da CAT na população susceptível, pode ser devido à existência de uma via preferencial que metaboliza o peróxido de hidrogênio, e que provavelmente passa pela principalmente pela atuação da enzima GST. A CAT é mais eficaz quando há concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio. Em baixas concentrações deste composto ou outros peróxidos, o sistema de defesa da glutathione entra em ação (Halliwell & Gutteridge, 1985).

A exposição à deltametrina não induziu estresse oxidativo na cabeça nas L4 resistentes, ao passo que para as susceptíveis, a atividade das enzimas SOD e GST aumentou. Diante de concentrações subletais, o metabolismo basal dos insetos pode aumentar em resposta ao estresse fisiológico imposto pelo pesticida (Rasmussen et al., 2012). No entanto, para as L4 resistentes, não verificamos aumento na atividade enzimática, mas constatamos a manutenção na atividade das enzimas no grupo tratado e controle. As L4 resistentes aqui estudadas possuem níveis enzimáticos superiores aos das susceptíveis (Valbon et al., 2019). Dessa maneira, os níveis das enzimas de desintoxicação nas L4 resistentes são suficientes para manter a homeostase nos órgãos estudados.

O caráter multifatorial da resistência com a ocorrência das mutações V410L/F1534C e o aumento da atividade enzimática desintoxicante das L4 resistentes (Haddi et al., 2017; Valbon et al., 2019) poderiam explicar a ausência de estresse oxidativo nesta linhagem após a exposição. Essas mutações reduzem a sensibilidade nos canais de sódio, que são o sítio-alvo de atuação dos piretroides tipo I e tipo II, contribuindo assim, para o fenótipo de resistência (Dong et al., 2014; Zhorov et al., 2016; Haddi et al., 2017).

O mecanismo de ação da deltametrina já é bem descrito na literatura, tendo como alvo principal o sistema nervoso central (Narahshi, 1985; Soderlund Bloonquist, 1989; Bradyberry et al., 2005). Sendo assim, nosso trabalho focou na análise de seus possíveis efeitos no intestino médio, órgão até então não estudado após a exposição ao inseticida. Nossos resultados evidenciaram que as L4 de *Ae. aegypti* das linhagens suscetível e resistentes tratadas com deltametrina apresentaram expressão diferencial de proteínas (caspase-3, JNK, WNT e PH3). Nas duas linhagens de L4, nos diferentes tempos (24h e 48h) de exposição e concentrações testadas, o tratamento não induziu apoptose nas células intestinais, apesar do estresse oxidativo detectado pelas alterações da atividade enzimática. A exposição à deltametrina também não afetou a morfologia dos enócitos de larvas suscetíveis e resistentes de *Ae. Aegypti* (Marriel et al., 2016). O tratamento com a deltametrina também não provocou apoptose no intestino médio do inseto aquático *Callibaetis radiatus* (Ephemeroptera) (Gutiérrez et al., 2016), algo que pode ser explicado pelo fato do órgão não ser o principal sítio de ação da deltametrina.

O número de células JNK-positivas no intestino médio de L4 resistentes expostas à deltametrina por 24h foi superior aos das L4 suscetíveis equivalentes. Além disso, o número de células JNK-positivas foi maior em L4 não expostas (controle) em relação às resistentes e expostas. Em *Drosophila melanogaster*, a JNK regula o crescimento e proliferação celular no intestino, o que poderia explicar a marcação positiva nas duas linhagens. Além disso, foi verificado que em adultos de *D. melanogaster* expostos ao inseticida neurotóxico paraquat, a atividade de sinalização da JNK leva à superexpressão de genes protetores que conferem tolerância ao estresse oxidativo (Wang et al., 2003). O fato do número de células JNK-positivas no intestino médio de L4 resistentes de *Ae. aegypti* ser maior aos das suscetíveis, sugere a necessidade de se realizar mais estudos para identificar o possível papel da via na proteção ao estresse oxidativo em mosquitos.

Além da detecção de células positivas para JNK, a detecção de células positivas para WNT ocorreu no intestino médio das L4 suscetíveis e das não expostas (controle) à deltametrina, o que poderia ser mais um indicativo da ocorrência de proliferação celular em condições normais. Tendo em vista que L4 precede a metaformose, as células WNT-positivas poderiam estar desempenhando funções atreladas à proliferação celular, homeostase e regeneração intestinal que antecedem a reconstrução do órgão (Wodarz e Nusse 1998; Swarup et al., 2012; Fernandes et al. 2014; Tian et al., 2018,).

A exposição de L4 suscetíveis e resistentes à deltametrina por 48h interferiu na quantidade de células PH3-positivas do intestino médio. Na população suscetível, houve um aumento de células positivas após a exposição. A regeneração do epitélio intestinal depende

da proliferação e diferenciação das células regenerativas, e permite que insetos se recuperem e sobrevivam após exposição ao inseticida. A substituição celular também é importante para a homeostase intestinal (Okuda et al., 2007; Fernandes et al., 2015; 2019). Já para as L4 resistentes, o número de células PH3-positivas foi superior nas L4 do controle em relação às expostas. Essa redução poderia interferir na renovação do epitélio intestinal durante o desenvolvimento. Sendo assim, diferente das L4 resistentes, as susceptíveis respondem ao tratamento com a deltametrina com a renovação das células epiteliais.

Nossos resultados mostraram como as L4 de *Ae. aegypti* das linhagens susceptível e resistentes respondem diferencialmente ao estresse provocado pela exposição com doses subletais de deltametrina em diferentes faixas de tempo e concentrações em condições de laboratório. A exposição com a deltametrina induziu estresse oxidativo no intestino médio e cabeça de larvas susceptíveis após 24h e 48h de exposição, ao passo que na população resistente o aumento na atividade das enzimas não foi significativa, confirmando que nesta linhagem específica há resistência metabólica, além de genética (Haddi et al. 2017; Valbon et al. 2019).

Nossos dados mostram como as duas linhagens diferem quanto à sobrevivência, desenvolvimento, estresse oxidativo e imunomarcações, frente aos efeitos subletais da deltametrina. A exposição das L4 susceptíveis e resistentes à deltametrina por 24h interferiu na quantidade de células JNK-positivas. Além da Jnk, a presença de células WNT-positivas nas L4 suscetíveis não expostas indica a ocorrência de proliferação celular. Após 48h de exposição, o tratamento influenciou no número de células PH3-positivas. Esses dados mostram a importância do entendimento dos efeitos subletais da deltametrina em diferentes órgãos de larvas de *Ae. aegypti*. Esses fatores devem ser levados em consideração para uma análise completa dos impactos do inseticida na homeostase da cabeça e no intestino médio larvas. Além de contribuir para análise dos efeitos fisiológicos que irão refletir na biologia do mosquito.

5. REFERÊNCIAS

- Alves, S. N., Serrão, J. E., & Melo, A. L. (2010). Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*, 41(6), 592-597.
- Amelia-Yap, Z. H., Sofian-Azirun, M., Chen, C. D., Suana, I. W., Lau, K. W., Elia-Amira, N. M. R., & Low, V. L. (2019). Pyrethroids use: threats on metabolic-mediated resistance mechanisms in the primary dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 56(3), 811-816.

- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo; conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23(4), 629-643.
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism-Clinical and Experimental*, 49(2), 3-8.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24(2), 93-106.
- Braga I A, & Valle D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 279-293.
- Brito, L. P., Linss, J. G., Lima-Camara, T. N., Belinato, T. A., Peixoto, A. A., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2013). Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLOS One*, 8(4).
- Chen, M., Du, Y., Wu, S., Nomura, Y., Zhu, G., Zhorov, B. S., & Dong, K. (2019). Molecular evidence of sequential evolution of DDT-and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007432.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81-106.
- Diniz, D. F. A., de Melo-Santos, M. A. V., de Mendonça Santos, E. M., Beserra, E. B., Helvecio, E., de Carvalho-Leandro, D., & Ayres, C. F. J. (2015). Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites & Vectors*, 8(1), 662.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 1-17.
- El Sobky, M. M., Ismail, H. I., & Assar, A. A. (2016). Histochemical effects of some biological agents on *Culex pipiens* larvae. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 46(1), 81-92.
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29 (2), 187-197.

- Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2014). *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, 63(3), 506-512.
- Fernandes, K. M., Gonzaga, W. G., Pascini, T. V., Miranda, F. R., Tomé, H. V. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2015). Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (*Aedes aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, 29(3), 245-254.
- Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Miranda, F. R., Gonçalves, W. G., Pascini, T. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. (2019). *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, 221, 464-470.
- Godoy, R. S., Fernandes, K. M., & Martins, G. F. (2015). Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera, Culicidae). *Scientific Reports*, 5, 15836.
- Gutiérrez, Y., Santos, H. P., Serrão, J. E., & Oliveira, E. E. (2016). Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiatus*. *PLOS One*, 11(3).
- Haddi, K., Tomé, H. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., & Oliveira, E. E. (2017). Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific Reports*, 7, 46549.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1985). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 1-85). Academic Press.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2004). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 51-88.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445-520.
- Hemingway J & Ranson H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 371-391.
- Janssens, L., & Stoks, R. (2012). How does a pesticide pulse increase vulnerability to predation? Combined effects on behavioral antipredator traits and escape swimming. *Aquatic Toxicology*, 110, 91-98.

- Klowden MJ. Physiological Systems in Insects. (2013.) 3rd edition. Elsevier Academic Press: San Diego.
- Kodrík, D., Bednářová, A., Zemanová, M., & Krishnan, N. (2015). Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects—an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25788-25816.
- Kumar, S., Thomas, A., Pillai, M. K. K. (2011). Deltamethrin: Promising mosquito control agent against adult stage of *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(6), 430-435.
- Lien N. T. K, Ngoc N. T. H, Hien N. T, Hoang N. H, Binh N. T. H, (2018). Two novel mutations in the voltage-gated sodium channel associated with knockdown resistance (kdr) in the dengue vector *Aedes aegypti* in Vietnam. *Journal of Vector Ecology*. 43: 184–189.
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., Da Silva, E. V., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., & de Melo Santos, M. A. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*, 4(5), 2-12.
- Lu, Q., Sun, Y., Ares, I., Anadón, A., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2019). Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research*, 170, 260-281.
- Majumdar, S., Amir, M., Gupta, R., & Yasmeen, S. (2016). Histopathological effect of deltamethrin on the midgut of American cockroach, *Periplaneta americana* (Linn.)(Dictyoptera: Blattidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4, 13-16.
- Marriel, N. B., Tomé, H. V. V., Guedes, R. C. N., & Martins, G. F. (2016). Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitos (*Aedes aegypti*). *Acta Tropica*, 158, 88-96.
- Martins, A. J., de Andrade Lins, R. M. M., Linss, J. G. B., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 108-115.
- Martins, A. J., Bellinato, D. F., Peixoto, A. A., Valle, D., & Lima, J. B. P. (2012). Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLOS One*, 7(3), e31889.

- Martinez, J. D., Cardenas-de la Garza, J. A., & Cuellar-Barboza, A. (2019). Going viral 2019: Zika, chikungunya, and dengue. *Dermatologic Clinics*, 37(1), 95-105.
- Narahashi, T. (1985). Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. *Neurotoxicology (USA)*.
- Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology & Toxicology*, 79(1), 1-14.
- Okuda, K. et al. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* 53, 1307–1315 (2007).
- Paiva, D. R., Lima, D. P., Avvari, N. P., Arruda, E. J., Cabrini, I., Marques, M. R., & Beatriz, A. (2017). A potent larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito from cardanol. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(1), 373-382.
- Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xenobiotics (pp. 133-224). New York: McGraw-Hill.
- Plavšin, I., Stašková, T., Šerý, M., Smýkal, V., Hackenberger, B. K., & Kodrík, D. (2015). Hormonal enhancement of insecticide efficacy in *Tribolium castaneum*: oxidative stress and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 170, 19-27.
- Rasmussen, J. (2012). Pesticide effects on the structure and function of stream ecosystems (Doctoral dissertation, Aarhus University. Department of Bioscience).
- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 174-193.
- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 174-193.
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., De Armas, Y., & Ramos, F. (2005). Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4), 437-445.
- Rose R I. (2001). Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 17.

- Saingamsook, J., Yanola, J., Lumjuan, N., Walton, C., & Somboon, P. (2019). Investigation of Relative Development and Reproductivity Fitness Cost in Three Insecticide-Resistant Strains of *Aedes aegypti* from Thailand. *Insects*, 10(9), 265.
- Santos, M. D., Areas, M. A., & Reyes, F. G. R. (2007). Piretroides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(3), 339-349.
- Santos, H. P., Gutiérrez, Y., Oliveira, E. E., & Serrão, J. E. (2018). Sublethal dose of deltamethrin damage the midgut cells of the mayfly *Callibaetis radiatus* (Ephemeroptera: Baetidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1418-1427.
- Shekhar, C. (2014). Pyrethroid pesticides induced impairments in midgut histo-architecture of naiad of *Trithemis aurora* (Burm.) dragonfly (Odonata: Libellulidae). *Advances in Bio Research*, 5(2), 130-137.
- Smith, L. B., Kasai, S., & Scott, J. G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 1-12.
- Stevenson, B. J., Pignatelli, P., Nikou, D., & Paine, M. J. (2012). Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1595.
- Silva Costa, M., de Paula, S. O., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., Santana, A. E. G., & Serrão, J. E. (2016). Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. *PLOS One*, 11(8), e0160928.
- Stefanini, M., De Martino, C. E. S. A. R. E., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 77-96.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D & Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 3-59.
- Swarup, S., & Verheyen, E. M. (2012). Wnt/wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a007930.

- Tian, A., Benchabane, H., & Ahmed, Y. (2018). Wingless/Wnt signaling in intestinal development, homeostasis, regeneration and tumorigenesis: a *Drosophila* perspective. *Journal of Developmental Biology*, 6(2), 8.
- Tomé, H. W., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. (2014). Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 7, 195.
- Valbon, W. R., Cruz, F. M., Ramos, G. S., Tomé, H. V., & Oliveira, E. E. (2018). Sublethal exposure to deltamethrin reduces the abilities of giant water bugs to prey upon *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, 191, 350-356.
- Valbon, W. R., Haddi, K., Souza, R. A., Carvalho, G. A., Guedes, R. N. C., Martins, G. F., & Oliveira, E. E. (2019). "Armed to the teeth": The multiple ways to survive insecticidal and predatory challenges in *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 156, 87-95.
- Viana-Medeiros, P. F., Bellinato, D. F., Martins, A. J., & Valle, D. (2017). Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (*Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 340-350.
- Vontas, J. G., Graham, J., & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357(1), 65-72.
- Wang, M. C., Bohmann, D., & Jasper, H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 5(5), 811-816.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology* 217(6), 1915-1928.
- Wodarz, A., & Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1), 59-88.
- Yang, M., Wang, B., Gao, J., Zhang, Y., Xu, W., & Tao, L. (2017). Spinosad induces programmed cell death involves mitochondrial dysfunction and cytochrome C release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Chemosphere*, 169, 155-161.

Yasmeen, S., & Amir, M. (2016). Studies of histopathological effects of deltamethrin on the midgut of oriental latrine fly, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Global Biosciences*, 5(6), 4206-4212.

Zhorov, B. S., & Dong, K. (2017). Elucidation of pyrethroid and DDT receptor sites in the voltage-gated sodium channel. *Neurotoxicology*, 60, 171-177.

CAPÍTULO 3 EXTRA - A glândula salivar de *Aedes aegypti* e o Zika Vírus

Em *Aedes aegypti* tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de néctar, mas apenas as fêmeas possuem hábito hematofágico. A partir do repasto sanguíneo as fêmeas obtêm os nutrientes necessários para a vitelogênese sendo consideradas analtógenas, ou seja, a maturação completa dos ovócitos só ocorre após o repasto sanguíneo (Christophers, 1960; Forattini, 2002). Esta diferença do hábito alimentar entre machos e fêmeas se reflete nas glândulas salivares dos adultos que são sexualmente dimórficas. As diferenças estruturais e funcionais das glândulas salivares garantem às fêmeas sucesso durante a hematofagia (James, 1994; Stark & James 1996).

A glândula salivar de mosquitos está localizada no tórax, é um órgão par trilobado que se conecta a um ducto salivar principal (Fig1). Cada lóbulo se conecta ao ducto salivar por canais salivares revestidos por uma cutícula que se estende por toda glândula. Os lóbulos são formados por um epitélio simples onde células secretoras rodeiam o ducto salivar. As fêmeas possuem dois lóbulos laterais idênticos e um lóbulo mediano mais curto e mais largo. As glândulas são organizadas em três regiões com pelo menos três tipos de células secretoras. A região proximal dos lóbulos laterais produz enzimas que estão envolvidas na ingestão de dieta açucarada, que são funcionalmente e morfológicamente semelhantes às glândulas salivares dos machos. Os outros tipos de células secretoras, localizados na região mediana e distal dos três lóbulos são específicas da fêmea (James & Rossignol 1991; Janzen & Wright, 1971; Juhn et al., 2011). Em *Ae. aegypti* a glândula salivar nos adultos completa o desenvolvimento três dias após a emergência e aumenta de tamanho principalmente devido ao acúmulo de produto secretado e não à multiplicação celular. O envelhecimento do órgão inicia-se entre 10 e 15 dias de idade e afeta as regiões posteriores (Orr et al., 1961; Beckett, 1990).

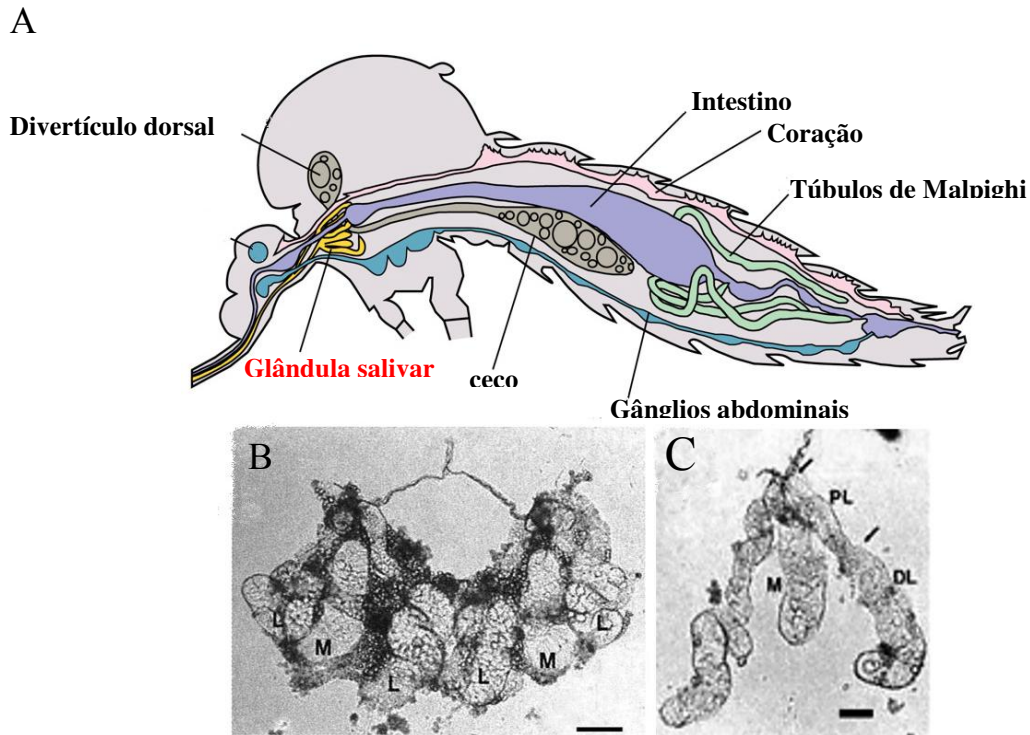
As células das glândulas salivares são responsáveis pelo movimento da água para o interior do lúmen da glândula. Esse movimento é resultante da criação de um gradiente osmótico através de uma bomba de H-ATPase na membrana plasmática das células glandulares. As glândulas não são diretamente innervadas, embora nas fêmeas de *Ae. aegypti*, um plexo de nervos rodeie uma parte dela. Tanto em *Aedes* quanto em *Calliphora*, a serotonina, que atua diretamente na glândula, regula a produção e liberação de saliva. A serotonina é liberada do plexo neural e a produção de saliva resulta da estimulação de quimiorreceptores nas partes bucais (Chapman, 2013). Esta secreção salivar, que é importante para a lubrificação bucal, solubilização de alimentos e outros aspectos importantes da fisiologia dos insetos, também contém potentes componentes farmacologicamente ativos que modulam a homeostasia do

hospedeiro, a inflamação e o sistema imunológico, que ajudam os vetores da doença a sondar e alimentar melhor (Marquardt, 2004).

A glândula salivar dos mosquitos também desempenha um papel importante na transmissão de arbovírus, uma vez que a infecção é parte essencial do ciclo de transmissão. Além disso, ela produz numerosas moléculas anti-coagulantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras, que facilitam a sondagem e aquisição do sangue durante o repasto (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro & Arcà, 2009). A saliva pode diminuir a resposta imune do hospedeiro vertebrado à infecção por arbovírus, o que leva a um aumento dos níveis de viremia e o risco de transmissão de vírus (Schneider & Higgs, 2008; James, 1994; Stark & James, 1996). Tendo em vista a importância da glândula salivar, a fim de caracterizar melhor as suas funções e propriedades, diferentes estudos tem avaliado os aspectos referentes às propriedades da saliva (Chagas et al., 2014; Conway et al., 2016; Hastings et al., 2019; Sri-In et al., 2019; Sun et al., 2020), dinâmicas de replicação do vírus (Raquin, & Lambrechts, 2017; Sanchez-Vargas et al., 2019; Robison et al., 2020) genética (Juhn et al., 2011; Nguyen et al., 2013; Göertz et al., 2019) e proteoma do órgão (Dhawan et al., 2017).

Apesar dos mecanismos específicos pelos quais os parasitos infectam as glândulas salivares não sejam bem caracterizados ao nível molecular, o que medeia o reconhecimento do patógeno e a invasão das glândulas salivares está relacionado à interação ligante-receptor na superfície do órgão (Beerntsen & Christensen, 2000). Para alguns organismos esses aspectos já foram caracterizados. Por exemplo, utilizando o modelo *Plasmodium gallinaceum* – *Ae. aegypti* Pimenta e colaboradores (1994) descreveram a invasão das glândulas salivares do mosquito por esporozoítos. Sabe-se que pelo menos quatro antígenos nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* podem potencialmente servir como moléculas receptoras para a invasão de esporozoítos e peptídeos imunes podem influenciar na transmissão dos patógenos (Dimopoulos et al., 1998; Barreau et al., 1999; Beerntsen & James, 2000).

Figura 1 – Glandula salivar de *Aedes aegypti*



(A) Desenho esquemático indicando a posição anatômica da glândula salivar em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* (modificado de Schmid et al., 2017); (B) Glândulas salivares emparelhadas de uma fêmea adulta. Os lóbulos laterais (L) e mediano (M) estão associados ao corpo gorduroso; (C) Glândula salivar de fêmea com lóbulos mediano (M), proximal-lateral (PL) e distal-lateral (DL) (modificado de James, 2003).

Para DENV2 (vírus dengue tipo 2) e CHIKV (vírus chikungunya) sabe-se que a infecção ocorre a partir dos lóbulos lateral e mediano proximal de *Ae. aegypti*, enquanto que o vírus Sindbis (SINV) parece não infectar o lóbulo mediano de *Aedes albopictus* ou *Ae. aegypti* (Bowers et al., 1995; Salazar et al., 2007; Tchankouo-Nguetcheu et al., 2012; Ciano et al., 2014). Os lóbulos laterais distais das glândulas salivares possuem receptores que permitem a endocitose dos vírus (Salazar et al., 2007). Após a replicação, o vírus é depositado nas cavidades secretoras das células glandulares acinares, o que pode permitir a inoculação no hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Forrester et al., 2014). A infecção por SINV resultou numa resposta apoptótica específica dos lóbulos laterais das glândulas salivares de *Ae. albopictus*. O mesmo padrão de resposta não foi observado nos músculos intestinais infectados, o que indica que a apoptose associada a SINV seja tecido-específica (Kelly et al., 2012).

A infecção por DENV em *Ae. aegypti* modula a expressão de genes essenciais para a transmissão do vírus, tais como transcritos relacionados à imunidade, alimentação de sangue e

procura de hospedeiro (Shuzhen et al., 2012). A infecção pelo ZIKV em *Ae. aegypti* provoca alterações transcricionais setes dias após a infecção nos genes envolvidos no processo metabólico, celular e na proteólise. Dos 486 lincRNAs (RNAs não codificadores longos) alterados nos mosquitos infectados pelo ZIKV, 80 deles foram similares aos mosquitos infectados com DENV, indicando possíveis funções conservadas dos lincRNAs nas interações flavivírus-mosquito (Etebari et al., 2017).

***Aedes aegypti* e o vírus Zika (ZIKV)**

ZIKV é um vírus de RNA de cadeia simples, membro da família Flaviviridae, gênero Flavivirus, e é transmitido pelo *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus*. Possui um genoma de 10,7 kb que codifica uma única poliproteína, que é clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M, E), e sete proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Lindenbach & Rice, 2003). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1947 no macaco Rhesus na floresta Zika em Uganda (Dick et al., 1952). Desde 2007, a infecção pelo ZIKV tem sido relatada em 39 países incluindo o Brasil, onde a infecção inicialmente foi associada aos casos de microcefalia relatados em 2015 (Martínez de Salazar et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016). Além da microcefalia, o vírus pode causar a síndrome de Guillain-Barré (Araújo et al., 2016). A recente epidemia do vírus destaca a necessidade do desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz. Candidatos à vacina já foram desenvolvidos e mostraram resultados promissores em ambos os modelos animais e ensaios clínicos de fase I. No entanto, importantes desafios permanecem para o desenvolvimento clínico dessas vacinas (Abbink et al., 2018).

Com relação à interação vírus-vetor, diferentes estudos tem avaliado os efeitos da infecção pelo ZIKV no *fitness* e fecundidade (Silveira et al., 2018), locomoção (Padilha et al., 2018) comportamento (Gaburro et al., 2018), transmissão vertical (Ciota et al., 2017; Phumee et al., 2019) e competência vetorial (Sánchez-Casiano et al., 2020). Contudo, ainda não se sabe detalhadamente como ocorre o processo da infecção do ZIKV no inseto vetor, por isso, o ciclo de vida do DENV, da mesma família do ZIKV, Flaviridae, é utilizado como uma referência para o ciclo do ZIKV.

Após ingestão de sangue infectado com DENV, as partículas virais precisam se ligar a receptores específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, se replicar nas células epiteliais intestinais para poderem então, deixar o intestino. Após se replicar no intestino, o vírus passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso. Por fim, é necessário infectar a glândula

salivar para que o mosquito possa transmitir o vírus (Hardy et al., 1980; Woodring et al., 1996; Black IV et al., 2002). Quanto à replicação no hospedeiro vertebrado, uma revisão recente trás os aspectos relacionados às etapas do processo, bem como a localização subcelular do ZIKV no retículo endoplasmático rugoso, além de discutir a interação do ZIKV com proteínas da organela (Ropidi et al., 2020).

O tempo entre a infecção inicial do intestino e a transmissão do vírus, é chamado período de incubação extrínseca (PIE), que varia de 7 a 14 dias (Woodring et al., 1996). O PIE é influenciado por fatores ambientais como a temperatura e a umidade além de sofrer influência de fatores intrínsecos do vetor como a competência vetorial e o genótipo viral (Black IV et al., 2002). O tempo estimado para o ZIKV atingir a glândula salivar é de até 14 dias após o repasto sanguíneo. Fatores como altas densidades de mosquitos e humanos podem contribuir para a rápida propagação do vírus durante um surto (Chouin-Carneiro et al., 2016).

Após o PIE, o vetor infectado pode transmitir o vírus para novos hospedeiros durante tentativas de alimentação ou para sua progênie durante a oviposição, o que já foi confirmado essa transmissão vertical de ZIKV em *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Woodring et al., 1996; Ciota et al., 2017). Tendo em vista a importância epidemiológica do mosquito, se faz necessário um melhor entendimento dos papéis das barreiras no processo de infecção, e isso inclui o papel específico das glândulas salivares na transmissão ZIKV e a passagem do mesmo pelo órgão.

1. JUSTIFICATIVA

Os registros da transmissão do ZIKV no Brasil por mosquitos vetores são recentes, sendo os primeiros registros datados de 2014 (Costa et al., 2017) Portanto, há muitas lacunas a serem preenchidas quanto ao ciclo e à patogenicidade viral. Atualmente, várias pesquisas tem sido direcionadas para o estudo dos efeitos do ZIKV no vertebrado, mas até o momento pouco se sabe sobre o ciclo evolutivo do vírus no interior das fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e quais efeitos que o processo de infecção pode ocasionar em seus órgãos internos. Sabe-se que infecção por arbovírus interfere na expressão gênica, respostas do sistema imunológico e no ciclo de vida do vetor. Tendo em vista que durante a infecção no mosquito, o vírus atravessa diferentes barreiras até ser transmitido para o vertebrado, a glândula salivar desempenha um papel chave nesse processo, uma vez que possui os fatores que promovem a entrada e manutenção dos vírus no epitélio glandular. Nesse sentido, estudos que direcionem a caracterização do processo de infecção desse órgão, bem como os efeitos fisiológicos no mosquito, são úteis para a compreensão das dinâmicas da interação parasito-hospedeiro.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar o processo de invasão da glândula salivar do mosquito por ZIKV.

2.1.1. Objetivos específicos

- Verificar por meio da reação de TUNEL a ocorrência de danos nucleares na glândula salivar infectada com ZIKV
- Investigar a expressão de proteínas *in situ* por métodos imunocitoquímicos na glândula de fêmeas após a infecção por ZIKV em condições de laboratório.

3. REFERÊNCIAS

- Araújo, L. M., Ferreira, M. L. B., & Nascimento, O. J. (2016). Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 74(3), 253-255.
- Abbink, P., Stephenson, K. E., & Barouch, D. H. (2018). Zika virus vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 594-600.
- Barreau C. J., Conrad E., Fischer H. D., Lujan & Vernick K. D (1999). Identification of surface molecules on salivary glands of the mosquito, *Aedes aegypti*, by a panel of monoclonal antibodies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29:515–526.
- Beckett, E. B. (1990). Development and ageing of the salivary glands of adult female *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes togoi* (Theobald) mosquitoes (Diptera: Culicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 19(5-6), 277-290.
- Beerntsen, B. T., James, A. A., & Christensen, B. M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 115-137.
- Black IV, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M., & Beaty, B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, 33(4), 379-388.
- Bowers, D. F., Abell, B. A., & Brown, D. T. (1995). Replication and tissue tropism of the alphavirus Sindbis in the mosquito *Aedes albopictus*. *Virology*, 212(1), 1-12.
- Chagas, A. C., Ramirez, J. L., Jasinskiene, N., James, A. A., Ribeiro, J. M., Marinotti, O., & Calvo, E. (2014). Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), 6946-6951.
- Chapman, R. F., & Chapman, R. F. (5Ed). (2013). *The insects: structure and function*. Cambridge University Press.
- Christophers SR (1960). *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge University Press, New York, 739 pp.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., & Failloux, A. B. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 10(3).

- Ciano, K. A., Saredy, J. J., & Bowers, D. F. (2014). Heparan sulfate proteoglycan: an arbovirus attachment factor integral to mosquito salivary gland ducts. *Viruses*, 6(12), 5182-5197.
- Ciota, A. T., Bialosuknia, S. M., Ehrbar, D. J., & Kramer, L. D. (2017). Vertical transmission of Zika virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 880.
- Conway, M. J., Londono-Renteria, B., Troupin, A., Watson, A. M., Klimstra, W. B., Fikrig, E., & Colpitts, T. M. (2016). *Aedes aegypti* D7 saliva protein inhibits dengue virus infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 10(9).
- Costa, J. M. B. D. S., Reis, Y. A. C. D., Cazarin, G., Bezerra, L. C. D. A., & Silva, I. M. D. S. (2017). Paineel estadual de monitoramento da infecção pelo vírus Zika e suas complicações: caracterização e uso pela Vigilância em Saúde. *Saúde em Debate*, 41, 316-328.
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509-520.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., & Kafatos, F. C. (1998). Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *The EMBO Journal*, 17(21), 6115-6123.
- Dhawan, R., Kumar, M., Mohanty, A. K., Dey, G., Advani, J., Prasad, T. K., & Kumar, A. (2017). Mosquito-borne diseases and omics: salivary gland proteome of the female *Aedes aegypti* mosquito. *Omics: a Journal of Integrative Biology*, 21(1), 45-54.
- Etebari, K., Hegde, S., Saldana, M. A., Widen, S. G., Wood, T. G., Asgari, S., & Hughes, G. L. (2017). Global transcriptome analysis of *Aedes aegypti* mosquitoes in response to Zika virus infection. *MSphere*, 2(6), e00456-17.
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia*. São Paulo: Edusp.v12.
- Forrester, N. L., Coffey, L. L., & Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, 6(10), 3991-4004.
- Gaburro, J., Bhatti, A., Harper, J., Jeanne, I., Dearnley, M., Green, D. & Duchemin, J. B. (2018). Neurotropism and behavioral changes associated with Zika infection in the vector *Aedes aegypti*. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-11.

- Göertz, G. P., van Bree, J. W., Hiralal, A., Fernhout, B. M., Steffens, C., Boeren, S., ... & Koenraadt, C. J. (2019). Subgenomic flavivirus RNA binds the mosquito DEAD/H-box helicase ME31B and determines Zika virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(38), 19136-19144.
- Hardy, J., Houk, E., Kramer, L., & Meyer, R. (1980). Public health: Mosquitoes as carriers of viral diseases. *California Agriculture*, 34(3), 8-8.
- Hastings, A. K., Uraki, R., Gaitsch, H., Dhaliwal, K., Stanley, S., Sproch, H., ... & Wang, Y. (2019). *Aedes aegypti* NeSt1 protein enhances Zika virus pathogenesis by activating neutrophils. *Journal of Virology*, 93(13), e00395-19.
- James, A. A. (1994). Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 92(2), 133-150.
- James A. A., & Rossignol, P. A. (1991). Mosquito salivary glands: parasitological and molecular aspects. *Parasitology Today*, 7(10), 267-271.
- James, A. A. (2003). Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. *Journal of Experimental Biology*, 206(21), 3817-3821.
- Janzen H. G. & Wright, K. A. (1971). The salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. *Canadian Journal of Zoology*. 49: 1343-1345.
- Juhn, J., Naeem-Ullah, U., Guedes, B. A. M., Majid, A., Coleman, J., Pimenta, P. F. P., & Marinotti, O. (2011). Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 4(1), 1.
- Kelly, E. M., Moon, D. C., & Bowers, D. F. (2012). Apoptosis in mosquito salivary glands: Sindbis virus-associated and tissue homeostasis. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 11), 2419.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59, 23-62.
- Martinez de Salazar, P., Suy, A., Sanchez-Montalva, A., Rodo, C., Salvador, F., and Molina, I. (2016). Zika fever. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 34, 247–252.
- Marquardt, W. H. (2Ed.). (2004). *Biology of disease vectors*. Elsevier.

- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., & Vizjak, A. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951-958.
- Nguyen, C., Andrews, E., Le, C., Sun, L., Annan, Z., Clemons, A., & Duman-Scheel, M. (2013). Functional genetic characterization of salivary gland development in *Aedes aegypti*. *EvoDevo*, 4(1), 9.
- Orr, C. W. M., Hudson, A., & West, A. S. (1961). The salivary glands of *Aedes aegypti* histological–histochemical studies. *Canadian Journal of Zoology*, 39(3), 265-272.
- Oliveira, M. A., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves, S. S., & Bispo, D. F. A. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 47(1), 6.
- Padilha, K. P., Resck, M. E. B., Cunha, O. A. T. D., Teles-de-Freitas, R., Campos, S. S., Sorgine, M. H. F., & Bruno, R. V. (2018). Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(10).
- Phumee, A., Chompoosri, J., Intayot, P., Boonserm, R., Boonyasuppayakorn, S., Buathong, R., & Siriyasatien, P. (2019). Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Pimenta, P. F., Touray, M., & Miller, L. (1994). The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(6), 608-624.
- Raquin, V., & Lambrechts, L. (2017). Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology*, 507, 75-81.
- Ribeiro J. M., Arcà B., Lombardo F., Calvo E., Phan V. M., Chandra P. K., & Wikel S. K. (2007). An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 8(1), 1.
- Ribeiro J. & Arcà B. (2009). From Sialomes to the Sialoverse: An insight into salivary potion of blood-feeding insects. In: *Advances in Insect Physiology*. London: Academic Press. pp 59–118.

- Robison, A., Young, M. C., Byas, A. D., Rückert, C., & Ebel, G. D. (2020). Comparison of Chikungunya Virus and Zika Virus Replication and Transmission Dynamics in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, tpmd200143.
- Ropidi, M. I. M., Khazali, A. S., Rashid, N. N., & Yusof, R. (2020). Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 27.
- Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7(1), 9.
- Sanchez-Vargas, I., Harrington, L. C., Black, W. C., & Olson, K. E. (2019). Analysis of salivary glands and saliva from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* infected with chikungunya viruses. *Insects*, 10(2), 39.
- Sánchez-Casiano, N., Cime-Castillo, J., Ovilla-Muñoz, M., Ramírez-Arroyo, J., González-Acosta, C., Moreno-García, M., & Pando-Robles, V. (2020). Experimental infection and vector competence of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes from Acapulco, Guerrero, México. *Salud Pública de México*, 62(2), 203-210.
- Schneider B. S., Higgs S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* .102: 400–408.
- Schmid, M. A., Kauffman, E., Payne, A., Harris, E., & Kramer, L. D. (2017). Preparation of mosquito salivary gland extract and intradermal inoculation of mice. *Bio-Protocol*, 7(14).
- Shuzhen S.I.M., Ramirez J. L.; Dimopoulos, G. (2012). Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLOS Pathogens*, v. 8, n. 3, p. e1002631.
- Silveira, I. D., Petersen, M. T., Sylvestre, G., Garcia, G. A., David, M. R., Pavan, M. G., & Maciel-de-Freitas, R. (2018). Zika virus infection produces a reduction on *Aedes aegypti* lifespan but no effects on mosquito fecundity and oviposition success. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3011.
- Sri-In, C., Weng, S. C., Chen, W. Y., Wu-Hsieh, B. A., Tu, W. C., & Shiao, S. H. (2019). A salivary protein of *Aedes aegypti* promotes dengue-2 virus replication and transmission. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 103181.

Stark, K. R., & James, A. A. (1996). Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 33(4), 645-650.

Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Liu, Y., Wu, P., Liu, Z., & Wang, P. (2020). A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nature Communications*, 11(1), 1-15.

Tchankouo-Nguetcheu, S., Bourguet, E., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., & Choumet, V. (2012). Infection by chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Parasites & Vectors*, 5(1), 264.

Woodring J. L., Higgs S., Beaty B. J. (1996). Biology of Disease Vectors. In: Marquardt WC, Beaty BJ, eds. Natural cycles of vector-borne pathogens. Colorado: University Press of Colorado. 51 -72.

ARTIGO - Efeitos da infecção da glândula salivar de fêmeas de *Aedes aegypti* pelo Zika vírus

RESUMO

Desde o surto de Zika e as demais consequências causadas pela infecção do vírus o *Aedes aegypti* tem sido objeto de inúmeros estudos avaliando a interação e os efeitos provocados pelo vírus na fisiologia do mosquito. No entanto, os papéis das barreiras no inseto vetor durante processo de infecção foram pouco explorados, e isso inclui o papel específico das glândulas salivares na transmissão ZIKV e a passagem do mesmo pelo órgão. Sendo assim, no presente trabalho demonstramos a partir de técnicas de microscopia confocal a distribuição do vírus no epitélio glandular de fêmeas de *Ae. aegypti* após um e sete dias de infecção, e avaliamos os efeitos provocados a partir da reação de TUNEL. Houve aumento no número de cópias virais após 7 dias de infecção. Nossos resultados não foram conclusivos quanto à localização preferencial do ZIKV, mas evidenciaram que no epitélio glandular, as proteínas virais concentram-se principalmente na região ao redor do núcleo, que corresponde ao complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Apesar do amplo conhecimento adquirido até agora sobre os componentes da glândula salivar do mosquito e suas funções. A combinação da detecção molecular de ZIKV e observações ultra estruturais são necessárias para alcançar um entendimento mais aprofundado das interações íntimas entre o ZIKV e *Ae aegypti*.

Palavras chave: *Aedes aegypti*, glândula salivar, Zika Virus

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti*, transmissor do vírus da dengue (Flaviviridae) e chikungunya (Togaviridae), também está associado à disseminação do vírus Zika (ZIKV). Desde 2007, a infecção pelo ZIKV tem sido relatada em 39 países em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde a infecção foi ligada a casos de microcefalia durante um surto em 2015 (Morrison, 2014; Enserink, 2015; de Salazar et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Oliveira; Melo et al., 2016). Na ausência de uma vacina, as opções efetivas de controle das doenças estão limitadas a diferentes estratégias de combate ao mosquito (Heintze et al., 2007).

O ZIKV, pertencente à família Flaviviridae, é um vírus de ácido ribonucleico de cadeia simples (RNA) de sentido positivo com um tamanho de genoma de aproximadamente 10,8 kilobases. O RNA é traduzido em uma única poliproteína que codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (Sirohi & Kuhn, 2017). A fêmea de *Ae. aegypti*, uma vez infectada após o repasto sanguíneo, apresenta várias barreiras que impedem a propagação de ZIKV no mosquito, causando gargalos na população viral (Black et al., 2002). A infecção das glândulas salivares e a liberação de virions na saliva é o último passo antes da transmissão do vírus. Apesar do papel crítico da glândula salivar na transmissão do ZIKV, os aspectos das interações ZIKV-mosquito ainda são pouco documentadas.

As glândulas salivares dos mosquitos adultos são sexualmente dimórficas (James, 1994; Stark & James 1996). Nas fêmeas elas tem uma estrutura trilobular que consiste em um único lobo mediano e dois laterais. Cada lóbulo é formado por um epitélio secretório em torno de um duto salivar, a saliva é produzida pelas células secretoras das regiões proximal e distal dos lóbulos laterais e pela região distal do lobo mediano (Juhn et al., 2011). Tendo em vista os papéis desempenhados por esse órgão tanto fisiologia do mosquito, quanto com relação à transmissão de patógenos, diferentes estudos têm detalhado dos aspectos morfológicos (Orr et al., 1961; Janzen & Wright, 1971; Barrow et al., 1975), bioquímicos (Poehling, 1979; Racioppi & Spielman, 1987; Argentine & James, 1995), propriedades salivares (Schneider & Higgs, 2008; Sanchez-vargas et al., 2019; Modahl et al., 2019; Sri-in et al., 2019;), além de transcriptomas e proteomas das glândulas salivares (Ribeiro et al., 2007; Almeras et al., 2010).

Recentemente foi descrito que o ZIKV se replica na glândula salivar de *Culex quinquefasciatus*, e que uma proteína LTRIN, obtida das glândulas salivares de *Ae. aegypti* facilita a transmissão ZIKV e exacerba a sua patogenicidade (Guedes et al., 2017; Jin et al., 2018). Apesar do amplo conhecimento adquirido até agora sobre os componentes da glândula salivar do mosquito e suas funções, pouco se sabe sobre as suas interações com o ZIKV. Aqui

demonstramos a partir de técnicas de microscopia confocal a distribuição do vírus no epitélio glandular de fêmeas de *Ae. aegypti* um dia e sete dias após a ingestão de sangue infectado, e avaliamos os efeitos provocados a partir da reação de TUNEL.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Insetos.

Os mosquitos foram mantidos em uma instalação de insetos BSL-2 no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Seguindo as seguintes condições: temperatura à 27 ± 1 ° C, fotoperíodo controlado de 12 h e alimentadas com solução de sacarose 10%.

2.2 Vírus

O Instituto Evandro Chagas, em Belém, Pará - Brasil isolou o vírus Zika de um caso clínico brasileiro e gentilmente cedeu à USP-São Paulo. O ZIKVBR foi amplificado e titulado como já descrito anteriormente em Cugola et al., 2016.

2.2 Infecção dos mosquitos

As alíquotas de sobrenadante infectadas com ZIKVBR congeladas em -80 ° C (5,0 x 10⁶ pfu / mL) foram descongeladas e imediatamente injetadas intratoracicamente em mosquitos fêmeas de 4 ± 8 dias de idade da linhagem de olhos brancos Higgs usando o injetor Nanoject II (Drummond Scientific Company, gato. 3-000-204). Aproximadamente 330 mosquitos foram inoculados em um tórax feminino com 69 nL de ZIKVBR. Após um e sete dias após a injeção, a glândula salivar foi coletada individualmente para experimentos de microscopia. Foram dissecados 100 mosquitos para cada tempo. O RNA viral foi extraído de todas as carcaças dos mosquitos e a positividade do vírus foi verificada por qRT-PCR, conforme descrito na próxima seção. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.3 Extração de RNA viral de carcaças de mosquito e análise qRT-PCR em uma etapa

A extração de RNA viral das carcaças de mosquitos foi realizada com o kit QIAmp Viral RNA Mini (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e mantido em -80 ° C até análises de qRT-PCR. Os números de cópias virais do ZIKV foram feitos usando o kit de 1 etapa do Power SYBR1 Green RNA-to-CT™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme descrito pelo fabricante. Cada amostra foi analisada em duplicados técnicos em reações de volume final de 20 µL contendo 5 µL de RNA total e 0,5 µM para cada iniciador ZIKV 835 e ZIKV 911c. Os ensaios foram realizados no termociclador Mastercycler Realplex

2 (Eppendorf) com as seguintes condições: 48 ° C por 30 minutos e 95 ° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 ° C por 30 s, 60 ° C por 30 s e um passo da curva de fusão de 95 ° C por 1 min, 60 ° C por 30 s e 95 ° C por 1 min, com uma temperatura que varia de 60 ° C a 95 ° C a 0,02 ° C / s. A especificidade de amplicons foi avaliada pelo pico de fusão do ZIKV (78 ± 1 ° C) e uma curva padrão foi gerada (Costa-da-Silva et al., 2017).

2.4 Microscopia de fluorescência/confocal

2.4.1 Imunocitoquímica

Foram retiradas 10 cabeças na presença de solução fisiológica para insetos (NaCl 0,1 M, KH₂PO₄ 20 mM, Na₂HPO₄ 20 mM). Foram utilizadas aquelas contendo as glândulas salivares aderidas, fixadas em paraformaldeído a 4% durante 3 h e mantidas a 4°C em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS), pH 7,4. Para a análise de microscopia de fluorescência, glândulas dos grupos controle e experimental foram lavadas 3 vezes durante 30 minutos com 1% de PBST (solução salina tamponada com fosfato com Tween a 1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Após lavagem, as glândulas foram incubadas durante 24 h a 4 ° C com os seguintes anticorpos primários individualmente e diluídos em PBS: Zika virus NS4B protein antibody (1:10) (Gene Tex). Após incubação, as amostras foram lavadas em 3 vezes em PBS e depois incubadas durante 24 horas a 4°C com uma solução (1:500) de anticorpo secundário anti-coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) diluído em PBS. A seguir, as glândulas foram lavadas 3 vezes, observadas e fotografadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa (NMM-UFV). Como controle negativo, foram utilizadas amostras tratadas de forma idêntica, porém, sem os anticorpos primários

2.4.2 Reação de TUNEL

Para a reação de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), 20 glândulas foram dissecadas e fixadas em solução de paraformaldeído 4% (pH 7,4) durante 25 minutos no gelo e lavadas duas vezes em PBS 1x durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para a detecção de danos no DNA nuclear, foi utilizada a glândula inteira, montagem total, submetidas à reação de TUNEL utilizando-se o kit de fluoresceína - *In Situ Cell Death* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha). Para o controle negativo, foram usadas amostras não tratadas pela reação. As glândulas foram analisadas e fotografadas

utilizando o Microscópio de Fluorescência Zeiss, Axiostar plus, com câmera CCD AxioCam MRm e filtros para Rhod/DAPI/FITC do NMM.

2.1.1 Análise estatística dos dados

As análises foram realizadas no pacote de software GraphPad Prism5 (Versão 5.00) para Windows (San Diego, Califórnia, EUA) e intervalos de confiança de 95% foram definidos para todas as análises. Níveis virais entre fêmeas após um e sete dias de infecção foram comparadas usando teste T Student ($P < 0,005$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos a distribuição do ZIKV por meio da marcação para a proteína não estrutural NS4B no epitélio glandular de fêmeas de *Ae. aegypti*. Esse método de marcação corresponde ao que tem sido utilizado na literatura para a identificação do vírus (Xie et al., 2016; Liang et al., 2016). Grande parte do epitélio foi positivo para a proteína viral sete dias após a infecção (Fig. 2 A-B; C-D). Contudo, nossos resultados não foram conclusivos quanto à localização preferencial do ZIKV, mas evidenciaram que no epitélio glandular, as proteínas virais concentram-se principalmente na região ao redor do núcleo, que corresponde ao complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Após a replicação, que ocorre no retículo endoplasmático, o vírus é depositado nas cavidades secretoras das células glandulares, o que pode permitir a inoculação no hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Chambers et al., 1990; Forrester et al., 2014; Cortese et al., 2017; Ropidi et al., 2020). Sabe-se que a infecção da glândula salivar por arbovírus como DENV, inicia-se nos lóbulos laterais distais (Janzen et al., 1971). No entanto com relação ao ZIKV, os aspectos referentes à via preferencial de infecção, bem como a caracterização dos receptores na glândula salivar do vetor, que auxiliam na entrada do vírus no órgão, ainda não foram elucidados.

A presença do vírus detectada no microscópio confocal foi confirmada por RT-qPCR, no qual foi possível quantificar o aumento no número de cópias virais sete dias após a infecção (Fig.1). Apesar de não analisarmos especificamente a dinâmica da infecção por meio do repasto sanguíneo, otimizamos e garantimos a infecção por meio da nanoinjeção, tendo em vista que durante infecção o vírus passa por diferentes gargalos e barreiras até chegar à glândula salivar (Forrester et al., 2014).

Núcleos positivos para a reação de TUNEL foram observados nas glândulas após um e sete dias de infecção (Fig. 3 A-D; G-H). Logo, evidencia-se que a infecção pelo vírus provoca danos nucleares, como a fragmentação do DNA genômico. O que pode comprometer a integridade e funcionalidade do órgão. A reação de TUNEL baseia-se na incorporação de

nucleotídeos (d-UTP = 2' desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com um corante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína-FITC) na região 3' OH das quebras do DNA (revisado em Martins et al., 2007). O elevado número de núcleos positivos pode ser decorrente da via artificial de infecção, a qual facilitou o acesso viral à glândula salivar, uma vez que foram injetados diretamente na hemocele. O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio é uma característica comum da infecção por vírus de RNA, e é uma fonte de dano ao DNA (Cooke et al., 2003; Reshi et al., 2014).

Foi demonstrado que o mosquito *Culex quinquefasciatus* é suscetível à infecção pelo ZIKV. O vírus possui um ciclo de replicação nas glândulas salivares e é liberado na saliva. Nas células da glândula salivar, a replicação do ZIKV danifica o epitélio glandular sete após dias de infecção. A infecção provoca danos mitocondriais, como perda completa das cristas e a distensão das cisternas do retículo endoplasmático (Guedes et al., 2017). Embora os arbovírus utilizem processos e fatores celulares do hospedeiro para promover sua própria replicação, vias celulares fundamentais, tais como apoptose e autofagia, em alguns casos também desempenham funções antivirais (Girard et al., 2007; Sim et al., 2014;). Apesar da replicação e dos danos celulares causados pelos vírus, o mosquito ainda é capaz de se alimentar, garantindo assim o processo transmissão (Alonso-Palomares et al., 2018). A por DENV-2 a aumento a frequência e quantidade de ingestão de sangue por *Ae. aegypti* (Putnam & Scott, 1995; Sim et al., 2012).

O dano causado pelo ZIKV na glândula salivar de *Ae. aegypti*, pode ser uma resposta aos distúrbios causados pela replicação viral. O padrão de infecção irá depender da associação específica de vetor/arbovírus. Análises genéticas e moleculares são necessárias para uma avaliação completa dos efeitos causados pela infecção da glândula salivar de *Ae. aegypti* por ZIKV. O balanço entre a taxa de replicação do vírus, a atuação do sistema imune do inseto, e os fatores moleculares da glândula salivar com atividade anti-viral, podem agir atenuando a taxa de infecção e os danos provocados pelo vírus.

Apesar de aspectos da fisiologia da invasão da glândula salivar de mosquitos por arbovírus serem sabidos, a elucidação da cinética de replicação e tropismo de Zika vírus pelas glândulas salivares de *Ae. aegypti* ainda não foi esclarecido. Estudos que caracterizem esse processo, proporcionarão uma melhor compreensão do potencial de transmissão e das interações vetor-vírus. A combinação da detecção molecular de ZIKV e observações ultra estruturais são necessários para alcançar um entendimento mais aprofundado das interações íntimas entre o ZIKV e o inseto vetor.

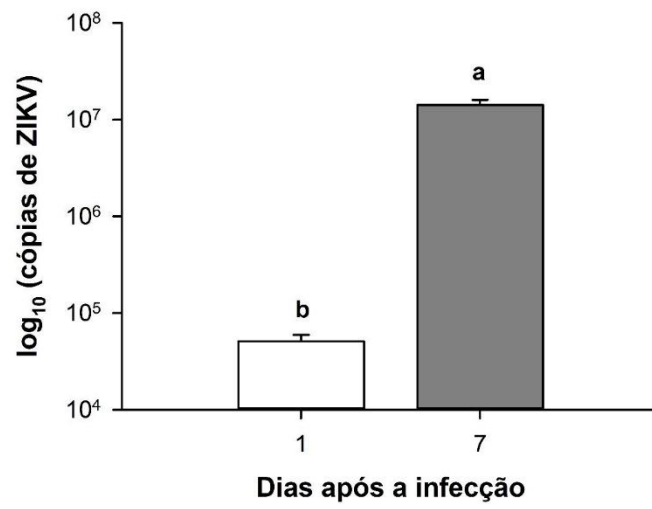


Figura 1: Grau de infecção de fêmeas de *Aedes aegypti* após um e sete dias de infecção.

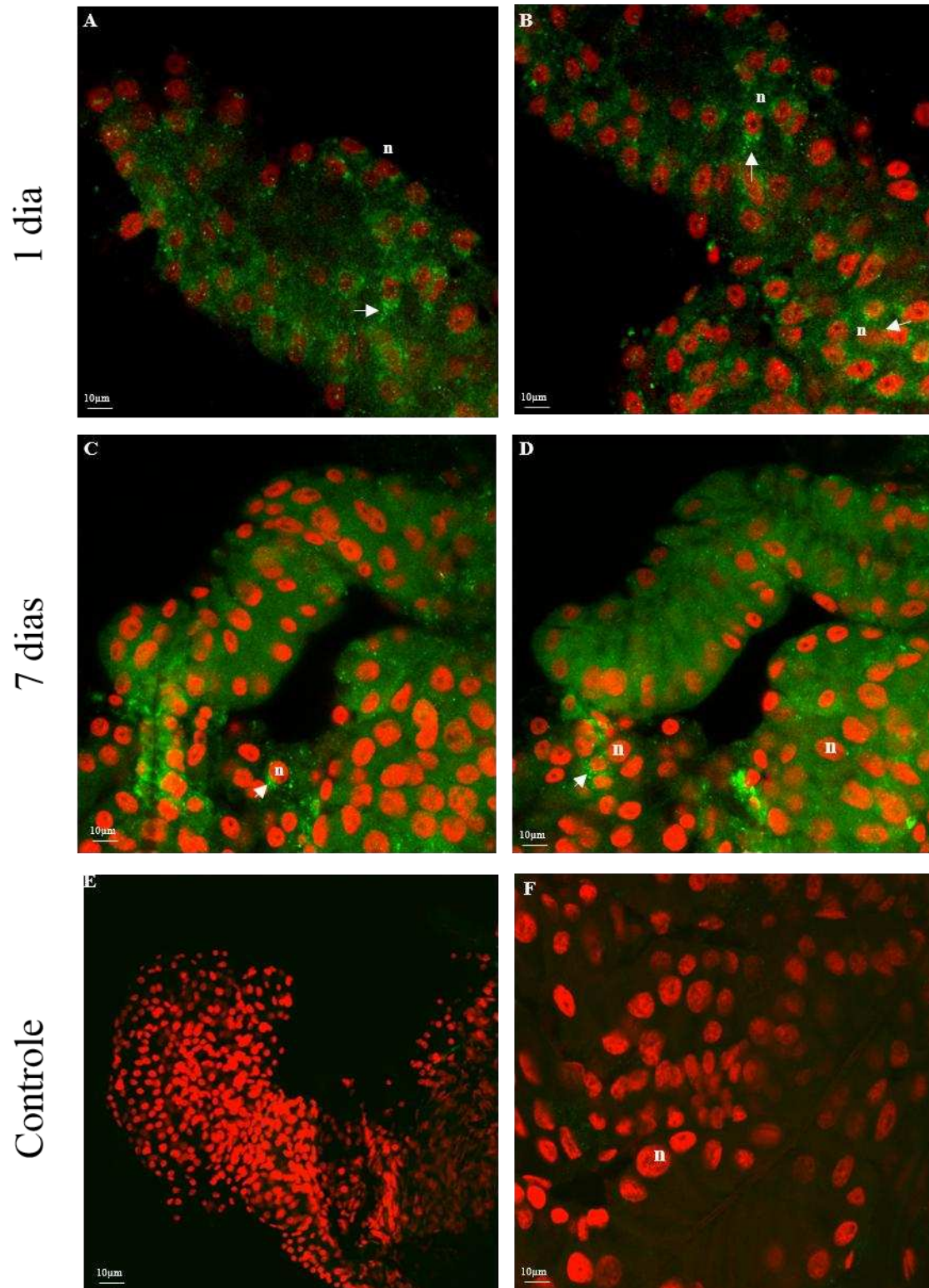


Figura 2: Glândula salivar de fêmeas de *Aedes aegypti* após um (A-B) e sete dias (C-D) de infecção com ZKV. E-F: controle. Núcleo (n) em vermelho marcado com tropo3. A seta indica o a marcação positiva para o ZKV (proteína NS4B) em verde.

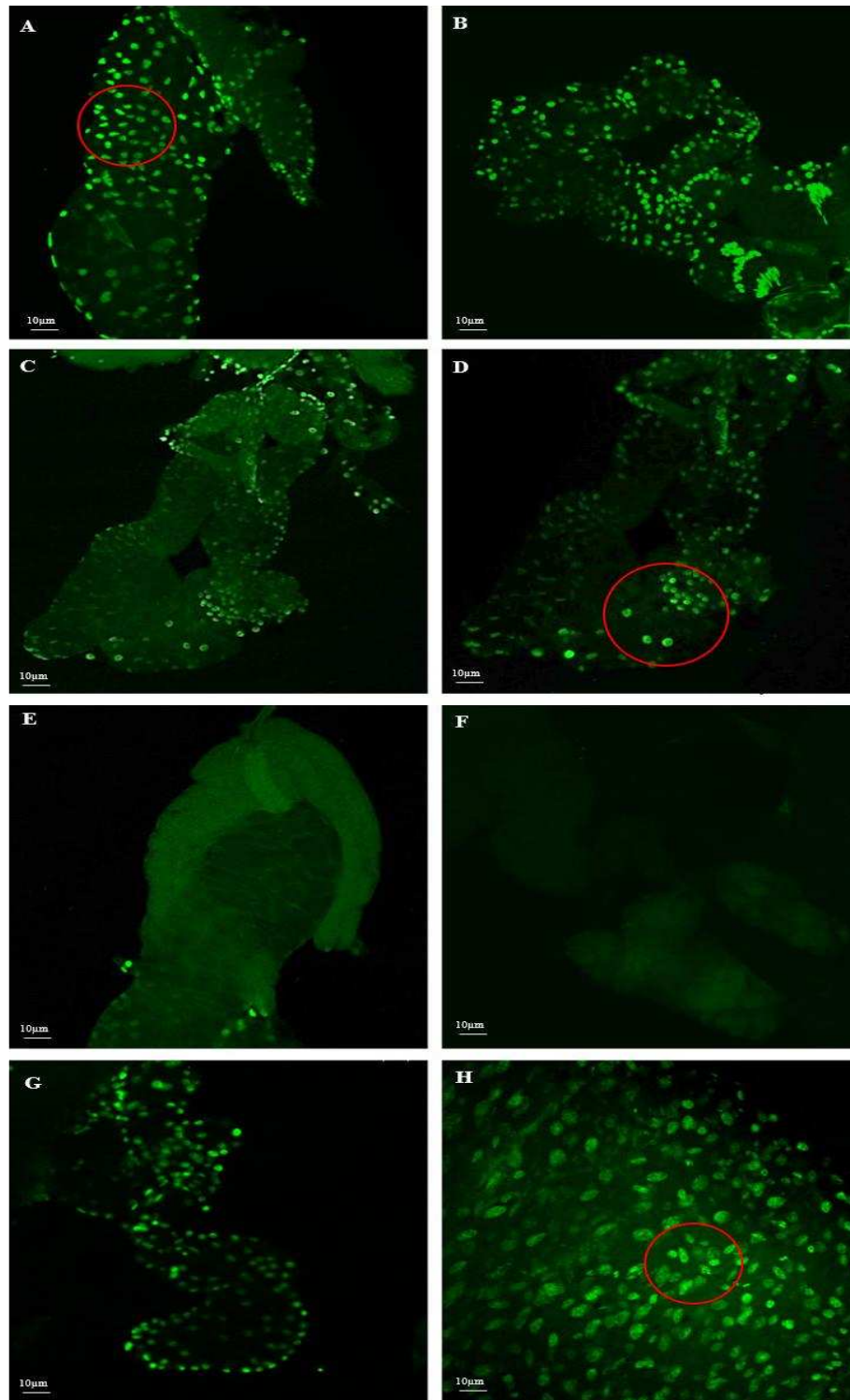


Figura 3: Glândula salivar de fêmeas de *Aedes aegypti* um (A-B) e sete (C-D) dias após infecção com ZKV submetidas à reação de TUNEL. E: controle. F: controle negativo da técnica. G-H: controle positivo da técnica. Núcleo em verde indica a marcação positiva para o a reação de TUNEL.

4. REFERÊNCIAS

- Almeras, L., Fontaine, A., Belghazi, M., Bourdon, S., Boucomont-Chapeaublanc, E., Orlandi-Pradines, E. & Fusai, T. (2010). Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(4), 391-402.
- Argentine, J. A., & James, A. A. (1995). Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(5), 621-630.
- Barrow, P. M., McIver, S. B., & Wright, K. A. (1975). Salivary glands of female *Culex pipiens*: morphological changes associated with maturation and blood-feeding. *The Canadian Entomologist*, 107(11), 1153-1160.
- Black IV, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M., ... & Beaty, B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, 33(4), 379-388.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*, 44(1), 649-688.
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., & Schorb, M. (2017). Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories. *Cell Reports*, 18(9), 2113-2123.
- Costa-da-Silva, A. L., Ioshino, R. S., de Araujo, H. R. C., Kojin, B. B., de Andrade Zanotto, P. M., Oliveira, D. B. L., & Capurro, M. L. (2017). Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. *PLOS One*, 12(2).
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L., Guimarães, K. P., & Polonio, C. M. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267-271.
- de Salazar, P. M., Suy, A., Sanchez-Montalva, A., Rodo, C., Salvador, F., & Molina, I. (2016). Zika fever. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(4), 247-252.
- Enserink, M. (2015). Infectious diseases. An obscure mosquito-borne disease goes global. *Science* 350, 1012–1013.

- Forrester, N. L., Coffey, L. L., & Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, 6(10), 3991-4004.
- Girard, Y. A., Schneider, B. S., McGee, C. E., Wen, J., Han, V. C., Popov, V., & Higgs, S. (2007). Salivary gland morphology and virus transmission during long-term cytopathologic West Nile virus infection in *Culex* mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(1), 118-128.
- Guedes, D. R., Paiva, M. H., Donato, M. M., Barbosa, P. P., Krokovsky, L., Rocha, S. W. D. S., & Barbosa, R. M. (2017). Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1-11.
- Heintze, C., Garrido, M. V., & Kroeger, A. (2007). What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 317-325.
- James, A. A. (1994). Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 92(2), 133-150.
- Janzen H. G. & Wright, K. A. (1971). The salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. *Canadian Journal of Zoology*, 49: 1343-1345.
- Jin, L., Guo, X., Shen, C., Hao, X., Sun, P., Li, P., & Yang, M. (2018). Salivary factor LTRIN from *Aedes aegypti* facilitates the transmission of Zika virus by interfering with the lymphotoxin- β receptor. *Nature Immunology*, 19(4), 342-353.
- Juhn, J., Naeem-Ullah, U., Guedes, B. A. M., Majid, A., Coleman, J., Pimenta, P. F. P., & Marinotti, O. (2011). Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 4(1), 1.
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S. S., Lee, S. A., & Zhao, Z. (2016). Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*, 19(5), 663-671.
- Martins, C. F., Dode, M. N., B  o, S. N., & Rumpf, R. (2007). Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatoz  ides bovinos. *Embrapa Cerrados*.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popovi  , M., Polj  ak-Prijatelj, M., Mraz, J., & Vizjak, A. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951-958.

- Modahl, C., Chowdhury, A., Oliveira, F., Kini, R. M., & Pompon, J. (2019). Salivary gland RNA-seq from arbovirus-infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* provides insights into virus transmission. *Access Microbiology*, 1(10), 70.
- Morrison, T. E. (2014). Reemergence of chikungunya virus. *Journal of Virology*, 88(20), 11644-11647.
- Oliveira, M. A., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves, S. S., & Bispo, D. F. A. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in obstetrics & gynecology: the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 47(1), 6.
- Orr, C. W. M., Hudson, A., & West, A. S. (1961). The salivary glands of *Aedes aegypti* histological–histochemical studies. *Canadian Journal of Zoology*, 39(3), 265-272.
- Poehling, H. M. (1979). Distribution of specific proteins in the salivary gland lobes of Culicidae and their relation to age and blood sucking. *Journal of Insect Physiology*, 25(1), 3-8.
- Putnam, J. L., & Scott, T. W. (1995). Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(3), 225-227.
- Racioppi, J. V., & Spielman, A. (1987). Secretory proteins from the salivary glands of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry*, 17(3), 503-511.
- Reshi, M. L., Su, Y. C., & Hong, J. R. (2014). RNA viruses: ROS-mediated cell death. *International Journal of Cell Biology*, 467452.
- Ribeiro J. M., Arcà B., Lombardo F., Calvo E., Phan V. M., Chandra P. K., & Wikel S. K. (2007). An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 8(1), 1.
- Ropidi, M. I. M., Khazali, A. S., Rashid, N. N., & Yusof, R. (2020). Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 27.
- Sanchez-Vargas, I., Harrington, L. C., Black, W. C., & Olson, K. E. (2019). Analysis of salivary glands and saliva from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* infected with chikungunya viruses. *Insects*, 10(2), 39.
- Sim, S., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4479-4504.

- Sim, S., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2012). Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLOS Pathogens*, 8(3).
- Schneider, B. S., & Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(5), 400-408.
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10), S935-S944.
- Sri-In, C., Weng, S. C., Chen, W. Y., Wu-Hsieh, B. A., Tu, W. C., & Shiao, S. H. (2019). A salivary protein of *Aedes aegypti* promotes dengue-2 virus replication and transmission. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 103181.
- Stark, K. R., & James, A. A. (1996). Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 33(4), 645-650.
- Xie, X., Zou, J., Shan, C., Yang, Y., Kum, D. B., Dallmeier, K., & Shi, P. Y. (2016). Zika virus replicons for drug discovery. *EBioMedicine*, 12, 156-160.

CONCLUSÕES

- A deltametrina causa efeitos subletais em *Ae. aegypti*, que comprometem a sobrevivência, tempo de desenvolvimento;
- As L4 susceptíveis e resistentes diferem quanto à sobrevivência, desenvolvimento, estresse oxidativo e imunomarcações, quando submetidas a doses subletais da deltametrina em diferentes tempos de exposição (24h e 48h);
- A exposição à deltametrina induziu estresse oxidativo no intestino médio e cabeça de larvas susceptíveis após 24h e 48h de exposição, devido ao aumento na atividade das enzimas SOD e GST. Já na população resistente o aumento na a atividade das enzimas não foi significativa;
- A exposição das L4 susceptíveis e resistentes à deltametrina por 24h interferiu na quantidade de células JNK-positivas. Além da Jnk, a presença de células WNT-positivas nas L4 suscetíveis não expostas. Tendo em vista que L4 precede a metaformose, a células WNT-positivas poderiam estar desempenhando funções atreladas à proliferação celular;
- Na população susceptível, houve um aumento de células PH3-positivas do intestino médio após a exposição à deltametrina por 48h. Já para as L4 resistentes, o número de células PH3-positivas foi superior nas L4 do controle em relação às expostas. Essa redução poderia interferir na renovação do epitélio intestinal durante o desenvolvimento. Dessa maneira, diferente das L4 resistentes, as susceptíveis respondem ao tratamento com a renovação das células epiteliais;
- A partir da técnica de TUNEL foi possível verificar que o ZIKV promoveu danos ao DNA nuclear das células da glândula salivar de *Ae. aegypti*.