

Tópicos Avançados em Entomologia Molecular

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular

INCT – EM – 2012.



1

CAPÍTULO 15

Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos.

Mônica Ferreira Moreira¹, Juliana Figueira Mansur¹ e Janaina Figueira-Mansur².

Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1-Departamento de Bioquímica, Instituto de Química; 2- Programa de Biologia Molecular e Estrutural, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Copyright: © 2012 [Mônica Ferreira Moreira, Juliana Figueira Mansur, Janaina Figueira-Mansur] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais

2

O controle de insetos visa reduzir as populações de pragas e vetores de doenças, a níveis que não causem problemas ao meio em que vivem, ou seja, abaixo do grau de dano econômico. Para um controle mais efetivo e com baixo custo é necessário conhecer os fatores abióticos do ecossistema em que se encontra a espécie que se deseja controlar. Fatores como regime climático, temperatura, pressão, umidade, intensidade de luz e chuvas têm uma grande influência no tamanho e no comportamento da população do inseto alvo. Além dos fatores abióticos, também é importante conhecer alguns aspectos básicos sobre a biologia e ecologia do inseto alvo. Fatores bióticos, tais como ciclo de vida, relações de predatismo, características de dispersão de população, marcadores de resistência e as relações com outros seres vivos com os quais convivem, são fundamentais para que o controle seja executado com sucesso. Portanto, o controle efetivo é uma tarefa complexa, não tendo um protocolo único que possa ser aplicado para uma determinada população de inseto, em qualquer região do mundo. Por isso, deve-se dispor de várias estratégias para que a execução seja integrada, seletiva, econômica e adequada à realidade de cada região (Braga e Valle, 2007). Um procedimento racional é o controle seletivo, que deve ter como alvo uma particularidade fisiológica do inseto, de preferência não encontrada em plantas e mamíferos hospedeiros. Os componentes bioquímicos ou vias bioquímicas que são únicos em insetos são considerados bons alvos para isso.

Estratégias para o Controle

A estratégia mais antiga para o controle de populações de insetos, e ainda a mais utilizada, é baseada no uso de inseticidas, substâncias de origem natural ou sintética utilizadas para eliminar insetos em diferentes fases do seu ciclo de vida. Inseticidas, pesticidas ou praguicidas são quaisquer agentes químicos ou biológicos utilizados para impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga (Ritter, 1997).

O uso de enxofre, composto inorgânico para o combate a insetos, data de aproximadamente um milênio a.C. Posteriormente, outros compostos químicos como o arsênio, arsenato, o ácido bórico, antimônio, bário, chumbo, cádmio, mercúrio e tálio também foram utilizados (Casida e Quistad, 1998). Esses inseticidas agem causando perturbações digestivas e/ou ação tóxica sobre diversos órgãos, principalmente sobre o sistema nervoso dos insetos. Estes compostos também são tóxicos para maioria dos animais, inclusive o homem.

Posteriormente, foi observado que compostos de origem botânica, como o sulfato de nicotina, alcalóides da sabadilha, rotenona e piretrina, eram capazes de repelir ou matar insetos (Casida e Quistad, 1998), tornando muito comum o uso destas substâncias, principalmente nos países tropicais (Lagunes e Rodrigues, 1989). A vantagem do uso de compostos extraídos de plantas como inseticidas é que estes apresentam complexidade estrutural, potência e seletividade no controle. Por outro lado, o uso destes compostos é limitado em função de sua disponibilidade e seu alto custo de obtenção (Casida e Quistad, 1998).

Inseticidas Químicos

3

A busca por novos pesticidas ocorreu principalmente no período da Segunda Guerra Mundial. O desenvolvimento das pesquisas para controlar infestações por piolhos, tifo exantemático, malária e outras enfermidades transmitidas por insetos, bem como para o controle de espécies pragas de lavouras, levou a descoberta de novos inseticidas químicos, mais seguros para mamíferos, que podiam ser aplicados em roupas e no corpo e eram capazes de prevenir reinfestações. Neste contexto, alguns compostos como formulações de dinitroanisol (MYL), piretrinas, pirofilito e outros passaram a ser utilizados. Porém, em 1942, quando o DDT (dicloro difenil tricloroetano), um organoclorado, foi fornecido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, este passou a ser o inseticida de excelência em substituição a todos os outros compostos (Beaty e Marquardt, 1996). O DDT foi utilizado pela primeira vez para controle de populações de mosquito em 1946. No ano seguinte foi identificada resistência a este composto em duas espécies, *Aedes tritaeniorhynchus* e *Aedes sollicitans* (Brown, 1986).

Em 1955, a Organização Mundial de Saúde criou a proposta de erradicação da maioria das doenças humanas transmitidas por vetores. O DDT foi escolhido como a principal arma no controle das populações de insetos, sendo extensamente empregado no processo de erradicação da malária. Em 1976, a OMS resolveu mudar o objetivo de seu Programa de Erradicação da Malária para Programa de Controle da Malária, pois muitas espécies de mosquito vetores adquiriram resistência ao DDT (Hemingway e Ranson, 2000).

Organoclorados

Os organoclorados foram os primeiros praguicidas sintéticos e dominaram o mercado durante o período de 1940 até 1960, com amplo uso agrícola e domiciliar. São moléculas de hidrocarbonetos (aldrin, endrin, hexacloro benzeno (BHC), DDT, ensossulfan, heptacloro, lindane, toxafeno), que além de cloro algumas delas possuem oxigênio em sua estrutura. São derivados do clorobenzeno, ciclohexano ou do ciclodieno. O mecanismo de ação inseticida dos grupos do clorobenzeno, que inclui o DDT, e do hexaclorociclohexano não foi totalmente elucidado. Sabe-se que esses compostos atuam por ingestão e/ou contato, interferindo nos canais de sódio regulado por voltagem, alterando o equilíbrio sódio e potássio, impedindo a transmissão nervosa normal, provocando paralisia no inseto seguida de morte, fenômeno conhecido por “knockdown” (Holan, 1969; Coats, 1990).

No grupo dos ciclodienos, podem ser destacados o aldrin e o dieldrin. Os inseticidas deste grupo são estáveis no solo e à exposição solar, e por isso, foram extensamente empregados para controle de insetos que habitam solos ou raízes de plantas. Esse grupo age antagonizando a ação do ácido γ -aminobutírico (GABA), atua sobre os receptores gabaérgicos, bloqueia o fluxo de íons cloreto, impedindo que ocorra o estímulo inibitório, gerando assim, um estado de hiperexcitação neuronal (Lawrence Casida, 1983; Bloomquist e Soderlund, 1985; Coats, 1990).

Devido à alta persistência ambiental, à tendência a acúmulo nos organismos, ao alto grau de toxicidade para animais e ao aparecimento de resistência nos insetos, os organoclorados tiveram sua utilização reduzida ou mesmo descontinuada em muitos

países (Beaty e Marquardt, 1996). No Brasil, o uso agrícola de compostos organoclorados é proibido (Portaria n.º 329 de 2/9/85 do Ministério da Agricultura), ressalvada sua utilização por órgãos públicos responsáveis por Campanhas de Saúde, em que pese atualmente esteja em total desuso (SUCEN, 2001).

Posteriormente outras classes de inseticidas químicos, como os organofosforados, carbamatos e piretróides sintéticos, foram sintetizadas para substituição dos organoclorados no controle de insetos (Brogdon e McAllister, 1998). Todas essas classes de inseticidas químicos são tóxicos para o sistema nervoso dos insetos que é semelhante ao dos animais, incluindo o homem.

Organofosforados

Os organofosforados foram desenvolvidos a partir de 1940. Possuem uma grande variedade de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade, como o temephos, que tem seu uso permitido em água potável (Chavasse e Yap, 1997). São ésteres, amidas ou derivados tiol de ácido fosfórico (ácido tiofosfórico, ácido ditiofosfórico e outros), contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Existem três categorias de inseticidas organofosforados, baseadas em sua natureza química: alifáticos (malathion, vapona e etc.), os derivados de grupos fenil (etil e metil parathion, fenitrothion, temephos e etc.) e os heterocíclicos (clorpirifos, metil-clorpirifos). Estes compostos, após contato e/ou ingestão, agem como inibidores das enzimas acetilcolinesterases, responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina. A enzima é fosforilada pelo inseticida ficando inativa. Ocorre o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, que provoca uma hiperatividade nervosa e conseqüente colapso do sistema nervoso. Também ocorre a dessensibilização do receptor de acetilcolina que cessa o impulso nervoso levando o inseto a morte (SUCEN, 2001; Eldefrawi, 1976; Eldefrawi e cols., 1982).

Devido à sua potência, por não se acumularem em tecidos e por serem biodegradáveis esses inseticidas têm sido bastante utilizados na área da Saúde. Entretanto, esses inseticidas são quimicamente instáveis, logo apresentando persistência curta no solo necessitando serem repostos periodicamente. (Beaty e Marquardt, 1996; SUCEN, 2001).

Carbamatos

Os primeiros carbamatos foram colocados no mercado por volta de 1950 (Casida e Quistad, 1998). São praguicidas orgânicos derivados do ácido carbâmico, que possuem pequeno espectro de atividade inseticida. Três classes de carbamatos são conhecidas: carbamatos inseticidas (e nematicidas), carbamatos herbicidas e carbamatos fungicidas. Os mais conhecidos são carbaril-metomil, carbofuran, metiocarb, primicarb, indoxacarb, alanicarb e furatiocarb (SUCEN, 2001). Assim como os organofosforados, os carbamatos também são inibidores das enzimas acetilcolinesterases, embora a ligação deste inseticida à enzima seja mais instável (Beaty e Marquardt, 1996; SUCEN, 2001).

Inseticidas de Origem Botânica Naturais e Sintéticos

O ressurgimento do interesse pelos inseticidas de origem botânica se deu pela necessidade de buscar novos compostos para o controle de pragas e vetores de

doenças, que fossem mais seletivos para o inseto alvo, sem efeito sobre predadores e outros organismos úteis, incluindo o homem e que não ocasionassem alterações ambientais, tais como a contaminação de alimentos, solo e água. Outro fator determinante foi o aparecimento de resistência em diversas populações de insetos com a utilização dos inseticidas químicos convencionais: organoclorados, carbamatos e organofosforados (Vendramine Castiglione, 2000).

Atualmente, os principais tipos de inseticidas botânicos, que estão sendo utilizados, são os piretróides, que foram introduzidos no mercado em 1976. São compostos naturais obtidos a partir do piréto, extraídos do crisântemo (Elliot e cols., 1973) ou a maioria deles, análogos sintéticos, como a aletrina, resmetrina, cipermetrina, etc (Zerba, 1988). Eles agem interferindo na transmissão dos impulsos nervosos, tanto por ação sobre os canais de sódio, causando o efeito *knockdown*, como por agirem como antagonistas do GABA nos receptores gabaérgicos. Podem apresentar também o efeito repelente espantando os insetos ao invés de eliminá-los (Beatye Marquardt, 1996; SUCEN, 2001).

Os piretróides estão sendo bastante empregados nas áreas de Saúde e Agricultura, por possuírem alta potência, sendo necessárias menores quantidades do produto ativo para provocar a morte do inseto, resultando em menor contaminação durante suas aplicações. Estes compostos apresentam também fotoestabilidade, sem comprometimento de sua biodegradabilidade, e toxicidade seletiva, devido à especificidade de sítios alvos (Casida e Quistad, 1998, SUCEN, 2001). Além disso, esses inseticidas admitem a adição de outros compostos que potencializam sua ação (efeito sinérgico), barateando o custo de suas aplicações.

Neonicotinóides e Spinosinas

As propriedades desses novos defensivos neonicotinóides e spinosinas incluem seletividades aumentadas contra insetos, baixa toxicidade para outras espécies e altas eficácias, possibilitando aplicações em concentrações menores e mais espaçadas. Os neonicotinóides são uma nova classe, derivados da molécula de nicotina, que foi descoberta por volta de 1970. O primeiro composto desta classe com atividade inseticida foi a nitiazina, este composto nunca foi comercializado, mas serviu de protótipo para síntese de outros que foram lançados no mercado em torno de 1990. Os neonicotinóides de 1ª geração, como o imidaclopride e acetamiprida apresentam um grupamento cloropiridinil (CP) heterocíclico, enquanto, que os de 2ª possuem um grupo clorotiazolidil (CT) heterocíclico, como o tiamethoxam. Esses inseticidas, não degradados pela acetilcolinesterases, agem como agonistas dos receptores de acetilcolina, na membrana das células pós-sinápticas, promovendo a abertura dos canais de sódio, com conseqüente hiperatividade nervosa, seguido de colapso do sistema nervoso acarretando a morte de insetos. A vantagem desses compostos é que eles são altamente seletivos para os receptores nicotínicos de insetos quando comparados aos de mamíferos (Tomizawa e Casida, 2003). A partir de 2004, observou-se que estes produtos químicos eram altamente tóxicos para abelhas. Eles foram suspensos ou recomendados como agrotóxicos apenas para algumas monoculturas, longe de áreas próximas a apicultores (Bernal e cols., 2010).

As spinosinas foram isoladas de um actinomiceto denominado *Saccharopolyspora spinosa*. As moléculas responsáveis pela atividade inseticida foram identificadas como lactonas macrocíclicas. O espinosade foi o primeiro inseticida comercial desta nova família. O êxito deste produto levou à busca de novos derivados naturais e semissintéticos mais potentes, seja por triagem de micro-organismos produtores e ensaios com metabólitos de protótipos, seja pela aplicação de modificações estruturais em moléculas já conhecidas. O mecanismo de ação desta classe é o estímulo do receptor colinérgico, induzindo persistente ativação alostérica dos receptores nicotínicos de acetilcolina, que acarreta morte dos insetos (Perry e cols., 2011). Apesar

do pouco tempo de uso destas classes de inseticidas, a resistência a spinosinas e neonicotinóides, caracterizada como insensibilidade no alvo do inseticida, já pôde ser detectada em algumas espécies de insetos pragas (Wyss e cols., 2003; Shonoe Scott, 2003; Bielza e cols., 2007; Wang e cols., 2009).

Inseticidas Biológicos

Algumas espécies de bactérias, fungos, vírus, peixes e outros organismos têm sido utilizadas no controle de insetos. Esses inseticidas biológicos são vantajosos, visto que, geralmente, não afetam o ambiente e a saúde do homem e nem mesmo a de outras espécies, sendo específicos para o inseto alvo. A grande desvantagem é que são conhecidas poucas espécies com atividade inseticida desejada.

Dentre os vírus que atacam insetos podemos destacar a família Baculoviridae. As partículas virais desta família são oclusas em corpos protéicos poliédricos, no caso do gênero Nucleopoliedrovirus (vírus de poliedrose nuclear), e em corpos granulares, no caso do granulovírus (vírus de granulose) (Azevedo, 1998). O mecanismo de ação é pela ingestão de plantas contaminadas com corpos protéicos de inclusão (CPIs) de baculovírus. Os CPIs virais são dissolvidos no intestino. Eles liberam os virions (nucleocapsídeos + envelope), cujas membranas se fundem às microvilosidades do intestino. No Brasil, o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, tem sido feito com a utilização do *Baculovirus anticarsia*, o que permitiu o controle da praga da soja em mais de dois milhões de hectares. Em 20 anos, a adoção desse método representou uma economia estimada entre R\$ 300 e 400 milhões, correspondente a mais de 20 milhões de litros de inseticida que deixaram de ser aplicados em regiões produtoras (Praca e cols., 2006). A resistência a baculovírus, também, já tem sido observada em algumas espécies de insetos (Asser-kaiser e cols., 2007).

Os micro-organismos *Bacillus sphaericus* e *B. thuringiensis* (Bt) são bactérias entomopatogênicas bastante utilizadas no controle de insetos (Azevedo, 1998). Hoje, a cepa do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), com ampla ação inseticida, é a mais utilizada, existindo diversas formulações disponíveis no mercado (Casida e Quistad, 1998). Além destes, o *B. cereus* e outros gêneros de bactérias, como a *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus*, também apresentam alto potencial para controle (Azevedo e cols., 1998). O mecanismo de ação destes inseticidas se dá após a contaminação dos insetos por via oral. As bactérias multiplicam-se dentro do intestino do inseto, produzindo protoxinas na forma de cristais (δ -endotoxinas). Estas protoxinas ativadas pelas proteases do aparelho digestório liberam toxinas (Crys) que destroem o trato digestório com conseqüente suspensão da alimentação do inseto (Azevedo, 1998). Há dois problemas associados à utilização do Bt, o baixo efeito residual das formulações existentes no mercado, sendo, então necessárias várias aplicações do produto, e o aparecimento de cepas de insetos resistentes. O *B. sphaericus* mostra algumas vantagens em relação ao Bt. Apresenta maior efeito residual, podendo ser usado em ambiente poluído e ser reciclado. Todavia, seu espectro de ação é pequeno sobre algumas espécies (Lacey e cols., 2001)

Os fungos entomopatogênicos são micro-organismos que causam doenças em insetos, principalmente em pragas agrícolas. O ataque de fungos começa com o contato dos esporos com a cutícula do inseto, permitindo que eles germinem produzindo micélios, cujas hifas produzem os apressórios. Estas são estruturas com capacidade de penetrar na cutícula mecanicamente ou pela produção de enzimas. Quando o fungo atinge a epiderme e a hemolinfa, produz os blastóporos que crescem, desenvolvem-se, e excretam toxinas, como as dextruxinas que matam o inseto. No interior dos insetos mortos, os esporos ou conídios são liberados pela ação do vento, água ou contato com outros insetos estendendo a contaminação para outros indivíduos

(Azevedo, 1998). O primeiro fungo a ser usado no controle biológico de pragas agrícolas foi o *Metarhizium anisopliae*. Atualmente, já são conhecidas várias espécies de fungos que atacam insetos, pertencentes aos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomurea*, *Hirsutella*, *Asckersonia* e *Entomophthora* (Ferron, 1978).

Além de fungos, bactérias e vírus, outros organismos como peixes larvófagos (*Gambusia affinis* *Poecilia reticulata*) e insetos predadores, inimigos naturais, que são colocados junto aos insetos alvos, têm sido utilizados no controle de insetos. Estes procedimentos têm sido aplicados com relativa frequência, apesar das inúmeras dificuldades práticas (Beaty e Marquardt, 1996; FUNASA, 2004).

Inseticidas de Terceira Geração.

Nos últimos anos, a busca por inseticidas mais seguros, mais seletivos no seu modo de ação e com menos riscos para os organismos não alvos e para o meio ambiente tem se intensificado (Altstein e cols., 1993). A pesquisa por inseticidas alternativos ou não convencionais levou à utilização de substâncias sintéticas ou naturais capazes de interferir nos processos de crescimento, desenvolvimento, reprodução e metamorfose dos insetos. Estas drogas foram chamadas reguladoras do crescimento de insetos (IGRs, do inglês “insect growth regulators”) e são consideradas inseticidas de 3ª geração por afetarem apenas o desenvolvimento e o crescimento dos insetos, sem prejuízo de organismos vertebrados (Graf, 1993; Mulla, 1995).

Os IGRs estão divididos em dois grupos: hormonais e não hormonais. Os primeiros são análogos aos hormônios dos insetos (ecdisona ou hormônio juvenil). Interferem no sistema endócrino provocando retardo no desenvolvimento do inseto e causando sua morte. Pertencem a este grupo: metoprene, hidroprene, piriproxifen e o fenoxicarb. O hormônio juvenil é usado pelos insetos em pequenas quantidades para regular a metamorfose de larva para pupa. A adição deste hormônio inibe o processo de muda, fazendo com que o inseto permaneça no estágio de larva. Agonistas sintéticos da ecdisona têm se mostrado eficientes como agentes de controle de algumas populações de insetos, pois induzem a inibição da alimentação, muda incompleta e mortalidade larvar (Dhadialla e cols., 1998). Estes compostos se mostraram eficazes contra lepidópteros, porém não são tóxicos para dípteros, coleópteros, homópteros, ortópteros e hemípteros (Hu e cols., 2001). Esta seletividade tóxica da ecdisona sintética pode estar relacionada à suscetibilidade das células de lepidópteros a retenção de altos níveis destes compostos.

Os IGRs não hormonais atuam sobre a formação do exoesqueleto dos insetos. Pertencem a este grupo as benzilfeniluréias (fluazuron, diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron e o lufenuron), que interferem na síntese de quitina, presente na cutícula e na matriz peritrófica da maioria dos insetos, (Merzendorf e Zimoch, 2003), e em ovários e ovos de algumas espécies (Moreira e cols., 2007; Arakane e cols., 2008, Mansur e cols., 2010), que inibem o desenvolvimento do inseto.

Alguns estudos demonstraram o efeito da benzilfeniluréia, diflubenzuron, no desenvolvimento larvar de *A. aegypti*, devido à interferência da droga na síntese ou reabsorção da quitina (Fournet e cols., 1993; Martins e Silva, 2004). Já foi demonstrado que benzilfeniluréias alteram a estrutura da larva (Meola e cols., 1998; Dean e cols., 1998), sua sobrevivência (Wilson e Cryan, 1997) e o desenvolvimento do adulto (Deane cols., 1999; Wilson e Cryan, 1997). A administração de lufenuron, uma benzilfeniluréia, altera a reprodução e o desenvolvimento em *D. melanogaster*. Em

adultos, as benzilfeniluréias deprimem a ovogênese e os ovos fertilizados falham no processo de eclosão (Wilson e Cryan, 1997). A ingestão de lufenuron pelas fêmeas do mosquito *A. aegypti* promove a diminuição da oviposição, tornando os ovos desidratados, quebradiços e disformes, alterando também a viabilidade das larvas recém eclodidas (Moreira e cols., 2007). Existem diferentes benzilfeniluréias para controle dos insetos, disponíveis no mercado, todavia, o exato mecanismo de interferência destas drogas na via metabólica de síntese de quitina ainda não foi elucidado (Cohen, 2001). Há algumas hipóteses para o mecanismo de ação das benzilfeniluréias: inibição proteolítica da ativação do zimogênio de quitina sintase (Marks e cols., 1982), inibição do metabolismo de ecdisona (Yu e Terriere, 1977), aumento da atividade quitinásica (Ishaaya e Casida, 1974), bloqueio da síntese de quitina na última etapa da via, acúmulo de uridil difosfato N-acetil glicosamina (Marks e Sowa, 1976; Hajjar e Casida, 1978), acúmulo de N-acetil glicosamina (Poste cols., 1974; Deul e cols., 1978) e inibição do receptor de sulfoniluréia (Abo-Elghar e cols., 2004).

Outro grupo pertencente à classe dos IGRs não hormonais é composto pelas diaminotriazinas (ciromazinas), que endurecem a cutícula do inseto (Beatye Marquardt, 1996; Tasei, 2001).

Atualmente, no Brasil, o principal inseticida químico utilizado no controle de vetor *Aedes aegypti* é o temephos, um organofosforado. Porém, devido ao surgimento de populações destes insetos resistentes, este produto está sendo substituído pelo diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, no controle de larvas do mosquito (Ministério da Saúde, 2010).

Os vegetais também são fontes de metabólitos secundários que agem como reguladores de crescimento ou como inseticidas fisiológicos. A azadiractina, um tetranortriterpenoide, é o mais importante composto ativo da *Azadirachta indica* que parece controlar mais de 200 espécies de inseto (Burg e Mayer, 1998), pois apresenta propriedades deterrentes, de bloqueio da muda e alteração da ovogênese (Foster e Harris, 1997, Casida e Quistad, 1998, Moreira e cols., 1994)

A grande vantagem destas classes de inseticidas de terceira geração é que são praticamente atóxicos para os mamíferos e atuam basicamente sobre a praga alvo, preservando seus inimigos naturais (Beaty e Marquardt, 1996).

Estratégias de Controle usando Transgênicos ou RNA de Interferência.

O uso de plantas geneticamente modificadas, também denominadas transgênicas, com atividade inseticida, é uma estratégia alternativa no controle de insetos praga que vem sendo utilizada. Este controle apresenta algumas vantagens: ser controle permanente, não sendo necessárias aplicações constantes ou vistoria por parte dos agricultores; proteção de partes da planta de difícil acesso; diminuição dos gastos com inseticidas químicos; e não ser afetado por fatores climáticos (Meensen e Warren, 1989). Por outro lado, existem alguns riscos relativos à utilização destes transgênicos, tais como, seleção de populações de insetos resistentes, efeitos sobre espécies não alvos e efeitos adversos no ecossistema (Tiedje e cols., 1989). Atualmente, o transgênico mais utilizado no controle de pragas é aquele que super expressa o produto do gene *cry* de *B. thuringiensis* em diversas espécies de culturas, como milho, batata, canola, algodão, soja e arroz (Naranjo, 2009). Além da toxina Cry, outras moléculas como lectinas, inibidores de proteases, proteínas inseticidas vegetais, quitinases têm sido super expressas em plantas geneticamente modificadas visando o

controle de insetos (Carozzi e Koziel, 1997; Cordeiro e Sa, 2001). Algumas alternativas para evitar o aparecimento de resistência em insetos a plantas transgênicas é a expressão de mais de um gene com a atividade inseticida na mesma planta (Maqbool e cols., 2001) ou o uso de toxinas híbridas (Naimov e cols., 2003), ou mesmo um híbrido de uma toxina e uma proteína não tóxica que direciona a toxina para o seu alvo (Mehlo e cols., 2005).

Mais recentemente, uma nova técnica de silenciamento gênico, o RNA de interferência (RNAi), tem sido bastante estudada como uma potencial alternativa para o controle de insetos (Whyard e cols., 2009).

O mecanismo do RNAi, também conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), tem sido evidenciado na quase totalidade dos organismos eucarióticos (Finnegan e cols., 2003). Tipicamente, o silenciamento por RNAi é feito através de um RNA dupla fita (dsRNA), com aproximadamente 500 pares de base, que primeiro é processado pela enzima Dicer RNase, no interior do organismo alvo, em fragmentos menores de 20-26 nucleotídeos de comprimento (do inglês, “small interfering RNAs” ou “siRNAs”). Por uma via ainda não completamente elucidada, que envolve o complexo RISC (do inglês, “RNA-induced silencing complex”), os siRNAs degradam de maneira específica moléculas de mRNAs, cujas sequências sejam homólogas a dos siRNAs (Semizarov e cols., 2003), ou inibem a tradução de moléculas de mRNA alvo (Grosshans e Slack, 2002), resultando em redução ou total supressão na expressão destes genes (Chi e cols., 2003 e Schwarz e cols., 2002).

O RNAi é uma técnica bastante específica, pois, permite o silenciamento de partes bem distintas do gene, sendo possível silenciar um gene de uma determinada espécie de inseto, sem silenciar o mesmo gene de uma espécie não alvo. Outra vantagem é que o silenciamento gênico por RNAi pode ser modulado em função da quantidade de dsRNA administrada. Em diversos trabalhos com insetos, a eficácia do silenciamento gênico depende do sistema de liberação do dsRNA, que pode ser administrado por injeção, por via tópica, por adição na água de criação associada à nanopartículas para alimentação, por spray ou banho. Mas, na maioria dos casos, tem-se observado o fenótipo esperado em função do silenciamento gênico (Zhang e cols., 2010a; Whyard e cols., 2009; Wang e cols., 2011). Um outro aspecto interessante sobre o potencial uso de pesticidas a base de dsRNA é a probabilidade de aparecimento de resistência. Teoricamente, se um inseto adquire resistência a uma determinada sequência de dsRNA devido à uma mutação, seria relativamente fácil desenhar uma outra dsRNA que tivesse como alvo outra região do mesmo gene (Whyard e cols., 2009). O grande desafio para potencial utilização de dsRNA como pesticidas será a identificação de apropriados genes alvos. Os genes envolvidos com a via de biossíntese e regulação de quitina, molécula que não está presente em vertebrados, constituem bons alvos para o silenciamento gênico, possibilitando o controle mais seletivo de insetos (Arakane e cols., 2005, Arakane e cols., 2008; Zhang e cols., 2010b). Também especula-se que plantas possam expressar dsRNA para genes alvos no controle de pragas de agricultura (Whyard e cols., 2009).

Resistência a Inseticidas.

A Organização Mundial de Saúde define resistência como o desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de algum organismo para tolerar doses de um produto tóxico que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie.

A resistência é um fenômeno estritamente genético, com mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (Li e cols., 2007). Os insetos

possuem ciclo de vida curto e prole abundante, o que favorece o surgimento de populações com diferentes características genéticas. A propagação de resistência a inseticidas em populações de insetos está relacionada com a frequência de sua utilização e é resultante não apenas da pressão seletiva desses compostos tóxicos sobre estas populações, como das características herdadas das espécies de insetos envolvidas (Hemingway e Ranson, 2000). Os indivíduos com mutações vantajosas relacionadas ao fenótipo de resistência possuem maior probabilidade de sobreviverem a tratamentos com inseticidas e contribuirão com uma prole maior que aqueles indivíduos suscetíveis, resultando no aumento da frequência do gene que confere resistência nas próximas gerações (Beaty e Marquardt, 1996).

A redução da sensibilidade aos inseticidas por parte dos insetos pode ser causada por diferentes mecanismos, tais como: 1- modificações comportamentais, onde o inseto reconhece a presença do inseticida e evita contato com ele, por exemplo, reduzindo sua entrada em domicílios (Mbogo e cols., 1996; Mathenge e cols., 2001); 2- redução na penetração cuticular, associada a modificações na sua composição (Stone e Brown, 1969); 3- resistência metabólica, por aumento da capacidade de metabolização desses produtos, através de enzimas de detoxificação (Hemingway, 2000); e 4- modificação nos sítios alvos dos inseticidas (French-Constant e cols., 2004).

Resistência Metabólica.

A resistência metabólica a organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides tem sido associada principalmente ao aumento da detoxificação desses inseticidas promovida por três principais enzimas: glutatona-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e citocromo P450 (CYPs) (Hemingway, 2000; Perry e cols., 2011).

As GSTs são enzimas diméricas e multifuncionais que possuem função de detoxificação de vários xenobióticos (Prapanthadara e cols., 1996). Elas promovem resistência a organofosforados, organoclorados e piretróides por conjugação da glutatona reduzida a estes compostos ou a produtos tóxicos primários do metabolismo destes inseticidas. Duas famílias de GST, classificadas como I e II, são conhecidas em insetos e ambas parecem ter associação com resistência a inseticidas (Hemingway, 2000).

A alta atividade de enzimas de detoxificação pode estar associada à elevação dos níveis de expressão dos genes que codificam estas enzimas, como por exemplo, foi descrito para linhagens de *A. gambiae* resistentes a DDT, que apresentam os genes de GSTs super expressos (Ortelli e cols., 2003). Outros processos que podem levar ao aumento de atividade de detoxificação de inseticidas são: a amplificação gênica, observada em linhagens de *C. quinquefasciatus* resistentes que apresentam cerca de 20 cópias do gene de estearase β (Guillemaud e cols., 1997); *splicing* alternativo, como observado para um dos genes de GST do mosquito *A. gambiae*, o gene *aggst1 α* , que produz quatro transcritos de RNAm distintos, que geram enzimas GSTs que diferem em sua capacidade de metabolizar inseticidas (Ranson e cols., 1997; Ranson e cols., 1998).

O aumento da atividade de enzimas de detoxificação pode ainda ser resultante de substituições de aminoácidos, que modificam sua afinidade pelo composto tóxico, aumentando o nível de resistência (Hemingway, 2000). A resistência de *L. cuprina* ao organofosforado malation é causada por uma única substituição de aminoácidos (triptofano²⁵¹-leucina) na esterase E3 (Campbell e cols., 1998). Outra substituição (glicina¹³⁷-aspártico) na região do sítio ativo dessa mesma enzima confere resistência a

um amplo espectro de organofosforados, mas não ao malation (Newcomb e cols., 1997).

As esterases compreendem seis famílias de proteínas pertencentes à superfamília de α/β hidrolases que destroem um amplo espectro de inseticidas, por hidrolisarem as ligações ésteres destes compostos. (Oakeshott e cols., 1993). As ESTs também agem sequestrando os inseticidas mais rapidamente do que os metabolizam, impedindo, desse modo, que cheguem ao local de ação (Kadous e cols., 1983). Essas enzimas são importantes na resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos, e em menor escala, aos piretróides. Também já foi observado que um mecanismo alterado de acetilcolinesterase produz um espectro amplo de resistência aos organofosforados e/ou aos inseticidas do tipo carbamato (SUCEN, 2001).

11

As enzimas CYPs são hemoproteínas que utilizam o NADPH como co-substrato (Hemingway e Ranson, 2000). Esta complexa família de enzimas é encontrada em muitos organismos, incluindo insetos. Essas enzimas estão envolvidas com o metabolismo de drogas, xenobióticos e na detoxificação de quase todas as classes de inseticidas (Hemingway e Ranson, 2000). Elas também possuem um papel no metabolismo endógeno de esteróides, ácidos graxos e colesterol (Martin, 2003). São enzimas que catalisam reações de oxi-redução, com a utilização de oxigênio molecular, onde apenas um dos átomos de oxigênio é incorporado ao substrato orgânico e o outro é reduzido à água. Existem pelo menos quatro famílias isoladas de insetos, que são as famílias 4, 6, 9 e 18 (Brogdon e McAllister, 1998). As enzimas CYP da família 6 de insetos são responsáveis por resistência a inseticidas e se apresentam como um *cluster* gênico, assim como, as esterases nos dípteros (Maitra e cols., 1996). O aumento dos níveis dessas enzimas em insetos resistentes é resultado da amplificação de expressão (Tomita e Scott, 1995; Carino e cols., 1994), pois os membros do cluster podem ser expressos como alelos múltiplos (Tomita e cols., 1995).

Resistência por Modificação nos Sítios Alvos dos Inseticidas.

A resistência a inseticidas pode também ser decorrente de modificações nas moléculas alvos dessas substâncias, dificultando ou impedindo a interação (Perry e cols., 2011). Uma substituição do aminoácido alanina por um de serina no receptor de GABA confere resistência aos inseticidas ciclodienos, como o dieldrin. Esta mutação já é encontrada em *D. melanogaster*, *A. aegypti* e em vários outros insetos resistentes ao inseticida (Thompson e cols., 1993; Ffrench-Constant e cols., 1998). Outros exemplos de mutações em sítios alvos dos inseticidas são as encontradas nos genes que codificam canais de sódio dependentes de voltagem, que estão associados à resistência a DDT e piretróides conhecida como “kdr”. A primeira mutação observada relacionada à resistência “kdr” em insetos, foi a substituição do aminoácido leucina por fenilalanina no segmento transmembrana S6 do domínio II do canal de sódio de *M. domestica*. Essa mutação produz um aumento cerca de 10 a 20 vezes maior na resistência ao DDT e piretróides. Um segundo ponto de mutação ocorre em outra região do mesmo domínio, agora a substituição do aminoácido metionina por uma treonina, resultando em um aumento de cerca de 500 vezes na resistência a estes dois inseticidas. Esse fenótipo é conhecido como super “kdr” (Williamson e cols., 1993; Williamson e cols., 1996; Williamson e cols., 1997) A observação de resistência cruzada dos inseticidas DDT e piretróides é um bom indicativo da resistência do tipo kdr (Beaty e Marquardt, 1996).

Outro alvo de inseticidas é a enzima acetilcolinesterase. Mutações pontuais em cinco regiões do gene desta enzima foram descritas e estão associadas à resistência a organofosforados e carbamatos em *D. melanogaster* (Mutero e cols., 1994).

Resistência a Agentes de Controle Biológico e a Compostos Reguladores do Crescimento dos Insetos.

Altos níveis de resistência têm sido encontrados em larvas de *C. quinquefasciatus* a toxina *Bin*, produzida pelo *B. sphaericus*. Esta resistência está associada à deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1*, que codifica para receptores da toxina *Bin* na membrana do intestino de larvas deste inseto (Chalegre e cols., 2009).

A resistência a inseticidas de terceira geração, do tipo hormonal, é pouco evidenciada, entretanto, altos níveis de resistência a metopreno têm sido observados no mosquito *O. nigromaculis* (Cornel e cols., 2002) e em *A. taeniorhynchus* (Dame e cols., 1998). Um gene denominado *Met* (de "*Methoprene-tolerant*") foi identificado em *D. melanogaster* resistentes ao composto metopreno (Wilson e cols., 2006). O produto do gene *Met* tem sido sugerido como um elemento de regulação de transcrição e parece ser um componente do receptor do hormônio juvenil (Ashok e cols., 1998; Wilson e cols., 2006). As células de dípteras resistentes possuem capacidade de excluir ecdisona sintética. A exclusão destes análogos pode estar sendo mediada por transportadores do tipo ABC ("ATP binding cassette"), esses servindo como mecanismo de resistência a ecdisteróides em células de insetos (Sundaram e cols., 1998).

A resistência aos inseticidas de terceira geração, do tipo não hormonal, também é pouco conhecida. A resistência ao diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, tem sido relacionada com altos níveis de enzimas GSTs e CYPs encontrados nestes insetos (Sauphanor e cols., 1997).

Resistência Cruzada e Resistência Múltipla a Inseticidas.

Os mecanismos de resistência a inseticidas descritos anteriormente, sozinhos ou em combinação, podem conferir um amplo espectro de resistência (Hemingway e cols., 2004). Dois fenômenos adicionais relacionados com resistência são conhecidos, a resistência cruzada e a múltipla. A primeira refere-se aos casos nos quais um único mecanismo de defesa confere resistência a inseticidas de uma mesma classe ou a inseticida de classes diferentes. Para exemplificar, já foi descrito resistência cruzada a DDT e a piretróides em *A. albimanus* da Guatemala, a qual foi associada à alta atividade de oxidases do tipo CYP (Brogdon e cols., 1999). No caso da múltipla, a defesa é contra inseticidas através de mecanismos de resistência múltiplos e coexistentes (Milani, 1963; Busvine, 1968). A resistência múltipla tem sido observada em populações de *A. gambiae* e *C. quinquefasciatus* de Benin (África) resistentes a DDT e piretróides. Os mecanismos de resistência encontrados nestas duas populações, que justificam este tipo de resistência, foram a ocorrência simultânea de mutação "kdr" e o aumento da metabolização desses compostos por enzimas de detoxificação (Corbel e cols., 2007).

Em mamíferos e outros organismos, a resistência a múltiplas drogas tem sido relacionada principalmente a proteínas transportadoras da superfamília ABC (do inglês

“ATP binding cassette”) (Higgins, 1992; Allikmets e cols., 1996). Os transportadores ABC são proteínas que realizam o transporte de diversas moléculas através de membranas, utilizando a energia liberada pela hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP). A super expressão de alguns membros dessa superfamília como a glicoproteína-P (P-gp), a proteína de múltipla resistência (MRP), a proteína relacionada à resistência do câncer de mama (BCRP) em mamíferos e seus homólogos em outros organismos, leva ao fenótipo conhecido como múltipla resistência a drogas, MRD (do inglês “*multidrug resistance*”). Neste fenótipo, uma célula desenvolve resistência a um amplo espectro de drogas, que diferem em suas estruturas e locais de ação. (Ling, 1997; Dean, 2002). O fenótipo MDR consiste da extrusão de drogas por estas bombas de efluxo, resultando em células resistentes a drogas quimioterápicas, antibióticas e antirretrovirais. Este fenótipo pode ser revertido por substâncias, tais como verapamil, quinidina e ciclosporina, conhecidas como reversores do fenótipo MDR (Lage, 2003).

Além dos clássicos mecanismos de resistência descritos em insetos, alguns estudos sugerem que a P-gp tenha um papel no efluxo de inseticidas, e que possa estar relacionada com resistência a estes compostos, de forma semelhante ao fenótipo MDR. No inseto *Manduca sexta*, uma linhagem que apresenta resistência à nicotina, e em *Rhodnius prolixus*, vetor da Doença de Chagas, foi descrito um mecanismo de transporte, no túbulo de Malpighi, capaz de remover nicotina e outros alcalóides da hemolinfa destes insetos (Maddrell e Gardiner, 1976). Em *Manduca sexta*, também, foi demonstrada a presença de um homólogo da P-gp na barreira hemolinfa /sistema nervoso. Esta proteína foi relacionada com a remoção da nicotina do sistema nervoso do inseto, sugerindo uma relação entre a P-gp e a resistência a múltiplos inseticidas (Murray e cols., 1994). O sistema de remoção da nicotina pelo túbulo de Malpighi em *Manduca sexta*, também, pode estar relacionado com a P-gp, pois, a presença de um homólogo desta glicoproteína também foi descrito neste órgão (Gaertner e cols., 1998).

Alguns relatos na literatura, também, têm demonstrado que linhagens de insetos resistentes a inseticidas super expressam P-gp, e que a presença de agentes reversores do fenótipo MDR, aumentam a toxicidade de inseticidas nestas cepas. Essa observação sugere um papel da P-gp no efluxo de inseticidas (Lanning e cols., 1996 a, b; Podsidlowski e cols., 1998; Buss e cols., 2002; Srinivas e cols., 2004, 2005; Porretta e cols., 2008; Figueira-Mansur, 2010). Uma evidência adicional para esta hipótese foi fornecida por Aurade e cols. (2006) que demonstraram que a atividade de hidrólise de ATP da P-gp de *Helicoverpa armigera* é aumentada na presença de inseticidas, sugerindo o transporte destes compostos através da bomba de efluxo. Além disso, o silenciamento do gene da P-gp, através da técnica de RNAi, resultou em uma maior susceptibilidade de larvas do mosquito *A. aegypti* ao inseticida temephos, sugerindo uma função deste transportador ABC no efluxo deste inseticida. Outro resultado interessante é que o tratamento de larvas do mosquito com temephos foi capaz de induzir o aumento da expressão do gene de P-gp (Figueira-Mansur, 2010). O conjunto destes relatos sugere um possível papel da P-gp no efluxo de inseticida, e possivelmente, o envolvimento desta proteína em mecanismos de resistência. Isso nos leva a especular sobre o efeito residual dos inseticidas utilizados no controle de populações de insetos. O uso indiscriminado destes compostos nos Programas de Combate poderia agir como uma pressão seletiva sobre populações de insetos, selecionando indivíduos resistentes com uma elevada expressão de proteínas, como a P-gp ou outros transportadores ABC, relacionados com múltipla resistência a drogas. A descoberta de um novo mecanismo de resistência a inseticidas, até então, negligenciado, poderia auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle de populações de insetos vetores e pragas de lavoura.

Considerações Finais

Os estudos sobre as bases moleculares dos processos de metabolismo de inseticidas, de resistência metabólica e de sítios alvos são valiosos conhecimentos para o controle efetivo de pragas e vetores de doenças. A perspectiva de estratégias de controle mais seletivas, mais seguras para espécies não alvos e com menor chance de aparecimento de resistência, deveu-se ao avanço de pesquisas em áreas como a genômica, que possibilitou o sequenciamento do genoma de diversos insetos; a identificação de genes relacionados com resistência a inseticidas e a identificação de genes alvos para o silenciamento, deleção e a produção de transgênicos a serem usados em controle. O desenvolvimento da área de metabolômica permitiu a identificação de rotas metabólicas e moléculas que são exclusivas de inseto, bem como o conhecimento sobre as vias de metabolismo de inseticidas e as de resistência. Avanços na área da biologia estrutural e modelagem computacional permitiram a expansão do desenho racional de protótipos de inseticidas mais seletivos, mais seguros e com maior efeito residual. Outro grande progresso veio com as técnicas de biologia molecular que possibilitaram o desenvolvimento das engenharias genética e metabólica, que incluem técnicas de deleção de genes, mutação sítio dirigida, DNA recombinante, silenciamento gênico, clonagem e expressão de proteínas, melhoramento genético de espécies usadas em controle e a produção de organismos geneticamente modificados. Todo esse valioso arsenal de conhecimentos possibilita, cada vez mais, o controle racional de insetos, diminuindo assim, os prejuízos econômicos e sociais nas áreas de Saúde e Agricultura.

Referências Bibliográficas.

Abo-Elghar, E.G., Fujiyoshi, P., Matsumura, F., 2004. Significance of the sulfonyleurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 743-752.

Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A. e cols., 1996. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1649-1655.

Altstein, M., Aharonson, N., Menn, J.J., 1993. Overview: New targets for insect management in crop protection. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22, 5-12.

Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Specht, C.A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M.D., Kanost, M., Beeman, R.W., 2005. The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.* 14, 453-63.

Arakane, Y.; Specht, C.A.; Kramer, K.J; Muthukrishnan, S.; Beeman, R.W., 2008. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg-hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 959-962.

Ashok, M., Turner, C., Wilson, T.G., 1998. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2761-2766.

Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K.E., Gund, N.A., Reineke, A., Zebitz, C.P.W., Heckel, D.G., Huber, J., Jehle, J.A., 2007. Rapid emergence of Baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* 317, 1916-1918.

Aurade, R., Jayalakshmi, S. K., Sreeramulu, K., 2006. Stimulatory effect of insecticides on partially purified P-glycoprotein ATPase from the resistant pest *Helicoverpa armigera*. *Biochem. Cell. Biol.* 84, 1045-1050.

Azevedo, J.L., 1998. Microorganismos endofíticos. In: *Ecologia Microbiana*. Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds). Editora EMBRAPA, Jaguariúna, São Paulo, Brasil. 117-137.

Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104, 280-292.

Beaty, B.J., Marquardt, W.C., 1996. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado.

Bernal, J., Garrido-Bailón, E., Del Nozal, M.J., González-Porto, A.V., Martín-Hernández, R., Diego, J.C., Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Higes, M., 2010. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J. Econ. Entomol.* 103, 1964-71.

Bielza, V., Quinto, E., Fernandez, C., Gravalos, J., 2007. Contreras, Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), J. Econ. Entomol. 100, 916–920.

Bloomquist, J.R., Soderlund, D.M., 1985. Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 37-43

Braga, I.A., Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol. Serv. Saúde, 16 (4), 279-293.

Brogdon, W.G., McAllister, J.C., 1998. Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases 4.

Brogdon, W.G., McAllister, J.C., Corwin, A.M. e cols., 1999. Oxidase based DDT-pyrethroid cross-resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. Pestic. Biochem. Physiol. 64, 101-111.

Brown, A.W.A., 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2, 123-140.

Burg, I.C., Mayer, P.H., 1998. Manual de alternativas ecológica para prevenção e controle de pragas e doenças. Francisco Beltrão: Grafit, 137p.

Buss, D. S., McCaffery, A. R., Callaghan, A., 2002. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. Med Vet Entomol. 16, 218-222.

Busvine, J. R., 1968. Cross and multiple resistance in mosquitoes. Cah O.R.S.T.O.M; ser Ent. Med. 6, 215-219.

Campbell, P.M., Yen, J.L., Masoumi, A., Russell, R.J., Batterham, P., McKenzie, J.A. e cols., 1998. Cross-resistance patterns among Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), resistant to organophosphorus insecticides. J. Econ. Entomol. 91, in press.

Carino, F.A., Koener, J.F., Plapp, F.W. Jr., Feyereisen R., 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene Cyp6A1 in house fly strain with metabolic resistance to insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol., 24, 411-418.

Carozzi, N., Koziel, M., 1997. Advances in insect control: the role of transgenic plants. Taylor & Francis. 301p.

Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide: Past, present, or Future?. Ann. Rev. Entomol. 43, 1-16.

Chalegre, K.D. de M., Romão, T.P., Amorim L.B. e cols., 2009. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. Applied and environ. Microbial. 75, 1044-1049.

Chavasse, D.C., Yap, H.H., 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CTD/WHOPES/ 97.2.

Chi, J. T., Chang, H. Y., Wang, N. N., Chang, D. S., Dunphy, N., Brown, P. O., 2003. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A100, 6343-6346.

Coats, J.R., 1990. Mechanisms of toxic action and structure- activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ. Health. Perspect.* 87, 255-262.

Cohen, E., 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag. Sci.* 57, 946-950.

Corbel, V., N'Guessan, R., Brengues, C. e cols., 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica* 101, 207-216.

Cordeiro, M.C.R., Sá, M.F.G., 2001. Interação planta-patógenos e uso da biotecnologia na obtenção de plantas resistentes. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 23, 34-39.

Cornel, A.J., Stanich, M.A., McAbee, R.D. e cols, 2002. High level methoprene resistance in the mosquito *Ochlerotatus nigromaculis*(Ludlow) in central California. *Pest. Manag. Sci.* 58, 791-798.

Dame, D.A., Wichterman, G.J., Hornby, J.A., 1998. Mosquito (*Aedes taeniorhynchus*) resistance to methoprene in an isolated habitat. *J. Am. Mosq. Control Association* 14, 200-203.

Dean, S. R., Meola, R. W., Meola, S. M., Sittertz-Bhatkar, H., Schenker, R., 1998. Mode of action of lufenuron on larval cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 35, 720-724.

Dean, S. R., Meola, R. W., Meola, S. M., Sittertz-Bilatkar H., Schenker, R., 1999. Mode of action of lufenuron in adult *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 36, 486–492.

Dean, M., 2002. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Bethesda (MD):National Library of Medicine (US), NCBI. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono_001. Acessado em 18/11/2010

Deul, D. H., Jong; B. J., Kortenbach, J. A. M., 1978. Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2,6- disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides. II.-*Pestic. Biochem. Physiol.* 8, 98- 105.

Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Lê, D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 545-569.

Eldefrawi, A.T., 1976. The acetylcholine receptor and its interaction with insecticide. *Insect Biochem Physiol.* (Wilkinson, C.F., ed.), 297-326. Plenum Press, New York.

Eldefrawi, A.T., Mansour, N., Eldefrawi, M.E., 1982. Insecticides affecting acetylcholine receptor interactions. *Pharmac. Theor.* 16, 45-65.

Elliot, M., Farnham, A.W., Janes, N.F. e cols., 1973. Potent pyrethroid insecticides from modified cyclopropan acids. *Nature* 244-456.

Ferron, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23, 409-42.

French-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A. e cols., 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 353, 1685-1693.

French-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G., 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20, 163-170.

Figueira-Mansur, J., 2010. Classificação da superfamília gênica de proteínas ABC do mosquito *Aedes aegypti* e a expressão do gene da glicoproteína-P e sua relação com o transporte do inseticida temephos. XVI / 151 f.: il. Tese (Doutorado – Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Finnegan, J. E., Margis, R., Waterhouse, P., 2003. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* carpel factory (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. *Curr. Biol.* 13, 236-240.

Foster, S.P., Harris, M.O., 1997. Behavioural manipulation methods for insect pest-management. *Annu Rev Entomol.* 42, 123-146.

Fournet, F., Sannier, C., Monteney, N., 1993. Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 426-430.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Manual de Saneamento, 2004.

Gaertner, L.S., Murray, C.L. and Morris, C.E., 1998. Transepithelial transport of nicotine and vinblastine in isolated Malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggests a P-glycoprotein-like mechanism. *J. Exp. Biol.* 201, 2637-2645.

Graf, J-F., 1993. The role of insect growth regulators in Arthropod control. *Parasit. Today*, 9, 12.

Grosshans, H., Slack, F.J., 2002. Micro-RNAs: small is plentiful. *J. Cell. Biol.* 156(1), 17-22.

Guillemaud, T., Makate, N., Raymond, M. e cols., 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.* 6, 319-327.

Hajjar, N., Casida, J. E., 1978. Insecticidal benzoylphenyl ureas: structure-activity relationship as chitin synthesis inhibitors. *Science (Wash. DC)* 200, 1499-1500.

Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009-1015.

Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371-391.

Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L. e cols., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 653-665.

Higgins, C.F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev. Cell. Biol.* 8, 67-113.

Holan, G., 1969. New halocyclopropane insecticides and the mode of action of DDT. *Nature* 221, 1025-1029.

HU, W., Feng, Q., Palli, S.R., Krell, P.J., Arif, B.M., Retnakaran, A., 2001. The ABC transporter Pdr5p mediates the efflux of nonsteroidal ecdysone agonists in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J. Biochem.* 268, 3416-3422.

Ishaaya, I., Casida, J.E., 1974. Dietary TH-6040 alters cuticle composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4, 484-490.

Kadous, A.A., Ghiasuddin, S.M., Matsumura, F. e cols., 1983. Difference in the picrotoxinin receptor between the cyclodiene-resistant and susceptible strains of the German cockroach. *Pest. Biochem. Physiol.* 19, 157-166.

Lacey, L.A., e cols., 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol. Control. San Diego.* 21, 230-248.

Lage, H., 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Inter. J. Antimicrob. Agents* 22, 188-199.

Lagunes, T.A.; Rodríguez, H.C., 1989. Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. Chapingo: [s.n.], 150 p.

Lanning, C. L., Ayad, H. M., Abou-Donia, M. B., 1996a. P-glycoprotein involvement in cuticular penetration of [14C]thiodicarb in resistant tobacco budworms. *Toxicol. Lett.* 85, 127-133.

Lanning, C. L., Fine, R. L., Corcoran, J. J. e cols., 1996b. *Tobacco budworm* P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1291, 155-162.

Lawrence, L.J., Casida, J.E., 1983. Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science* 221, 1399-1401.

Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 231-253.

Ling, V., 1997. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40, 3-8.

Maddrell, H.P., Gardiner, B.O.C., 1976. Excretion of alkaloids by malpighian tubules of insecticides. *J. Exp. Biol.* 64, 267-281.

Maitra, S., Dombroski S.M., Waters L.C., Ganguly R., 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 180, 165-171.

Mansur, J.F., Figueira-Mansur, J., Santos, A.S., Santos-Junior, H., Ramos, I.B., de Medeiros, M.N., Machado, E.A., Kaiser, C.R., Muthukrishnan, S., MASUDA, H., MELO, A.C.A., Moreira, M.F., 2010. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 59-67.

Maqbool, S.B., Riazuddin, S., Loc, N.T., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., Christou, P., 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Mol. Breeding* 7, 85-93.

Marks, E.P., Sowa, B.A., 1976. Cuticle formation *in vitro*. In: The Insect Integument. (H.R. Hepburn, ed.),. 339- 357. Amsterdam: Elsevier.

Marks, E.P., Leighton, T., Leighton, F., 1982. Mode of action of chitin synthesis inhibitors. In *Insecticide Mode of Action*, ed. J. Coats, 281-313. New York: Academic.

Martin, T., Ochou, O.G., Vaissayre, M., Fournier, D., 2003. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol* 9, 883-887.

Martins, F., Silva, I.G., 2004. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*. 37, 135-138.

Mathenge, E. M., Gimnig, J. E., Kolczak, M. e cols., 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 38, 531-536.

Mbogo, C. N., Baya, N. M., Ofula, A. V. e cols, 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10, 251-259.

Meensen , R.L., Warren, G., 1989. Insect control with genetically engineered crops. *Ann. Rev. Entomol.* 34, 373-381.

Mehlo, L., Gahakwa, D., Nghia, P.T., Loc, N.T., Capell, T., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M., Christou, P., 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31, 7812-7816.

Meola, R.W., Dean, S.R., Meola, S.M., Sittetz-Bhatkar, H., Schenker, R., 1998. Effect of action of lufenuron on chorionic and cuticular structure of unhatched larval *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera:Publicidae). *J. Med. Entomol.* 36, 92-100.

Merzendorfer ,H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393-4412.

Milani, R., 1963. Genetical aspects of insecticide resistance. *Bull World Health Org.* 77-87.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

Moreira, M.F., GARCIA, E.S., MASUDA, H., 1994. Inhibition by azadirachtin of phospholipid transfer from lipophorin to the oocytes in *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 27, 287-299.

Moreira, M.F., Santos, A.S., Marrota, H.R., Mansur, J.F., Ramos, I.B., Machado, E.A., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Kaiser, C.R., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Vasconcellos, A.M., 2007. A chitin-simile component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1249–1261.

Mulla, M.S, 1995. The future of insect growth regulatirs in vectors control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*11, 269-273.

Murray, C.L., Quaglia, M., Arnason, J.T. e cols., 1994. A putative nicotine pump at the metabolic blood the metabolic blood-brain barrier of the tobacco hornworm. *J. Neurobiol.* 25, 23-34.

Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. e cols., 1994. Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5922-5926.

Naimov, S., Dukiandjiev, S., de Maagd, R.A., 2003. A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. Plant Biotech. J. 1, 51-57.

Naranjo, S.E., 2009. Impacts of *Bt* crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. CAB Reviews: Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. 4 (11).

Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L. e cols., 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7464-7468.

Oakeshott, J.G., Van Papenrecht E.A., Boyce T.M., Healy M.J., Russell R.J., 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. Genetica, 90, 239-268.

Ortelli, F., Rossiter, L.C., Vontas, J. e cols., 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus, from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochem. J. , 373, 957-963.

Perry, T., Batterham, P., Daborn, P.J., 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 411-422.

Podsiadlowski, L., Matha, V., Vilcinskas, A., 1998. Detection of a p-glycoprotein related pump in Chironomus larvae and its inhibition by verapamil and cyclosporin A. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 121, 443-450.

Porretta, D., Gargani, M., Bellini, R. e cols., 2008. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the p-glycoprotein efflux pumps. Med. Vet. Entomol. 22, 48-54.

Post, L., Jong, B., Vincent, W., 1974. 1-(2,6-Disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: Inhibitors of chitin synthesis. Pestic. Biochem. Physiol. 4, 473-483.

Praca, L.B., Silva Neto, S.P., Monnerat, R.G., 2006. *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle. Documentos. Embrapa Pantanal, 1, 1/196-18.

Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N. e cols., 1996. Purification and characterization of a major glutathione-S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus*. Insect Biochem. Mol. Biol., 26, 277-285.

Ranson, H., Prapanthadara, L., Hemingway, J., 1997. Cloning and characterisation of two glutathione S-transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. Biochem. J., 324, 97-102.

Ranson, H., Collins, F.H., Hemingway, J., 1998. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 14284-14289.

Ritter, L., 1997. Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer. Cancer 80, 2019-33.

Sauphanor, B., Cuany, A., Bouvier, J.C. e cols., 1997. Mechanism of resistance to deltamethrin in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). Pestic. Biochem. Physiol. 58, 109-117.

Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., Zamore, P. D., 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell.* 10, 537-548.

Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N., Fesik, S. W., 2003. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 27, 6347-6352.

Shono, T., Scott, J.G., 2003. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pest. Biochem. Physiol.* 75, 1-7.

Srinivas, R., Udikeri, S. S., Jayalakshmi, S. K. e cols., 2004. Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 137, 261-269.

Srinivas, R., Shamsundar, G. S., Jayalakshmi, S. K. e cols., 2005. Effect of insecticides and inhibitors on P-glycoprotein ATPase (M-type) activity of resistant pest *Helicoverpa armigera*. *Curr. Sci.* 88, 1449-1452.

Stone, B. F., Brown, A. W., 1969. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. *Bull World Health Organ*, 40, 401-408.

SUCEN - Superintendência de Controle de Epidemias , 2001. Segurança em controle químico de vetores; disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/saude_trabalhador/texto_seguranca_e_controle_quimico.htm Acesso em: 20 de jan. de 2006.

Sundaram, M., Palli, S.R., Krell, P.J. e cols., 1998. Basis for selective action of a synthetic molting hormone agonist, RH-5992 on lepidopteran insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 693-704.

Tasei, J.N., 2001. Effects of insect growth regulators on honey bees and non-Apis bees: A review. *Apidologie* 32, 527-545.

Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.N., Regal, P.J., 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70(2), 298-315.

Thompson, M., Steichen, J.C., French-constant, R.H., 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow-fever mosquito *Aedes aegypti* - conservation of the gene and resistance-associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Lett.* 325, 187-190.

Tomita, T., Liu, N., Smith, F.F., Sridhar, P., Scott, J.G., 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.*, 4, 135-140.

Tomita, T., Scott, J.G., 1995. cDNA and deduced protein sequence of Cyp6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, 275-283.

Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339-364.

Vendramin, J.D., Castiglione, E., 2000. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: Guedes, J.C., Drester da Costa, I., Castiglione, E. Bases e Técnicas do Manejo de insetos. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 8, 113-128.

Wang, Z.Y., Yao, M.D., Wu, Y.D., 2009. Cross-resistance, inheritance and biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*, Pest. Manage. Sci. 65 , 1189–1194.

Wang, Z.Y., Zhang, H., Li, H., Miao, X., 2011. Second-Generation Sequencing Supply an Effective Way to Screen RNAi Targets in Large Scale for Potential Application in Pest Insect Control. Plos One. 6(4).

Whyard ,S., Singh, A.D., Wong, S., 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 824-32.

Williamson, M.S., Denholm, I., Bell, C.A. e cols., 1993. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). Mol. Gen. Genet. 240, 17-22.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. e cols. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knock-down resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. Mol. Gen. Genet. 252, 51-60.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Schuler, T., Denholm, I., Devonshire, A.L., 1997. Molecular genetic studies of knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroids. In: Resistance '97: Integrated Approach to Combating Resistance, 1, 16-16.

Wilson, T. G., Cryan, J. R., 1997. Lufenuron, a chitin-synthesis inhibitor, interrupts development of *Drosophila melanogaster*.. J. Exp. Zool. 278, 37-44.

Wilson, T.G., Yerushalmi, Y., Donnell, D.M. e cols., 2006. Interaction between hormonal signaling pathways in *Drosophila melanogaster* revealed by genetic interaction between Methoprene-tolerant and Broad-Complex. Genetics 172, 253-64.

Wyss, C.F., Young, H.P., Shukla, J., Roe, R.M., 2003. Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad. Crop Protect. 22, 307–314.

Yu, S.J., Terriere, L.C., 1977. Esterase and oxidase activity of house fly microsomes against juvenile hormone analogues containing branched chain ester groups and its Induction by phenobarbital, J. Agric. Food Chem. 25, 1076.

Zerba, E., 1988. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. Parasit. Today 4, 53-57.

Zhang, X., Zhang, J., Zhu, K.Y., 2010a. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). Insect Mol. Biol. 19, 683-93.

Zhang, J., Liu, X., Zhang, J., Li, D., Sun, Y., Guo, Y., Ma, E., Zhu, K.Y., 2010b. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 824-33.