

Ceres Maciel de Miranda

**Expressão de *Microplusina* em *Aedes aegypti*:
Avaliação do efeito sobre *Plasmodium*
*gallinaceum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Lara Capurro Guimarães

São Paulo
2011

Resumo

Maciel, C. **Expressão de Microplusina em *Aedes aegypti*: Avaliação do efeito sobre *Plasmodium gallinaceum*** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A transmissão de parasitas da malária por mosquitos vetores é dependente do desenvolvimento bem sucedido das formas infectantes de *Plasmodium* sp., especialmente os esporozoítas, que são as formas que infectam o hospedeiro vertebrado. A manipulação genética de mosquitos vetores tem sido uma estratégia alternativa na tentativa de controle da malária. Um componente extremamente importante desta estratégia é a escolha de uma molécula efetora capaz de reduzir a transmissão do patógeno. Microplusina é um peptídeo antimicrobiano rico em cisteína, originalmente descrito como um componente antimicrobiano da hemolinfa e dos ovos de carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Testes anteriores utilizando o modelo experimental mosquito *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* mostraram que a microplusina é altamente tóxico para esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum* em concentração relativamente baixa, sem apresentar toxicidade aos mosquitos vetores *Aedes aegypti*. Nosso objetivo foi analisar a expressão da microplusina e seu efeito na infecção de *P. gallinaceum* em mosquitos transgênicos. Obtivemos quatro linhagens através da integração de um transgene contendo a região promotora do gene da vitelogenina de *Ae. aegypti*, peptídeo sinal maltase-like I de *Ae. aegypti* e a sequência codificadora da microplusina (PMOS [3xP3-EGFP-AeVg Micro]). A atividade anti esporozoítas da microplusina expressa pelos mosquitos transgênicos mostrou diferença significativa as linhagens. O desenho de novas moléculas utilizando como molde moléculas efetoras existentes e testadas, possibilitará o aperfeiçoamento da expressão de genes exógenos em mosquitos transgênicos, tornando-os refratários ao parasita.

Palavras-chave: mosquito transgênico; microplusina; molécula efetora; *Aedes aegypti*; *Plasmodium gallinaceum*.

ABSTRACT

Maciel, C. **Microplusin expression in *Aedes aegypti*: evaluation of effect on *Plasmodium gallinaceum*** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Transmission of malaria parasites by mosquito vectors is dependent on the successful development of *Plasmodium* sp. infective forms, particularly the sporozoites, which are the forms that enter the vertebrate host. The genetic manipulation of mosquito vectors has been a strategy for malaria control. An extremely important component of this strategy is the effector molecule of choice which reduces parasite transmission. Microplusin is a cysteine-rich antimicrobial peptide originally described as an hemolymph and eggs antimicrobial component of the cattle tick *Boophilus microplus*. Previous tests using the experimental model *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti* showed that microplusin is highly toxic to *P. gallinaceum* sporozoites in relatively low concentration, without showing toxicity to the mosquito vector *A. aegypti*. Our goal was to analyze transgenic mosquitoes expressing microplusin and its effect on infection of *P. gallinaceum*. We obtained four lines through the integration of transgene that containing the promoter region of the *A. aegypti* vitelogenin gene, the *maltase-like I* signal peptide of *A. aegypti* and microplusin coding sequence (pMos[3xP3-EGFP-AeVg-Micro]). The activity anti sporozoites microplusin expressed by transgenic mosquitoes showed significant differences between strains. The design of effector molecules using information from existing and tested molecules as template will enable the improvement of the expression of foreign genes in transgenic mosquitoes, making them resistant to the parasite.

Keywords: transgenic mosquito; microplusin; effector molecule; *Aedes aegypti*; *Plasmodium gallinaceum*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

Doenças como malária, dengue, febre amarela, filariose, doença de Chagas, doença de Lyme, leishmaniose e outras causadas por patógenos transmitidos por insetos vetores, são consideradas problema de saúde pública em vários países e estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas, ou seja, 1/6 da população mundial, sofre de alguma doença tropical negligenciada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A malária está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, sendo a África Sub-Sahariana o maior foco de transmissão, onde ocorrem 90% dos casos no mundo. Segundo a WHO (2010) metade da população mundial ainda vive em áreas de risco. Considerada problema de saúde pública em mais de 90 países, a malária tem provocado enormes problemas socioeconômicos em países em desenvolvimento (WHO, Media Center, 2010). Dados referentes ao ano de 2008 mostraram que cerca de 243 milhões de casos ocorreram no mundo, resultando em aproximadamente 863.000 mortes, 89% na África, sendo que grande parte dos casos eram crianças menores de cinco anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

O continente americano possui três regiões de zona malarígena, sendo uma região localizada ao norte do Planalto Mexicano cujos principais vetores são *Anopheles quadrimaculatus* e *An. pseudopunctipennis*, outra na América Central e Antilhas, estendendo-se até a costa norte da Colômbia e Venezuela, tendo como principal vetor o *An. albimanus* e uma terceira região, ocupando grande parte do Continente Sul-Americano tendo o *An. darlingi* como principal vetor (REY, 2001).

No Brasil, no final do século XIX, a malária esteve presente em quase todo o território nacional (com exceção de alguns estados do Sul), principalmente na Amazônia Legal, onde foram descritas duas grandes epidemias amazônicas de malária entre o final do século XIX e início do século XX. Ambas as epidemias foram associadas ao deslocamento de trabalhadores de todas as regiões do Brasil durante a exploração da borracha e a construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré (CAMARGO, 1995; CAMARGO, 2003). Atualmente no Brasil cerca de 10-15% da população encontra-se em área de risco e a transmissão do plasmódio ocorre principalmente na região da Amazônia Legal, composta pelos estados o Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. De acordo com WHO (2010) em 2008

foram relatados 315.642 casos da doença (39.826 casos de crianças menores de 5 anos), sendo 15% destes casos devido à infecção por *Plasmodium falciparum*.

1.2 Agente etiológico e mosquitos vetores

O agente etiológico é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Existem cinco espécies de *Plasmodium* responsáveis por causar a malária humana: *P. falciparum* (causa a forma mais grave da doença), *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (LACRUE, 2007) e *P. knoesi*. Aproximadamente 77% das infecções registradas nas Américas são devido ao *P. vivax* (WHO, PAHO, 2010), tanto em adultos quanto em crianças. No entanto, as infecções com *P. falciparum*, espécie responsável pelas formas graves e complicadas da doença, tem ocorrido em menor frequência (REY, 2001).

No Brasil são encontradas as espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. O *P. ovale* é encontrado no continente africano e sudeste asiático. Os plasmódios em seu ciclo de vida apresentam uma fase assexuada endógena (esquizogonia), com a multiplicação no hospedeiro vertebrado, e uma fase sexuada exógena (esporogonia) com multiplicação dos parasitas nos mosquitos vetores.

Fase assexuada endógena:

Os plasmódios se beneficiam do hábito hematofágico de seus vetores, garantindo sua passagem de um hospedeiro para outro, dando continuidade ao seu ciclo de vida (CARRERA, 1991; REY, 1992). O ciclo parasitário assexuado que ocorre no hospedeiro vertebrado inicia-se quando o mosquito infectado, durante seu repasto sanguíneo, inocula junto com sua saliva, as formas infectantes de *Plasmodium* acumuladas nas glândulas salivares do inseto. Os esporozoítas ao caírem na corrente sanguínea migram para o fígado onde se alojam no interior das células hepáticas. No vacúolo parasitóforo, assim formado, os esporozoítas transformam-se em estruturas arredondadas denominadas criptozoítas, dando início ao ciclo de reprodução assexuada, também conhecido como ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica. Assim que começam as divisões nucleares, os parasitas passam a ser chamados esquizontes e, no fim da esquizogonia, produzem milhares de elementos filhos: os merozoítas. Os merozoítas que sobrevivem invadem as hemácias, dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo eritrocítico (JONES; GOOD, 2006). Após

algum tempo de evolução da infecção malárica os merozoítas diferenciam-se para produzir gametócitos, a forma que infecta o mosquito (Figura 1).

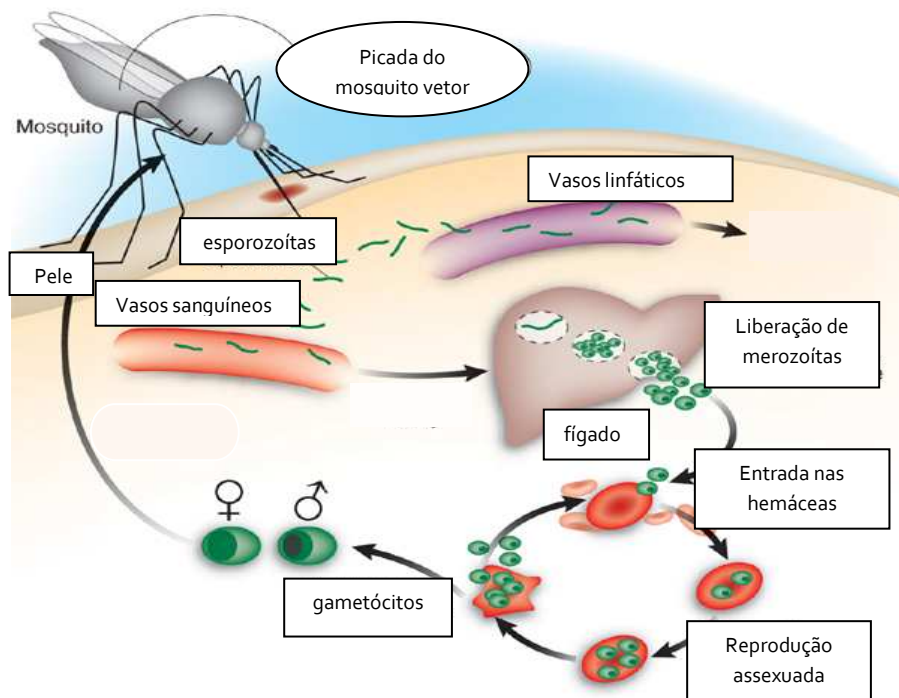


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado humano.
Fonte: modificado de Jones; Good, 2006.

Fase sexuada exógena:

Ao sugar o sangue, a fêmea do mosquito ingere todas as formas sanguíneas (merozoítas, esquizontes e gametócitos) que alcançam o intestino médio do mosquito, iniciando o ciclo parasitário sexuado no hospedeiro invertebrado. Os gametócitos ao atingirem o intestino médio iniciam o processo de gametogênese. A presença do ácido xanturênico, juntamente com a mudança de pH e temperatura adequada, permite que ocorra o processo de exflagelação do microgameta masculino, levando a diferenciação dos microgametas (BILLKER et al., 1996; GARCIA et al., 1998; GHOSH; EDWARDS; JACOBS-LORENA, 2000; ALY; VAUGHAN; KAPPE, 2009). Com a fertilização formam-se os zigotos, que começam a deslocar-se, razão pela qual são denominados oocinetos. Estas formas se dirigem para o epitélio do trato digestivo do inseto, atravessando o epitélio e se alojando entre a lâmina basal e a monocamada epitelial do intestino, formando os oocistos. Inicia-se então a esporogonia, formando milhares de esporozoítas (forma

infectiva do parasita) que são liberados na hemolinfa quando ocorre a ruptura dos oocistos maduros. Estas formas esporozoítas invadem as glândulas salivares e serão inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004). Os esporozoítas são as formas infectantes dos parasitas da malária, sendo únicos quanto a sua habilidade em invadir dois tipos de células: aquelas nas glândulas salivares do mosquito e as células do fígado dos hospedeiros vertebrados (Figura 2).

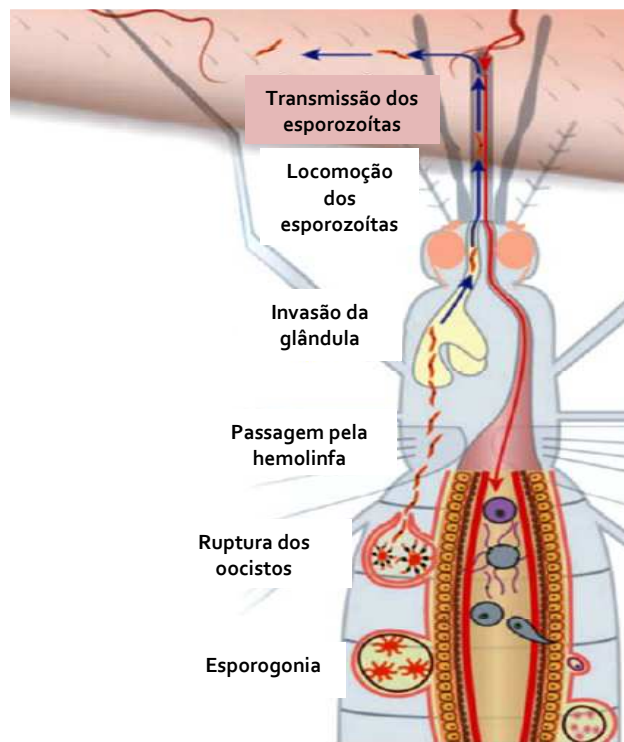


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito vetor.
Fonte: modificado de Lacrue, 2007.

O mosquito vetor do patógeno responsável por causar malária pertence à ordem dos dípteros, família Culicidae, gênero *Anopheles*. Existem mais de 350 espécies de *Anopheles* no mundo todo, mas somente cerca de 30 a 50 espécies são capazes de transmitir os plasmódios humanos (CAMARGO, 2003). As espécies de anofelinos presentes no Brasil são: *An. bellator*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. cruzii* e *An. darlingi*, sendo esta última considerada o vetor primário (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Além dos humanos, outros vertebrados também podem desenvolver a malária causada por diferentes espécies de *Plasmodium*, onde se destacam como modelos de

pesquisa os sistemas *P. berghei* e *An. stephensi* em camundongos e *P. gallinaceum* e *Aedes aegypti* em pintainhos (*Gallus gallus domesticus*).

Durante seu ciclo de vida, o mosquito passa por uma metamorfose completa, compreendendo quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Em condições de temperatura e umidade adequadas, o ovo demora cerca de 2 a 3 dias para maturar, não sobrevivendo a desidratação e baixas temperaturas. As larvas alimentam-se por filtração e passam por quatro estádios larvais, sofrendo posteriormente, metamorfose em pupas. O ciclo completo, do ovo até a forma adulta, ocorre em torno de 10 a 15 dias. Os machos vivem aproximadamente 20 dias e alimentam-se de néctar (CHAPMAN, 1998), enquanto que as fêmeas vivem cerca de 50 dias e exercem a hematofagia como forma de obtenção de proteínas e aminoácidos importantes para o desenvolvimento dos ovos (CLEMENTS, 1992; ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005).

1.3 Controle e prevenção da malária

As formas tradicionais de controle dos insetos vetores são a borrifação de inseticidas em residências e em criadouros e o uso de mosquiteiros individuais impregnados com inseticidas, que aliam a proteção física com o controle químico do mosquito infectado (WHITE, 2004; AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, 2010). Além disso, medicamentos são utilizados no tratamento da doença, sendo frequente a utilização de cloroquina, amodiaquina, mefloquina, artemisinina e seus derivados (WHO, 2010).

Muitas estratégias têm sido estudadas para prevenir a transmissão da malária, através da produção de vacinas contra os estágios de desenvolvimento pré-eritrocítico e eritrocítico do parasita, e vacinas que bloqueiam a transmissão do parasita (CARTER, 2001; COUTINHO-ABREU; RAMALHO-ORTIGÃO, 2010a; GOOD; DOOLAN, 2010).

Compostos isolados de plantas, como a cloroquina, droga antimalárica usada por um longo período devido a sua alta eficiência contra todas as espécies de parasitas da malária (contra a qual já existem parasitas resistentes) e a artemisinina, (sendo um dos mais importantes no momento no tratamento da doença), tem sido estudados por muitos grupos de pesquisa na busca por medicamentos mais eficazes no tratamento da malária (KRETTLI et al., 2001; KAROU et al., 2003; ANDRADE-NETO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; RUIZ et al., 2010).

Mesmo com a utilização de várias estratégias de prevenção e controle da malária, ocorreu a seleção de parasitas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento, os mosquitos vetores estão resistentes aos inseticidas e falta uma vacina efetiva para o controle da doença (WEBSTER, 2001; SRINIVASAN et al., 2004; WHITE, 2004; CHRISTOPHIDES, 2005).

Enquanto não surge uma vacina eficaz contra a malária, muitos pesquisadores têm estudado técnicas mais eficazes no controle do inseto vetor. O controle de vetores tem como objetivo reduzir a morbidade e mortalidade causada pela malária através da redução da transmissão do patógeno. Com o objetivo de controlar e reduzir a população do mosquito vetor, e conseqüentemente à transmissão do patógeno, tem se feito uso da estratégia do controle integrado. Controle integrado consiste na utilização de diversas técnicas de controle, visando reduzir a população do inseto vetor (FORATTINI, 2002; LHOSTE, 1996¹ apud SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, CONTROLE INTEGRADO, 2010).

O controle integrado baseia-se em três técnicas: controle mecânico, químico e biológico. O controle mecânico consiste na utilização de medidas de saneamento básico e eliminação de criadouros sejam eles naturais ou artificiais. Controle químico utiliza larvicidas de baixa toxicidade e inseticidas de ação residual. O controle biológico consiste na utilização de animais predadores e/ou parasitas, como peixes larvófagos, crustáceos, insetos, bactérias, fungos e algumas espécies de protozoários. Este tipo de controle mostra-se vantajoso devido ao menor impacto ambiental quando comparado ao controle químico.

1.4 Uso de organismos geneticamente modificados no controle de patógenos

Dentro do princípio de controle integrado, o controle genético de insetos vetores tem sido proposto como uma estratégia alternativa.

A paratransgênese e a transgênese têm sido estudadas para reduzir a competência dos insetos vetores em transmitir patógenos (COUTINHO-ABREU et al., 2010b). A paratransgênese, ou seja, a manipulação genética de bactérias comensais ou simbióticas que expressam e secretam peptídeos ou proteínas que alteram a habilidade do

¹ LHOSTE, J. **La Lutte chimique contre les insectes nuisibles**. 1996. 66 f. Les Presses de la Faculté de Medecine et de Pharmacie de Marseille, Marselha, 1996.

hospedeiro em transmitir um patógeno (RIEHLE et al., 2003), tem sido promissora no controle da transmissão do *Trypanosoma cruzi* pelo *Rhodnius prolixus* em condições laboratoriais (BEARD; CORDON-ROSALES; DURVASULA, 2002). A bactéria *Wolbachia* tem sido objeto de estudo no controle do vírus dengue (BIAN et al., 2010) e da malária (JIN; REN; RASGON, 2009).

Seguindo o princípio de controle genético, a transgênese de insetos vetores tem sido proposta como uma estratégia alternativa para controlar a malária. A transgênese interrompe a transmissão do patógeno através da introdução de um fragmento de DNA exógeno no genoma do inseto que ao ser expresso inibe o desenvolvimento do patógeno dentro do inseto vetor. Este controle genético é aplicado nas seguintes estratégias de controle: redução do tamanho de uma população alvo (supressão) e substituição de uma população alvo por outra incapaz de transmitir o patógeno (MARSHAL et al., 2010).

A estratégia de supressão de população baseia-se na técnica do inseto estéril (SIT). A esterilização dos machos pode ser feita tanto com o uso de irradiação (SIT) (DYCK et al., 2005) como através da manipulação genética (CATTERUCCIA; CRISANTI; WIMMER, 2009; ALPHEY et al., 2010). O sistema de liberação de insetos carregando gene letal dominante (RIDL) que também teve como base a técnica SIT, foi utilizado inicialmente com *Drosophilla* (THOMAS et al., 2000; ALPHEY; ANDREASEN, 2002), e tem sido estudado a fim de adaptá-lo aos culicídeos vetores (ATKINSON et al., 2007; ALPHEY; BONSALL; ALPHEY, 2011). Este sistema permite que insetos machos carreguem no genoma um gene letal dominante ativado por um promotor específico de fêmea. As larvas são mantidas em meio contendo um repressor químico, onde na sua ausência o gene é ativado causando a morte de todas as fêmeas.

A estratégia de substituição de população utilizando a modificação genética em uma população de mosquitos para conferir a eles a característica de refratoriedade à malária, impedindo a transmissão de patógenos aos hospedeiros vertebrados, é uma abordagem promissora (MOREIRA et al., 2002; RAIKHEL et al., 2002). Pesquisadores têm conseguido em laboratório bloquear nos mosquitos a transmissão da malária utilizando anticorpos que matam o parasita dentro do inseto vetor (CAPURRO et al., 2000), genes cujas proteínas interrompem o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro invertebrado (ITO et al., 2002; MOREIRA et al., 2002; RIEHLE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008) e através do melhor entendimento do sistema imune dos mosquitos (WATERHOUSE et al., 2007).

O sucesso na produção de insetos transgênicos refratários a patógenos depende de elementos de transposição eficientes, genes repórteres apropriados, promotores eficazes com expressão estágio/tecido específica para direcionar a expressão da molécula efetora, moléculas efetoras anti-parasita adequadas e uma eficiente técnica de microinjeção.

Elementos de transposição:

Realizando estudos genéticos com milho, Barbara McClintock na década de 1940, descobriu que os genes eram capazes de se moverem para diferentes locais do genoma e modificar a expressão dos genes adjacentes. McClintock (1950) descreveu estes novos elementos genéticos, mas passaram-se três décadas para que seu trabalho fosse elucidado através da descoberta de elementos transponíveis em bactérias (COOPER, 2002).

Os elementos de transposição (também conhecidos como transposons) estão divididos em duas classes gerais de acordo com seu mecanismo de transposição:

Classe I-Retrotransposons: esta classe utiliza intermediários de RNA e o mecanismo de “copia e cola”. Os retrotransposons transformam-se em RNA através da transcrição e este RNA transforma-se em DNA através da transcriptase reversa, normalmente codificada pelo próprio retrotransposon, sendo por fim inserido novamente no genoma (COOPER, 2002).

Classe II-Transposons DNA: esta classe utiliza DNA e o mecanismo de “corta e cola”. A enzima transposase quebra o DNA alvo de maneira assimétrica e cliva o transposon nas extremidades das repetições invertidas flanqueadoras. A transposase une as extremidades do DNA ao transposon e as falhas resultantes das extremidades assimétricas são reparadas (COOPER, 2002).

A produção de insetos transgênicos tornou-se viável com o sistema baseado no elemento de transposição *P* de *Drosophila* (transposon Classe II) na década de 1982 (RYDER; RUSSEL, 2003). No entanto este elemento mostrou-se ineficiente para transformar outros insetos não-drosofilídeos (ATKINSON; PINKERTON; O'BROCHTA, 2001).

Com avanços nas técnicas de transformação de células germinativas de insetos surgiu o sistema denominado bi-partido, que através da inserção de um gene exógeno no genoma do inseto via inoculação de seus ovos com um plasmídeo doador contendo o transgene e outro plasmídeo (plasmídeo auxiliador) contendo o gene da transposase, foi

possível integrar o transgene de maneira estável. Neste sistema o plasmídeo auxiliador não possui as sequências do elemento de transposição e, portanto acaba por ser perdido no processo de divisão celular, fazendo com que o transposon fique inativo no genoma do inseto.

Mosquitos como *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* têm sido transformados geneticamente utilizando elementos de transposição (COUTINHO-ABREU et al., 2010b). Ao menos quatro sistemas derivados de elementos de transposição pertencentes à Classe II passaram a ser aplicados na transformação de insetos não-drosofilídeos.

Elemento de transposição *Hermes*: foi isolado da *Musca domestica*, possui 2,7 Kb e repetições terminais invertidas de 17 pb. Em 1998, Jasinskiene e colaboradores utilizaram o transposon *Hermes* na transformação de *Ae. aegypti*, a primeira transformação estável de um culicídeo e posteriormente outros pesquisadores também fizeram uso deste elemento de transposição em transformações de *Ae. aegypti* (PINKERTON et al., 2000). Em 2001, Allen et al., utilizaram este transposon para transformar *Culex quinquefasciatus*.

Elemento de transposição *Minos*: isolado de *D. hydei*, possui 1,8 Kb, repetições terminais invertidas de 255 pb (ATKINSON; PINKERTON; O'BROCHTA, 2001) e insere-se especificamente em sítios TA no genoma (FRANZ; SAVAKIS, 1991). Sua utilização tornou possível a primeira transformação de inseto não-drosofilídeo, tendo sua atividade de transposição evidenciada em lepdópteros, ortópteros e dípteros, incluindo *An. stephensi* (CATTERUCCIA et al., 2000a; O'BROCHTA et al., 2003) e *An. gambiae* (CATTERUCCIA et al., 1999).

Elemento de transposição *PiggyBac*: isolado de um baculovírus cultivado em *Trichoplusia ni* (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002), possui 2,5 Kb, repetições terminais invertidas de 13 pb e insere-se especificamente em sítios TTAA no genoma (CARY et al., 1989; O'BROCHTA et al., 2003). Foi muito utilizado na transformação de diversos insetos pertencentes à Ordem Diptera, incluindo os mosquitos *Ae. aegypti*, *An. albimanus*, *An. stephensi*, *An. gambiae* (KOKOZA et al., 2001; LOBO et al., 2002; PERERA; HARRELL; HANDLER, 2002; NOLAN et al., 2002; GROSSMAN et al., 2001).

Elemento de transposição *mariner* (*Mos1*): isolado de *D. mauritiana* (MEDHORA; MARUYAMA; HART, 1991), possui 1,3 Kb e repetições terminais invertidas de 28 pb e insere-se especificamente em sítios TA no genoma. Assim como o elemento *Hermes*,

MOS1 também foi utilizado na primeira transformação estável de um mosquito (COATES et al., 1998).

Genes repórteres:

A expressão dos genes repórteres auxilia na identificação dos organismos transformados, permitindo a separar indivíduos transgênicos de selvagens.

Os primeiros marcadores de transformação utilizados foram genes que conferiam aos indivíduos transgênicos resistência a antibióticos (MILLER et al., 1987; MCGRANE et al., 1988). No entanto, sua utilização apresentou certas limitações por gerar seleção de falsos positivos (PINKERTON et al., 2000; HORN et al., 2002).

Anos mais tarde, passou-se a utilizar marcadores fenotípicos, como genes que resgatavam a coloração dos olhos (RUBIN; SPRADLING, 1982), por exemplo, o gene *cinnabar* de *Drosophila*, na identificação da transformação de *Ae. aegypti* (JASINSKIENE et al., 1998; COATES et al., 1998; KOKOZA et al., 2000; LOBO et al., 2002) e *Ceratitis capitata* (LOUKERIS et al., 1995). Este tipo de marcador, no entanto, também apresentou limitações na sua aplicação, podendo ser utilizado somente em espécies que possuíam mutantes para a coloração dos olhos, resultando na recuperação da sua cor.

Atualmente, tem se feito uso de outros marcadores fenotípicos, sendo o GFP (*Green Fluorescent Protein*) o mais utilizado por possibilitar a fácil identificação dos transgênicos. O GFP foi clonado da água viva *Aequorea victoria* (AMSTERDAM; LIN; HOPKINS, 1995) e utilizado como gene marcador na identificação de diferentes espécies de animais, entre eles *D. melanogaster* (PLAUTZ et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (CHALFIE et al., 1994), *Danio rerio* (AMSTERDAM; LIN; HOPKINS, 1995) e mamíferos (GODWIN et al., 1998).

A proteína fluorescente vermelha (dsRED), isolada do coral *Discosoma* sp (MATZ et al., 1999), é outro marcador bastante utilizado, cuja fluorescência é bastante intensa, podendo ser diferenciada do GFP quando expressos simultaneamente (ADELMAN et al., 2008).

Promotores constitutivos foram utilizados para expressar genes repórteres, mas mostraram-se funcionais somente quando utilizados em organismos de espécies próximas. Entre eles estão os promotores dos genes de actina e poliubiquitina de *D. melanogaster* utilizados na transformação de *Ae. aegypti*, *An. stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *D. melanogaster* (JASINSKIENE et al., 1998; COATES et al., 1998; PINKERTON et al., 2000; CATTERUCCIA et al., 2000b).

O promotor 3xP3, que possui 1,3 Kb e exerce importante papel no desenvolvimento dos olhos de animais vertebrados e invertebrados (FINOKIET; GONI; LORETO, 2007), tem sido amplamente utilizado na transgenia de animais (HORN et al., 2002; BIAN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008; MATSUOKA; IKEZAWA; HIRAI, 2010).

Promotores com expressão estágio/tecido específica:

Durante o ciclo de vida do *Plasmodium* dentro do mosquito, o parasita interage com tecidos específicos (intestino médio, hemolinfa, glândula salivar), que por sua vez tornam-se regiões alvo para bloquear o seu desenvolvimento. Para isso, se faz necessário o uso de promotor capaz de expressar o transgene no tecido de interesse e no momento apropriado, de acordo com o ciclo de vida do patógeno dentro do inseto vetor.

As buscas de diversas opções de promotores gênicos, capazes de serem testados no controle da expressão de genes efetores, e também na análise da toxicidade das próprias moléculas efetoras, contribuem com o desenvolvimento dos transgenes. A transformação genética de mosquitos vetores tem permitido caracterizar promotores endógenos e suas regiões regulatórias.

Promotores específicos de glândula salivar dos genes *maltase-like 1* e *apirase* foram utilizados na transformação de *Ae. aegypti* para direcionar a expressão da luciferase como gene repórter (COATES et al., 1999). Entretanto, a expressão do gene repórter foi fraca para ser utilizada na transgênese de mosquitos (SPERANÇA; CAPURRO, 2007).

Anos mais tarde, Catteruccia, Crisanti e Wimmer (2005) mostraram que o promotor da proteína antiplaquetária (AAPP), específico de glândula salivar de fêmea, foi fortemente ativado após o repasto sanguíneo. Diante deste resultado, Yoshida e Watanabe (2006) isolaram de *An. stephensi* o AAPP e transformaram mosquitos desta espécie com o promotor AAPP direcionando a proteína dsRED, o que resultou em altos níveis de expressão da proteína no citoplasma do lobo lateral distal da glândula salivar (região de invasão mais escolhida pelos esporozoítas de *Plasmodium*).

O promotor do gene codificante da enzima digestiva carboxipeptidase, específico de trato digestivo, foi isolado e caracterizado nos mosquitos *An. gambiae* (EDWARDS et al., 1997) e *Ae. aegypti* (EDWARDS et al., 2000) e utilizado para direcionar a expressão do gene da luciferase em *Ae. aegypti*. A expressão do gene repórter foi específica para trato digestivo, indicando a viabilidade da utilização destes promotores no direcionamento de genes anti-parasitas para o trato digestivo do mosquito (MOREIRA et al., 2000). O

promotor da carboxipeptidase de *Ae. aegypti* foi utilizado na transformação de *An. gambiae* para expressar o peptídeo cecropina A (KIM et al., 2004). Os promotores da carboxipeptidase de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* também foram utilizados na obtenção de transgênicos de *An. stephensi* expressando os peptídeos antimaláricos fosfolipase A₂ (PLA₂) e SM1 (MOREIRA et al., 2002; ITO et al., 2002).

Outro promotor de trato digestivo, a peritrofina (promotor da proteína de matriz peritrófica 1) de *An. gambiae*, foi utilizado para expressar PLA₂ de veneno de abelha e PLA₂ mutada em *An. stephensi* e *Ae. fluviatilis*, respectivamente (ABRAHAM et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008). A peritrofina, assim como a carboxipeptidase, também apresentou o perfil de expressão temporal e tecido específico.

Específico de corpo gorduroso, o promotor do gene da vitelogenina de *Ae. aegypti* foi utilizado para direcionar a expressão da defensina A, um peptídeo antimicrobiano. O transgene apresentou altos níveis de transcrição no intervalo de tempo determinado pelo gene endógeno (KOKOZA et al., 2000). Nirmala et al. (2006) caracterizaram a sequência do promotor de vitelogenina de *An. stephensi*, indicando ser um bom candidato para direcionar a expressão de transgenes em mosquitos anofelinos.

Moléculas efetoras:

Os primeiros mosquitos transformados foram obtidos com o intuito de testar a viabilidade da técnica em diferentes espécies e a expressão dos genes repórteres. Mais tarde, a aplicação da transgenia em mosquitos vetores foi utilizada para estudar a expressão de genes no bloqueio de parasitas, para que pudessem futuramente auxiliar no controle da transmissão do patógeno.

Na busca por moléculas efetoras capazes de bloquear a transmissão do patógeno no mosquito, nos deparamos com diversos mecanismos de interferência realizados por estas moléculas nos diferentes estágios de desenvolvimento do *Plasmodium* nos mosquitos (NIRMALA; JAMES, 2003).

Nenhuma molécula agindo isoladamente foi capaz de inibir 100% o desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito. Por isso, torna-se importante estudar moléculas que atuem sobre diferentes formas do parasita, visando a aplicação conjunta destas moléculas na transformação dos mosquitos vetores, a fim de se obter 100% de refratoriedade. A gama de moléculas capazes de bloquear o desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do mosquito é bem ampla, sendo que apenas uma pequena parcela foi testada na transformação destes insetos vetores.

Na busca por moléculas capazes de impedir a invasão da glândula salivar pelo esporozoíta de *Plasmodium*, fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) foram desenvolvidos e testados. O primeiro scFv desenvolvido foi o anti-Pbs21, atuando contra uma proteína de superfície de zigoto e oocineto de *P. berghei* (Pbs21), reduzindo em 93% a formação de oocistos quando mosquitos *An. stephensi* foram alimentados com sangue de camundongo infectado com *P. berghei* (YOSHIDA et al., 1999). Capurro et al. (2000) mostraram que um scFv específico para a proteína circunsporozoíta (CSP), quando injetado intratoracicamente utilizando o vírus Sindbis como vetor, reduziu 99,9% o número de esporozoítas de *P. gallinaceum* na glândula salivar de *Ae. aegypti* e Jasinskiene et al. (2007) expressando este scFv em *Ae. aegypti* transgênico, conseguiram também obter uma redução no número de esporozoítas de *P. gallinaceum* presentes na glândula salivar de 13-16% utilizando o promotor da poliubiquitina de *D. melanogaster* e 56-85% com o promotor da vitelogenina de *Ae. aegypti*.

Peptídeos PLA2 e SM1 são capazes de se ligarem aos receptores de trato digestivo e/ou glândula salivar, bloqueando a passagem do parasita. O peptídeo PLA2 de veneno da cascavel *Crotalus adamanteus*, inibiu a adesão dos oocinetos e formação de oocistos quando foi adicionado ao sangue de pintainhos infectados e ingerido por *Ae. aegypti*, *An. gambiae* e *An. stephensi*, sugerindo que PLA2 ao se ligar ao trato digestivo tenha bloqueado um receptor importante para a invasão dos oocinetos (ZIELER et al., 2001). No ano seguinte, Moreira et al. (2002) produziram mosquitos *An. stephensi* transgênicos utilizando o promotor da carboxipeptidase de *An. gambiae* para direcionar a expressão do peptídeo PLA2 de veneno de abelha, resultando na redução da formação de oocistos, além de reduzir a fertilidade das fêmeas (MOREIRA et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados quando o promotor da proteína de matriz peritrófica 1 (AgAper1) foi utilizado, sugerindo que a PLA2 poderia ter causado danos nas células epiteliais do intestino, o que acarretaria a diminuição da absorção de nutrientes e consequentemente, a baixa fertilidade das fêmeas (ABRAHAM et al., 2005). A forma inativa da PLA2 utilizada por Rodrigues et al. (2008) na transformação de *Ae. fluviatilis* foi capaz de reduzir 68% o número de oocistos de *P. gallinaceum* sem acarretar aparente custo ao *fitness* do mosquito.

Peptídeos sintéticos têm sido testados no bloqueio do desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do mosquito. O peptídeo SM1, identificado em uma biblioteca de fago, bloqueou a invasão de *P. berguei* no trato digestivo e glândula salivar de *An.*

stephensi (GHOSH; RIBOLLA; JACOBS-LORENA, 2001) e, quando expresso em *An. stephensi* transgênico direcionado pelo promotor da carboxipeptidase, foi capaz de inibir a formação de oocistos (ITO et al., 2002). Os dois estudos relatam a coincidência de tecidos com que o peptídeo e os parasitas interagem, sugerindo que ambos reconhecem receptores semelhantes presentes tanto na superfície apical do trato digestivo quanto na superfície basal do lobo distal da glândula salivar.

Além das moléculas descritas, que atuam sobre receptores, existem as moléculas com ação anti-parasítica, que podem ser endógenas, fazendo parte do repertório imunológico natural do mosquito, exógenas originárias de outra espécie e sintéticas (CARTER; HURD, 2010). Dentro desta categoria de moléculas, encontram-se diversos peptídeos antimicrobianos, como por exemplo, cecropinas, defensinas e peptídeos híbridos que interagem diretamente nos parasitas levando-os a morte celular (GWADZ et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1995; SHAHABUDDIN et al., 1998; ARRIGHI et al., 2002).

An. gambiae e *Anopheles dirus* infectados por *Plasmodium*, tiveram o número de oocistos reduzido em 81-94% e 82-95%, quando microinjetados com cecropina B e magainina II respectivamente (GWADZ et al., 1989).

An. albimanus alimentado com gametócito de *P. berghei* previamente tratados com Shiva-3, um peptídeo sintético de cecropina, tiveram o desenvolvimento do parasita inibido no trato digestivo (RODRIGUES et al., 1995).

Defensinas isoladas de *Aeschna cyanea* e *Phormia terranova* quando injetadas em *Ae. aegypti*, foram capazes de reduzir o número de oocistos viáveis e esporozoítas de *P. gallinaceum* (SHAHABUDDIN et al., 1998). *Aedes aegypti* transgênicos foram gerados, expressando defensina A e cecropina A em resposta ao repasto sanguíneo (KOKOZA et al., 2001; SHIN; KOKOZA; RAIKHEL, 2003). Cecropina A expressa em *An. gambiae*, sob a direção do promotor da carboxipeptidase de *Ae. aegypti*, reduziu a intensidade de *P. berghei* presente no mosquito transgênico quando comparado ao não transgênico.

A gomesina, peptídeo antimicrobiano isolado da aranha *Acanthocurria gomesiana*, em teste realizado contra todos os estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* e *P. berghei* “*in vitro*” e em *An. stephensi*, inibiu a exflagelação de gametócito masculino e reduziu o número de oocistos de ambas espécies de *Plasmodium*, sem afetar o mosquito (MOREIRA et al., 2007).

Nos testes realizados “*in vivo*” por Arrighi et al. (2002) com todos os estágios de desenvolvimento do *P. berghei* dentro do mosquito e utilizando peptídeos sintéticos,

Vida-1 foi ativo contra oocinetos jovens, Vida-2 reduziu em 70% a presença de oocinetos maduros e Vida-3 causou altos níveis de mortalidade em todo o período de desenvolvimento de *P. berghei*, mostrando-se ativo também contra *P. yoelli nigeriensis*. Vida-3 ao ser expresso no trato digestivo de de *An. gambiae* transgênico reduziu em 85% a infecção por *P. yoelli nigeriensis* (MEREDITH et al., 2011).

Em um estudo recente, Maciel et al. (2008) injetando o peptídeo Angiotensina II em *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum*, obtiveram uma redução de 88% no número de esporozoítas presentes nas glândulas salivares. Resultado semelhante foi obtido ao analisarem a ação anti-parasítica de VC5 (76%), análogo da Angiotensina II.

Baseado na idéia da co-expressão de duas ou mais moléculas efetoras em mosquitos transgênicos, Kokoza et al. (2010) co-expressando pela primeira vez cecropina A e defensina A em *Ae. aegypti* transgênico, com a expressão direcionada pelo promotor da vitelogenina, conseguiram reduzir 78-96% o número de oocistos de *P. gallinaceum* presentes no trato digestivo e nenhum esporozoíta foi encontrado na glândula salivar.

1.5 Microplusina

O grupo da Dr^a Silrei Daffre tem purificado e caracterizado bioquímica e molecularmente peptídeos antimicrobianos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

A microplusina, peptídeo antimicrobiano pertencente à família das defensinas, possui massa molecular de 10.204 Da e foi isolado da hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FOGAÇA et al., 2003). É um peptídeo ácido em pH fisiológico e possui em sua estrutura primária seis resíduos de cisteína envolvidos na formação de três pontes de dissulfeto. Também possui sete resíduos de histidina presentes predominantemente na sua porção C-terminal (FOGAÇA et al., 2003). Estudos mostraram que é sintetizada como uma molécula precursora com um peptídeo sinal com 20 resíduos. É expressa em diferentes tecidos do carrapato: hemócitos, corpo gorduroso e ovários (FOGAÇA et al., 2003).

Um trabalho posterior mostrou que a microplusina também está presente em ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, apresentando efeito bacteriostático em baixas concentrações (MIC=0,39 µM - 0,76 µM) contra *Micrococcus luteus*, outras bactérias Gram-positivas e fungos (ESTEVEES et al., 2009), porém não apresenta atividade contra

bactérias Gram-negativas (SILVA et al., 2009). Através da microscopia de fluorescência, viram que a microplusina está presente entre os grânulos de vitelo dos oócitos e na superfície celular, sendo também encontrada nos tubos conectivos do sistema reprodutivo das fêmeas. Sua presença no trato reprodutivo das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sugere que o peptídeo desempenhe uma função protetora para os embriões (ESTEVEES et al., 2009). O nível de transcritos de microplusina aumentou gradualmente ao longo do desenvolvimento do ovário, atingindo níveis mais elevados no início da oviposição (ESTEVEES et al., 2003).

Silva et al. (2009) ao estudarem o mecanismo de ação da microplusina, puderam concluir que o peptídeo é um quelante de cobre e sua ligação ao cobre não induz mudanças conformacionais a sua estrutura terciária. A alteração nos níveis de cobre, resultante da ação da microplusina, interferem na virulência e sobrevivência de *Cryptococcus neoformans*, inibindo a melanização do fungo, fator catalizado pela lacase, uma enzima cobre-dependente (SILVA et al., 2009). O potencial terapêutico da microplusina foi confirmado em experimentos “*in vivo*” com modelo murino, resultando na redução do processo inflamatório e da viabilidade de *C. neoformans* nos pulmões. Tais resultados sugerem que em condições otimizadas, a microplusina possa ser utilizada no controle de infecções (SILVA, 2008).

Estudo sobre a atividade anti-parasítica da microplusina, mostrou que o peptídeo possui efeito anti-esporozoíta (RODRIGUES, 2005). Neste trabalho, utilizando *Ae. aegypti* infectado com *P. gallinaceum*, foram realizadas microinjeções intratorácicas com 10 μ M e 30 μ M do peptídeo e sua atividade resultou na redução do número de esporozoítas na glândula salivar quando comparado com o grupo controle em 83% e 80% respectivamente. Além da identificação de sua ação anti-esporozoítas, também foi confirmado que esta molécula não possui efeito tóxico ao mosquito. Neste mesmo trabalho, os experimentos de incubação de esporozoítas maduros com microplusina 20 μ M resultaram na permeabilidade da membrana após 30 minutos.

Poucos mosquitos transgênicos refratários a malária aviária e de roedores, expressando moléculas letais aos parasitas têm sido criados. Além disso, nenhuma molécula letal ao *Plasmodium* da malária humana foi expressa em mosquitos transgênicos até o momento.

Diante da confirmação da eficiente atividade anti-parasítica da microplusina, este peptídeo tornou-se um promissor candidato a ser melhor analisado, permitindo criar uma molécula

sintética extremamente eficaz no bloqueio do *Plasmodium* no mosquito vetor através da manipulação da sua sequência de aminoácidos, carga, hidrofobicidade e estrutura terciária que resulta na habilidade da molécula para formar poros. O sistema da malária aviária foi utilizado pelo fato do *P. gallinaceum* ser filogeneticamente próximo ao *P. falciparum* (parasita responsável pela forma mais severa da malária) (WATERS; HIGGINS; MCCUTCHAN, 1991; MCCUTCHAN et al., 1996), secretar na superfície dos esporozoítas proteínas provavelmente homólogas as do *P. falciparum*, desempenhando um papel similar na invasão do tecido do hospedeiro, além de facilitar o estudo de moléculas em ambos os hospedeiros vertebrado e vetor.

6 CONCLUSÕES

- O promotor da vitelogenina utilizado na construção dos mosquitos transformados foi ativado após repasto sanguíneo, ativando a expressão do transgene.
- A expressão do gene marcador foi semelhante à de outras linhagens transgênicas descritas na literatura.
- O perfil de transcrição do transgene foi semelhante ao do gene endógeno de vitelogenina.
- A redução na quantidade de esporozoítas presentes nas glândulas salivares variou entre as quatro linhagens estudadas. A maior redução foi obtida com a linhagem **PM2**.
- O *fitness* dos mosquitos transgênicos da linhagem **PM2** não foi alterado pela inserção do transgene quando comparado com mosquitos não transformados.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAM, E. G.; DONNELLY-DOMAN, M.; FUJIOKA, H., GHOSH, A.; MOREIRA, L.; JACOBS-LORENA, M. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. **Insect. Mol. Biol.**, v. 14, p. 271-279, 2005.

ADELMAN, Z. N.; ANDERSON, M. A. E.; MORAZZANI, E. M.; MYLES, K. M. A transgenic sensor strain for monitoring the RNAi pathway in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p. 705-713, 2008.

ADELMAN, Z. N.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A. Development and applications of transgenesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 121, p. 1-10, 2002.

ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 121, p. 173-178, 2002.

ALPHEY, L.; BENEDICT, M.; BELLINI, R.; CLARK, G. G.; DAME, D. A.; SERVICE, M. W.; DOBSON, S. L. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector-Borne Zoonot.**, v. 10, p. 295-311, 2010.

ALPHEY, N.; BONSALE, M. B.; ALPHEY, L. Modeling resistance to genetic control of insects. **J. Theor. Biol.**, v. 270, p. 42-55, 2011.

ALY, A. S. I.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 63, p. 195-221, 2009.

AMENYA, D. A.; BONIZZONI, M.; ISAACS, A. T.; JASINSKIENE, N.; CHEN, H.; MARINOTTI, O.; YAN, G.; JAMES, A. A. Comparative fitness assessment of *Anopheles stephensi* transgenic lines receptive to site-specific integration. **Insect. Mol. Biol.**, v. 19, p. 263-269, 2010.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE. Malaria Vector Control in Africa: Strategies and Challenges. 2001. Disponível em: <<http://www.aaas.org/international/africa/malaria/toure>> Acesso em: 17 Dec. 2010.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMSTERDAM, A.; LIN, S.; HOPKINS, N. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. **Dev. Biol.**, v. 171, p. 123-129, 1995.

ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G. L.; STEHMANN, J. R.; OLIVEIRA, L. A.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 87, p. 253-256, 2003.

ARAUJO, R. V.; MACIEL, C.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **J. Insect Physiol.**, v. 57, p. 265-273, 2011.

ARRIGHI, R. G.; NAKAMURA, C.; MIYAKE, J.; HURD, H.; BURGESS, G. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malaras. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 46, p. 2104-2110, 2002.

ATKINSON, M. P.; SU, Z.; ALPHEY, N.; ALPHEY, L. S.; COLEMAN, P. G.; WEI, L. M. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. **PNAS**, v. 104, p. 9540-9545, 2007.

ATKINSON, P. W.; PINKERTON, A. C.; O'BROCHITA, D. A. Genetic transformation systems in insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 46, p. 317-346, 2001.

ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 661-675, 2005.

BEARD, C. B.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R. V. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 123-141, 2002.

BIAN, G.; SHIN, S. W.; CHEON, H. M.; KOKOZA, V.; RAIKHEL, A. S. Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. **PNAS**, v. 102, p. 13568-13573, 2005.

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induce resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. 1-10, 2010.

BILLKER, O.; SHAW, M. K.; MARGOS, G.; SINDEN, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* *in vitro*. **Parasitol.**, v. 114, p. 1-7, 1996.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature**, v. 3, p., 238-250, 2005.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMAN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, p. 329-344, 1999.

CAMARGO, E. P. A malaria encenada no grande teatro social. **Est. Avan.**, v. 9, n. 24, p. 211-228, 1995.

CAMARGO, E. P. Malária, maleita, paludismo. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 26-30, 2003.

CAPURRO, M. L.; COLEMAN, J.; BEERNTSEN, B. T.; MYLES, K. M.; OLSON, K.E. Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 427-433, 2000.

CARRERA, M. **Insetos de interesse médico e veterinário**. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1991.

CARTER, R. Transmission blocking malaria vaccines. **Vaccine**, v.19, p. 2309-2314, 2001.

CARTER, V.; HURD, H. Choosing anti-*Plasmodium* molecules for genetically modifying mosquitoes: focus on peptides. **Trends. Parasitol.**, v. 26, p. 582-590, 2010.

CATTERUCCIA, F.; GODFRAY, H. C. J.; CRISANTI, A. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Science**, v. 299, p. 1225-1227, 2003.

CARY, L. C.; GOEBEL, M.; CORSARO, B. G.; WANG, H. G.; ROSEN, E.; FRASER, M. J. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. **Virology**, v. 172, p. 156-169, 1989.

CATTERUCCIA, F.; BENTON, J. P.; CRISANTI, A. An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, p. 1414-1417, 2005.

CATTERUCCIA, F.; CRISANTI, A.; WIMMER, E. A. Transgenic technologies to induce sterility. **Malaria J.**, v. 8, p. 1-8, 2009.

CATTERUCCIA, F.; NOLAN, T.; BLASS, C.; MÜLLER, H. M.; CRISANTI, A.; KAFATOS, F. C.; LOUKERIS, T. G. Toward Anopheles transformation: Minos element activity in anopheline cells and embryos. **PNAS**, v. 97, p. 2157-2162, 2000a.

CATTERUCCIA, F.; NOLAN, T.; LOUKERIS, T. G.; BLASS, C.; SAVAKIS, C.; KAFATOS, F. C.; CRISANTI, A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. **Nature**, v. 405, p. 959-962, 2000b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **World Malaria Report 2009**. 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/features/world_malaria_report_2009> Acesso em: 16 Dec. 2010.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHERF, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University, 1998. 770 p.

CHRISTOPHIDES, G. K. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 325-333, 2005.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes**. Londres: Chapman & Hall, 1992. v. 1, 509 p.

COATES, C. J.; JASINSKIENE, N.; POTT, G. B.; JAMES, A. A. Promoter-directed expression of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of *Hermes*-transformed *Aedes aegypti*. **Gene**, v. 226, p. 317-325, 1998.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 712 p.

CORBY-HARRIS, V.; DREXLER, A.; DE JONG, L. W.; ANTONOVA, Y.; PAKPOUR, N.; ZIEGLER, R.; RAMBERG, F.; LEWIS, E. E.; BROWN, J. M.; LUCKHART, S.; RIEHLE, M. A.

Activation of *Akt* signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1-10, 2010.

COUTINHO-ABREU, I. V.; ZHU, K. Y.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: Current status and future challenges. **Parasitol. In.**, v. 59, p. 1-8, 2010b.

COUTINHO-ABREU, I.V.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases- A review. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 1-12, 2010a.

EDWARDS, M. J.; LEMOS, F. J.; DONNELLY-DOMAN, M.; JACOBS-LORENA, M. Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, p. 1063-1072, 1997.

EDWARDS, M. J.; MOSKALYK, L. A.; DONNELLY-DOMAN, M.; VLASKOVA, M.; NORIEGA, F. G.; WALKER, V. K.; JACOBS-LORENA, M. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 9, p. 33-38, 2000.

ESTEVEES, E.; FOGAÇA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 33, p. 913-919, 2009.

FINOKIET, M., GONI, B., LORETO, E.L.S. Genetic transformation of *Drosophila willistoni* using *piggyBac* transposon and GFP. **Braz Arch Biol Techn**, v. 50, p. 113-120, 2007.

FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p. 191-200, 2003.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 2002.

FRANZ, G.; SAVAKIS, C. Mimos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc1-like family of transposons. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 6646, 1991.

FUGLSANG, A. Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization. **Protein Express Purif.**, v. 31, p. 247-249, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_11.pdf> Acesso em: 14 dez. 2010.

GARCIA, G. E.; WIRTZ, R. A.; BARR, J. R.; WOOLFITT, A.; ROSENBERG, R. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 12003-12005, 1998.

GHOSH, A. K.; RIBOLLA, P. E. M.; JACOBS-LORENA, M. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. **PNAS**, v. 98, p. 13278-13281, 2001.

GHOSH, A.; EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 196-201, 2000.

GODWIN, A. R.; STADLER, H. S.; NAKAMURA, K.; CAPECCHI, M. R. Detection of targeted GFP-Hox gene fusions during mouse embryogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 13042-13047, 1998.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Malaria Vaccine Design: Immunological Considerations. **Immunity**, v. 33, p. 555-566, 2010.

GROSSMAN, G. L.; RAFFERTY, C. S.; CLAYTON, J. R.; STEVENS, T. K.; MUKABAYIRE, O.; BENEDICT, M. Q. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. **Insect Mol. Biol.**, v. 10, p. 597-604, 2001.

GWADZ, R. W.; KASLOW, D.; LEE, J. Y.; MALOY, W. L.; ZASLOFF, M.; MILLER, L. H. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 2628-2633, 1989.

HORN, C.; SCHMID, B. G. M.; POGODA, F. S.; WIMMER, E. A. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. **Insect Biochem. Molec.**, v. 32, p. 1221-1235, 2002.

HORN, C.; WIMMER, E. A. A versatile vector set for animal transgenesis. **Dev. Genes Evol.**, v. 210, p. 630-637, 2000.

IRVIN, N.; HODDLE, M. S.; O'BROCHTA, D. A.; CAREY, B.; ATKINSON, P. T. Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. **PNAS**, v. 101, p. 891-896, 2004.

ITO, J.; GHOSH, A.; MOREIRA, L. A.; WIMMER, E. A.; JACOBS-LORENA, M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. **Nature**, v. 417, p. 452-455, 2002.

JASINSKIENE, N.; COATES, C. J.; BENEDICT, M. Q.; CORNEL, A. J.; RAFFERTY, C. S.; JAMES, A. A.; COLLINS, F. H. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 3743-3747, 1998.

JASINSKIENE, N.; COLEMAN, J.; ASHIKYAN, A.; SALAMPESSY, M.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. Genetic control of malaria parasite transmission: threshold level for infection in an avian model system. **Am. J. Tro. Med. Hyg.**, v. 76, p. 1072-1078, 2007.

JIN, C.; REN, X.; RASGON, J. L. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 3373-3376, 2009.

JONES, M. K.; GOOD, M. F. Malaria parasites up close. **Nat. Med.**, v. 12, p. 170-171, 2006.

KAPPE, S. H. I.; BUSCAGLIA, C. A.; NUSSENZWEIG, V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 20, p. 29-59, 2004.

KAROU, D.; DICKO, M. H.; SANON, S.; SIMPORE, J.; TRAORE, A. S. Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. F. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, p. 291-294, 2003.

KIM, W.; KOO, H.; RICHMAN, A. M.; SEELEY, D.; VIZIOLI, J.; KLOCKO, A. D.; O'BROCHTA, D. A. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. **J. Med. Entomol.**, v. 41, p. 447-455, 2004.

KOJIN, B.B. **Análise da expressão de regiões da proteína circunsporozoíta de *Plasmodium* SP. em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.** 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

KOKOZA, V.; AHMED, A.; CHO, W. L.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; RAIKHEL, A. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **PNAS**, v. 97, p. 9144-9149, 2000.

KOKOZA, V.; AHMED, A.; SHIN, S. W.; OKAFOR, N.; ZOU, Z.; RAIKHEL, A. S. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **PNAS**, v. 107, p. 8111-8116, 2010.

KOKOZA, V.; AHMED, A.; WIMMER, E. A.; RAIKHEL, A. S. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. **Insect Biochem. Molec.**, v. 31, p. 1137-1143, 2001.

KRETTLI, A. U.; ANDRADE-NETO, V. F.; BRANDÃO, M. G.; FERRARI, W. M. S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat and malaria or plants randomly selected: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1033-1042, 2001.

LACRUE, A. N. **Characterization of the sporozoite and erythrocytic stages (SES) protein**. 2007. 143 p. Tese (Doutorado) - Faculdade da Escola de Pós-Graduação, Universidade de Missouri-Columbia, Columbia, 2007.

LAMAZIÈRE, A.; BURLINA, F.; WOLF, C.; CHASSAING, G.; TRUGNAN, G.; AYALA-SANMARTIN, J. Non-metabolic membrane tubulation permeability induced bioactive peptides. **PLoS One**, v. 2, p. 1-11, 2007.

LI, C.; MARRELLI, M. T.; YAN, G.; JACOBS-LORENA, M. Fitness of Transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the SM1 peptide under the control of a vitellogenin promoter. **J. Hered.**, v. 99, p. 275-282, 2008.

LITHWICK, G.; MARGALIT, H. Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation. **Genome Res.**, v. 13, p. 2665-2673, 2003.

LOBO, N. F.; HUA-VAN, A.; LI, X.; NOLEN, B. M.; FRASER JR, M. J. Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a *piggyBac* vector. **Insect Mol. Biol.**, v. 11, p. 133-139, 2002.

LOUKERIS, T. G.; LIVADARAS, I.; ARCA, B.; ZABALOU, S.; SAVAKIS, C. Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. **Science**, v. 270, p. 2002-2005, 1995.

MACIEL, C.; DE OLIVEIRA JUNIOR, V. X.; FÁZIO, M. A.; NACIF-PIMENTA, R.; MIRANDA, A.; PIMENTA, P. F. P.; CAPURRO, M. L. Anti-*Plasmodium* activity of Angiotensin II and related synthetic peptides. **PLoS One**, v. 3, p. 1-8, 2008.

MARSHALL, J. M.; PITTMAN, G. W.; BUCHMAN, A. B.; HAY, B. A. Semele: A killer-male, rescue-female system for suppression and replacement of insect disease vector populations. **Genet.**, 2010, doi:10.1534/genetics.110.124479.

MATSUOKA, H.; IKEZAWA, T.; HIRA, M. Production of a transgenic mosquito expressing circumsporozoite protein, a malarial protein, in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Acta. Med. Okayama**, v. 64, p. 233-241, 2010.

MATZ, M. V.; FRADKOV, A. F.; LABAS, Y. A.; SAVITSKY, A. P.; ZARAIISKY, A. G.; MARKELOV, M. L.; LUKYANOV, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 969-973, 1999.

MCCLINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. **Genetics**, v. 36, p. 344-355, 1950.

MCCUTCHAN, T. F.; KISSINGER, J. C.; TOURAY, M. G.; ROGERS, M. J.; LI, J.; SULLIVAN, M.; BRAGA, E. M.; KRETTLI, A. U.; MILLER, L. H. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites: biological and phylogenetic implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 11889-11894, 1996.

MCGRANE, V.; CARLSON, J. O.; MILLER, B. R.; BEATY, B. J. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* OVA and detection of integration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, p. 502-510, 1988.

MEDHORA, M., MARUYAMA, K., HART, D.L. Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mosl* in *Drosophila*. **Genet.**, v. 128, p. 311-318, 1991.

MENGE, D. M.; GUDA, T.; ZHONG, D.; PAI, A.; ZHOU, G.; BEIER, J. C.; GOUAGNA, L.; YAN, G. Fitness consequences of *Anopheles gambiae* population hybridization. **Malaria J.**, v. 4, p. 1-7, 2005.

MEREDITH, J. M.; BASU, S.; NIMMO, D. D.; LARGET-THIERY, I.; WARR, E. L.; UNDERHILL, A.; MCARTHUR, C. C.; CARTER, V.; HURD, H.; BOURGOUIN, C.; EGGLESTON, P. Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic *Anopheles gambiae* significantly reduces *Plasmodium* infections. **PLoS One**, v. 6, p. 1-9, 2011.

MILLER, L. H.; SAKAI, R. K.; ROMANS, P.; GWADZ, R. W.; KANTOFF, P.; COON, H. G. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 14, p. 779-781, 1987.

MIRANDA, C. M. **Angiotensina II e peptídeos relacionados são ativos contra esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum***. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MOREIRA, C. K.; RODRIGUES, F. G.; GHOSH, A.; VAROTTI, F. P.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; JACOBS-LORENA, M.; MOREIRA, L. A. Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. **Exp. Parasitol.**, v. 116, p. 346-353, 2007.

MOREIRA, L.; WANG, J.; COLLINS, F. H.; JACOBS-LORENA, M. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. **Genetics Society**, v. 166, p. 1337-1341, 2004.

MOREIRA, L. A.; EDWARDS, M. J.; ADHAMI, F.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; JACOBS-LORENA, M. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 10895-10898, 2000.

MOREIRA, L. A.; GHOSH, A. K.; ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 1599-1605, 2002b.

MOREIRA, L. A.; ITO, J.; GHOSH, A.; DEVENPORT, M.; ZIELER, H.; ABRAHAM, E. G.; CRISANTI, A.; NOLAN, T.; CATTERUCCIA, F.; JACOBS-LORENA, M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 40839-40843, 2002a.

NIRMALA, X.; JAMES, A. A. Engineering *Plasmodium*-refractory phenotypes in mosquitoes. **Trends. Parasitol.**, v. 19, p. 384-387, 2003.

NIRMALA, X.; MARINOTTI, O.; SANDOVAL, J. M.; PHINA, S.; GAKHARB, S.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene,

AsVg1, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. **Insect Biochem. Molec.**, v. 36, p. 694-700, 2006.

NOLAN, T.; BOWER, M.; BROWN, A. E.; CRISANTI, A.; CATTERUCCIA, F. *piggyback*-mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein dsRED as a selectable marker. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8759-8762, 2002.

O'BROCHTA, D. A.; SETHURARAMAN, N.; WILSON, R.; HICE, R. H.; PINKERTON, A. C.; LEVESQUE, C. S.; BIDESHI, D. K.; JASINSKIENE, N.; COATES, C. J.; JAMES, A. A.; LEHANE, M. J. M.; ATKINSON, P. W. Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3823-3834, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JACOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; POVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines-Part I- Alkaloids. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, p. 715-740, 2009.

OLIVEIRA, F. Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A. U.; BRANDÃO, M. G. L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 39-42, 2004.

PERERA, O. P.; HARRELL II, R. A.; HANDLER, A. M. Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a *piggyBac/EGFP* transposon vector is routine and highly efficient. **Insect Mol. Biol.**, v. 11, p. 291-297, 2002.

PINKERTON, A. C.; MICHEL, K.; O'BROCHTA, D. A.; ATKINSON, P. W. Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 9, p. 1-10, 2000.

PLAUTZ, J. D.; DAY, R. N.; DAILEY, G. M.; WELSH, S. B.; HALL, J. C.; HALPAIN, S.; KAY, S. A. Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. **Genes**, v. 173, p. 83-87, 1996.

PUIGBÒ, P.; GUZMA, E.; ROMEU, A.; GARCIA-VALLVE, S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. **Nucleic Acids. Res.**, v. 35, p. 1-6, 2007.

RAIKHEL, A. S.; DAHDIALA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S.; KOKOVZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WNG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1275-1286, 2002.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 350 p.

RIEHLE, M. A.; SRINIVASAN, P.; MOREIRA, C. K.; JACOBS-LORENA, M. Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3809-3816, 2003.

RIEHLE, M. M.; MARKIANOS, K.; NIARE, O.; XU, J.; LI, J.; TOURÉ, A. M.; PODIOUGOU, B.; ODUOL, F.; DIAWARA, S.; DIALLO, M.; COULIBALY, B.; QUATARA, A.; KRUGLYAK, L.; TRAORÉ, S. F.; VERNICK, K. D. Natural malaria infection in *Anopheles gambiae* is regulated by a single genomic control region. **Science**, v. 312, p. 577-579, 2006.

RODRIGUES, D. G. **Efeito de peptídeos antimicrobianos em esporozoítas de *Plasmodium gallinaceum***. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, F. G.; SANTOS, M. N.; DE CARVALHO, T. X.; ROCHA, B. C.; RIEHLE, M. A.; PIMENTA, P. F.; ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M.; ALVES DE BRITO, C. F.; MOREIRA, L. A. Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. **Insect Mol. Biol.**, v. 17, p. 175-183, 2008.

RODRIGUEZ, M. D. C.; ZAMUDIO, F.; TORRES, J. A.; CERON, L. G.; POSSANI, L. D.; RODRIGUEZ, M. H. Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. **Exp. Parasitol.**, v. 80, p. 596-604, 1995.

RUBIN, G. M.; SPRADLING, A. C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. **Science**, v. 218, p. 348-353, 1982.

RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A. L.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **J. Ethnopharmacol.** 2010. doi:10.1016/j.jep.2010.10.039.

RYDER, E.; RUSSEL, S. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*. **Brief. Funct. Genomic. Proteomic.**, v. 2, p. 57-71, 2003.

SHAHABUDDIN, M.; FIELDS, I.; BULET, P.; HOFFMANN, J. A.; MILLER, L. H. *Plasmodium gallinaceum*: Differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. **Exp. Parasitol.**, v. 89, p. 103-112, 1998.

SHEG, G.; THOUVENOT, E.; SCHUCKER, D.; WILSON, D. S.; DESPLAN, C. Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. **Gene Dev.**, v. 11, p. 1122-1131, 1997.

SHERMAN, I. W. Malarial lipids. In: _____. **A Brief History of Malaria and Discovery of the Parasite's Life Cycle, in Malaria**: parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington: ASM PRESS, 1998. p. 159-175.

SHIN, S. W.; KOKOZA, V. A.; RAIKHEL, A. S. Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3835-3843, 2003.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C. P.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 34735-34746, 2009.

SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 425-433, 2007.

SRINIVASAN, P.; ABRAHAM, E. G.; GHOSH, A. K.; VALENZUELA, J.; RIBEIRO, J. M. C.; DIMOPOULOS, G.; KAFATOS, F. C.; ADAMS, J. H.; FUJIOKA, H.; JACOBS-LORENA, M. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 5581-5587, 2004.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, **Controle integrado**. 2009. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/down/vetores_geral/den_contri.pdf> Acesso em: 17 dez. 2010.

TERENIUS, O.; MARINOTTI, O.; SIEGLAFF, D.; JAMES, A. A. Molecular genetic manipulation of vector mosquitoes. **Cell. Host. Microbe.**, v. 4, p. 417-423, 2008.

THOMAS, D. D.; DONNELLY, C. A.; WOOD, R. J.; ALPHEY, L. S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science**, v. 287, p. 2474-2476, 2000.

WATERHOUSE, R. M.; KRIVENTSEVA, E. V.; MEISTER, S.; XI, Z.; ALVAREZ, K. S.; BARTHOLOMAY, L. C.; BARILLAS-MURY, C.; CHRISTENSEN, B. M.; DONG, Y.; JIANG, H.; KANOST, M. R.; KOUTSOS, A. C.; LEVASHINA, E. A.; LI, J.; LIGOSYGAKIS, O.; MACCALLUM, R. M.; MAYTHEW, G. F.; PASKEWITZ, S.; SHIN, S. W.; VLACHOU, D.; WNAG, L.; WEI, W.; ZHENG, L.; ZOU, Z.; SEVERSON, D. W.; RAIKHEL, A. S.; KAFATOS, F. C.; DIMOPOULOS, G.; ZDOBNOV, E. M.; CHRISTOPHIDES, G. K. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. **Science**, v. 316, p. 1738-1743, 2007.

WATERS, A. P.; HIGGINS, D. G.; MCCUTCHAN, T. F. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 3140-3144, 1991.

WEBSTER, D. Malaria kills one child every 30 seconds. **J. Public Health Policy**, v. 22, p. 23-33, 2001.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1084-1092, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health Topics**. 2010. Disponível em: <<http://www.new.paho.org/hq>> Acesso em: 08 Dec. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media Center**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacenter/factsheets>> Acesso em: 13 Dec. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2008**. 2008. Disponível em: [tp://www.who.int/malaria/wmr2008](http://www.who.int/malaria/wmr2008)> Acesso em: 08 Dec. 2010.

YOSHIDA, S.; MATSUOKA H.; LUO E.; IWAI, K.; ARAI, M.; SINDEN, R. E.; ISHII, A. A single-chain antibody fragment specific for the *Plasmodium berghei* ookinete protein Pbs21 confers transmission blockade in the mosquito midgut. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, p. 195-204, 1999.

YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDOH, D.; KOUZUMA, Y.; GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDEN, R. Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 1962-1970, 2007.

YOSHIDA, S.; WATANABE, H. Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, p. 403-410, 2006.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZIELER, H.; KEISTER, D. B.; DVORAK, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. A snake venom phospholipase A2 blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. **J. Exp. Biol.**, v. 204, p. 4157-4167, 2001.