DANILO DE OLIVEIRA CARVALHO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM
TRANSGÊNICA DE *Aedes aegypti* MACHOS
GENETICAMENTE ESTÉREIS**

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

São Paulo
2016

DANILO DE OLIVEIRA CARVALHO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM
TRANSGÊNICA DE *Aedes aegypti* MACHOS
GENETICAMENTE ESTÉREIS**

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro-Guimarães

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Carvalho, Danilo de Oliveira.

Obtenção e caracterização de linhagem transgênica de *Aedes aegypti* de machos geneticamente estereis / Danilo de Oliveira Carvalho. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Mosquitos geneticamente modificados.

Versão do título para o inglês: Obtention and characterization of transgenic line of *Aedes aegypti* for genetically sterile males.

1. *Aedes* 2. Transgênico 3. Esteril 4. Supressão I. Guimarães, Prof. Dr. Margareth de Lara Capurro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia III. Título.

ICB/SBIB062/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Danilo de Oliveira Carvalho.

Título da Tese: Obtenção e caracterização de linhagem transgênica de *Aedes aegypti* de machos geneticamente estereis.

Orientador(a): Prof. Dr. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p align="center">UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p align="center">Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Linus Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cepatich.usp.br</p> <p align="center">COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.029/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo aos Certificados 186, 187 e 188/12/CEUA, datados de 03.12.12 e por solicitação da Profa. Dra. **Margareth de Lara Capurro-Guimarães**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Danilo de Oliveira Carvalho** ao Projeto de Pesquisa "*Mosquitos transgênicos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de abril de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Dedico esse trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À professora Margareth, pelo auxílio, orientação e discussão e por mais uma vez confiar em mim.

À todos os ex-alunos, alunos e técnicos do laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados, pelo apoio, discussões, auxílio e toda a convivência que pude desfrutar.

À CAPES pelo pequeno apoio financeiro

*“Imagination is more important than knowledge.
Knowledge is limited. Imagination encircles the world.”*

Albert Einstein

RESUMO

CARVALHO, D. O. **Obtenção e caracterização de linhagem transgênica de *Aedes aegypti* machos geneticamente estéreis**. 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Com o aumento progressivo do número de casos de infecção por diferentes arbovírus, por exemplo, dengue, zica e chikungunya, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas para o controle da transmissão desses patógenos. A manipulação genética possibilitou a obtenção de mosquitos geneticamente modificados que sejam capazes de suprimir a população selvagem ou impedir a transmissão de agentes etiológicos gerando doenças. O estudo teve como objetivo o estabelecimento de linhagens geneticamente estéreis de *Aedes aegypti*. A construção gênica foi elaborada para fornecer esterilidade condicionada aos machos na presença ou ausência de antibiótico no meio em que esses mosquitos se desenvolvem durante a fase larval. Foram obtidas seis linhagens transgênicas, onde cinco apresentam amplificação do cDNA do fragmento desejado. Entre essas linhagens apenas duas apresentaram diferença significativa no desafio de esterilidade com redução da fertilidade em 38,7% e 62,3%. Dessa forma, sem a necessidade de se utilizar radiação para obter insetos estéreis, é possível melhorar a qualidade dos machos adultos liberados e aumentar a competitividade dos mesmos em competir por fêmeas selvagens e adicionalmente gerar o desejado quadro de supressão populacional.

Palavras-chave: Esterilidade condicional. *Aedes aegypti*. Supressão populacional. Transgênico.

ABSTRACT

CARVALHO, D. O. **Obtention and characterization of transgenic lines of *Aedes aegypti* for males genetically sterile**. 2016. 101 p. Ph.D. thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The increasing number of cases of infection by different arboviruses, for instance dengue, chikungunya and zika, it is necessary to develop new techniques for controlling the transmission of these pathogens. The genetic manipulation allows the obtention of genetically modified mosquitoes that are capable of suppressing the wild population or prevent the transmission of etiological agents causing diseases. The study aimed to establish genetically sterile strains of *Aedes aegypti*. The genetic construct is designed to provide conditional sterility to males in the presence or absence of antibiotic in the environment where these mosquitoes develop during the larval stage. Six transgenic lines were obtained, where five have amplification of the desired fragment of cDNA. Among these strains only two showed a significant difference in the challenge of sterility with reduced fertility of 38.7% and 62.3%. Thus, without the need to use radiation for sterile insects, it is possible to improve the quality of released adult males and increase the competitiveness of the same to compete with wild females and additionally generate the desired frame population suppression.

Keywords: Conditional sterility. *Aedes aegypti*. Population suppression. Transgenic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 01 -	Esquema do transgene LA513 da linhagem OX513A de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 02 -	Representação do sistema da letalidade condicional	22
Figura 03 -	Esquema do modelo de liberação de machos geneticamente estéreis	25
Figura 04 -	Esquema de obtenção e alinhamento de ovos de <i>Ae. aegypti</i>	33
Figura 05 -	Microinjeção em ovos embrionados de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 06 -	Aparelho reprodutor masculino de mosquito macho da espécie <i>Aedes aegypti</i>	42
Figura 07 -	Esquematização do processo de inserção genômica via elemento de transp (...)	43
Figura 08 -	Comparação entre indivíduos transgênicos e selvagens de acordo com a (...)	45
Figura 09 -	Perfil transcricional dos genes de $\beta 2$ -tubulina e actina em diferentes fases (...)	49
Figura 10 -	Mapa da construção do plasmídeo de transformação para <i>Aedes aegypti</i> (...)	58
Figura 11 -	Alinhamento entre as sequências de michelob_x transgênica e endógena (...)	60
Figura 12 -	Mapa da construção do plasmídeo de transformação para <i>Aedes aegypti</i> (...)	60
Figura 13 -	Perfil de transcrição do gene de actina, $\beta 2$ -tubulina emichelob_x (...)	63

GRÁFICOS

Gráfico 01 -	Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem (...)	67
Gráfico 02 -	Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem (...)	68
Gráfico 03 -	Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem (...)	69
Gráfico 04 -	Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem (...)	70
Gráfico 05 -	Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem (...)	71
Gráfico 06 -	Taxa de eclosão entre as linhagens transgênica e a linhagem controle	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Sequência, temperatura e fragmento amplificado dos iniciadores (<i>primers</i>) (...)	40
Tabela 02 -	Frequência de uso de códons em <i>Aedes aegypti</i>	46
Tabela 03 -	Classificação das enzimas de restrição com número de corte no genoma (...)	53
Tabela 04 -	Classificação das endonucleases do catálogo NEB de acordo com o número (...)	57
Tabela 05 -	Detalhamento dos lotes de microinjeção e obtenção de linhagens transgênicas	61
Tabela 06 -	Porcentagem de larvas transgênicas durante seleção de indivíduos com (...)	66
Tabela 07 -	Linhagens transgênicas em relação ao número total e médio de ovos e larvas	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Endonuclease	25
1.2 Antagonista de Inibidor de Apoptose.....	27
2 OBJETIVO	29
2.1 Geral	29
2.2 Específico	29
3 MATERIAL E MÉTODO.....	30
3.1 Colônia de <i>Aedes aegypti</i> – Higgs (<i>White-eyes</i>).....	30
3.2 Análises <i>in silico</i>	31
3.3 Microinjeção	31
3.3.1 Solução de Microinjeção	31
3.3.1.1 Transformação de célula competente e amplificação de DNA de plasmídeo.....	32
3.3.1.2 Preparo da Solução de Injeção	32
3.3.1.3 Microinjeção de ovos embrionados	33
3.4 Obtenção de linhagem transgênica.....	35
3.4.1 Seleção de cruzamentos parentais portadores da construção transgênica	36
3.4.2 Linhagem em homozigose	37
3.5 Caracterização molecular das linhagens transgênicas	37
3.5.1 Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR)	37
3.5.2 Eletroforese de DNA.....	39
3.6 Processo de dissecação de aparelho reprodutor masculino.....	40
3.7 Desafio de Esterilidade.....	41
3.8 Análise dos resultados	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Elementos das construções transgênicas.....	44
4.1.1 Elemento regulador	47
4.1.2 Sistema condicional de expressão	49
4.1.3 Moléculas Efetoras.....	50
4.2 Endonuclease – <i>Cvi</i>All.....	51
4.2.1 Sinal de Localização Nuclear	59
4.3 Antagonista de IAP – Michelob_x.....	59

4.3.1 Microinjeção da construção de <i>pMos_3XP3_DsRed_Mx_SCC</i> em ovos embrionados.....	61
4.3.2 Caracterização molecular.....	62
4.3.3 Linhagem homozigótica.....	65
4.3.4 Desafio de Esterilidade.....	66
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS*	77
ANEXO I.....	85

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de serem infectadas por arboviroses, como dengue, chikungunya e zica. A incidência dessas doenças aumentou por volta de 30 vezes nos últimos 50 anos e somente para dengue há uma estimativa entre 50 e 100 mil novos casos todos os anos. A mesma organização afirma que o valor gasto para o tratamento da doença pode alcançar US\$ 2 bilhões anuais em áreas endêmicas (MASSAD; COUTINHO, 2011; WHO, 2009).

No âmbito nacional, a dengue é tida como a principal enfermidade transmitida por vetores, e o Brasil sendo apontado como responsável por mais de 60% dos casos reportados em todo continente Americano (ROMANO et al., 2010). O quadro se agrava com a ausência de vacinas eficazes simultaneamente contra os quatro sorotipos virais e também pela falta de medicação específica que combata o vírus. Assim, apenas medicação paliativa para o combate dos sintomas está disponível à população, bem como assistência médica para os casos graves. Em 30 de julho de 2010, após 20 anos, foi registrada a reintrodução do sorotipo 4 no país, pela cidade de Boa Vista (RR) através de um caso autóctone seguido de mais 11 casos confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a; TEMPORAO et al., 2011). Atrelado a grande dispersão em todo país que o vetor possui no território nacional, e que uma grande parte da população esteve fora do alcance deste sorotipo, esses fatores apontam para um aumento significativo no número de casos dessa doença no decorrer dos próximos anos. Nesse panorama, a estratégia de controle da dengue tem o mosquito vetor como principal alvo (GUBLER, 2004; GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b; WHO, 2009, 2010).

A dengue é causada por um vírus de RNA de fita simples que pertence ao gênero *Flavivirus* (Família Flaviviridae). Ele possui quatro sorotipos muito similares (DENV 1-4) classificados de acordo com critérios bio e imunológicos (GURUGAMA et al., 2010). O ciclo da doença se inicia quando uma fêmea (infectada com o vírus) do mosquito transmissor realiza um repasto sanguíneo em humano sadio, transmitindo o vírus para o hospedeiro vertebrado no momento em que a fêmea inocula saliva; assim o hospedeiro vertebrado passa a amplificar partículas virais viáveis e o ciclo se completa quando outra fêmea do mosquito (não infectada) realiza repasto sanguíneo neste humano enfermo. O repasto sanguíneo deve ser realizado o período de viremia. E a fêmea somente estará apta a transmitir o vírus quando realizar um novo repasto sanguíneo após o período de incubação extrínseco do vírus no vetor (WHO, 2009).

A espécie *Aedes aegypti* é designada a principal transmissora do vírus dengue em todo o mundo principalmente nas Américas. Essa é uma espécie de hábito altamente antropofílico e hematofágico. A ingestão de sangue (realizada exclusivamente pela fêmea e na fase adulta) é a principal fonte de nutrientes para o desenvolvimento dos ovos. A saliva do inseto, possui propriedades anticoagulantes para facilitar a ingestão de sangue e convenientemente facilita também o acesso do vírus aos tecidos (SCHNEIDER; HIGGS, 2008).

O ciclo de vida deste inseto se inicia quando uma fêmea previamente copulada realiza a ingestão de sangue e depois de aproximadamente três dias está apta à depositar os ovos em um criadouro. O desenvolvimento larvário passa por quatro estádios larvais (L1-L4) que têm duração de aproximadamente dois dias cada um deles. As larvas possuem hábito de revolver o fundo do criadouro e se alimentam por um processo filtrante ingerindo detritos orgânicos (origem animal ou

vegetal) e micro-organismos (fungos, protozoários e bactérias). Ao completarem essa fase as larvas se tornam pupas, onde ocorre metamorfose (uma vez que se trata de organismo holometábolo) para a fase adulta. Assim, a pupa apenas realiza trocas gasosas, não se alimenta durante esse período de aproximadamente dois dias, e usa as reservas adquiridas durante a fase de larva para completar a transformação e posteriormente a emergência do adulto. Após a emergência das imagos, ambos gêneros sexuais necessitam de algumas horas para que ocorra o enrijecimento do exoesqueleto, e durante este período, os machos adultos sofrem a torção da genitália em ângulo de 180° para tornar a cópula possível. Diferentemente, as fêmeas adultas, após enrijecimento, estão aptas a copularem e realizarem repasto sanguíneo e a postura dos ovos. A fase adulta tem duração de 25 a 40 dias em condições laboratoriais, em campo esse período pode se encurtar por se tratar de condições mais extremas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 1996).

Os criadouros de *Ae. aegypti* caracterizam-se por um local ou recipiente capaz de armazenar água com baixo teor de matéria orgânica, seja de coloração variável, em local sombreado e que possa promover com sucesso o desenvolvimento das larvas. De forma geral os criadouros preferenciais são de origem artificial (qualquer material de origem industrial) e temporária (passam por períodos de estiagem) e que possam acumular água limpa e parada (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002).

O conhecimento do ciclo de vida deste inseto torna mais fácil encontrar estratégias para combater o vetor, que em geral são atividades preventivas com medidas fundamentadas no manejo integrado e têm como base ações de controle biológico, mecânico e químico. No Brasil, entre 2008 e 2009 foram utilizados mais de

110 milhões de reais para combater a dengue através de ações de combate ao vetor (SUAYA et al., 2009). Mesmo com o alto investimento, o manejo integrado em algumas situações não é suficiente ou não é bem conduzido e como resultado, ele não consegue lidar com a demanda. Dessa forma, acaba sendo uma estratégia pouco eficaz, que se agrava com a falta de conscientização por parte da população humana, contribuindo para a prevalência do vetor e da doença no ambiente (MACORIS et al., 1999; TAUIL, 2002).

A principal estratégia usada contra o vetor atualmente é o uso de inseticida. Essa atividade se intensificou com o uso do DDT (diclorodifeniltricloroetano , um organoclorado), carbamatos (propoxur), posteriormente organofosforados (malathion e temefós), e piretróides (deltametrina e cipermetrina) (MACORIS et al., 1999). O uso de temefós ainda é bastante intenso, entre os anos de 1997 e 2001 foram usados 33.833 kg, e esta quantia representou apenas 60% do total usado apenas durante o ano de 2003 (CARVALHO et al., 2004). Um estudo com modelagem sobre dengue apontou que a cidade do Rio de Janeiro, por exemplo, teria um aumento significativo, no período de dois anos, na prevalência de população de mosquitos que apresentam resistência à inseticidas (LUZ et al., 2011).

Com a constante pressão seletiva de populações de mosquitos resistentes, novas ferramentas foram e/ou estão em desenvolvimento para o controle vetorial dessa espécie. Uma delas faz uso da bactéria *Bacillus turingiensis israelensis*, ou Bti, como agente larvicida. Essa bactéria gram-negativa produz cristais tóxicos durante sua fase de esporulação, que ao entrarem em contato com o trato digestório das formas imaturas ocasionam a morte das larvas. Assim como para outros inseticidas, estudos científicos apresentam populações de *Ae. aegypti* resistentes as toxinas produzidas por Bti (CANTON et al., 2011; PARIS; DAVID; DESPRES, 2011;

PARIS et al., 2010). Luz e colaboradores apontam que deve haver uma modificação na política pública que rege a utilização de larvicidas para o controle vetorial, sendo necessário a inclusão e utilização de novas ferramentas (LUZ et al., 2011).

Um fator importante que influencia o desenvolvimento de novas ferramentas é a possibilidade do quadro atual se agravar devido a modificações no clima e no ambiente, que pode favorecer a expansão dessa espécie para outras regiões (CAMPBELL et al., 2015; MARDULYN et al., 2013). A evidente necessidade de se melhorar os métodos atuais de intervenções leva os pesquisadores a explorarem alternativas para o controle vetorial. Estas, por sua vez, devem ter caráter inovador, de abordagem diferencial e que possa complementar o programa de combate ao vetor atualmente utilizado. Assim, para cada localidade (município, estado ou união) será levada em consideração a aplicabilidade que resultará na escolha da melhor estratégia dependendo das características da região (ARAÚJO et al., 2015; HEMINGWAY et al., 2006). Uma das primeiras iniciativas de inovação no controle vetorial, remete ao início da década de 1960, onde tentativas de manipulação genética abriram espaço para se controlar pragas e vetores. Essa fase inicial fez uso de radiação ionizante ou quimioesterilizantes para provocar esterilidade em insetos. Mais recentemente, surge uma segunda fase posterior ao advento da técnica do DNA recombinante e a possibilidade de se realizar manipulação de genes propriamente dita (ASMAN; MCDONALD; PROUT, 1981; HAY et al., 2010; MEDLOCK et al., 2009).

A técnica do inseto estéril (*Sterile Insect Technique* - SIT) foi desenvolvida no início dos anos 50 por Edward F. Knipling (1909-2000) contra *Cochliomyia hominivorax* (mosca da bicheira), uma das principais pragas da pecuária mundial. Posteriormente, *Ceratitis capitata* (mosca do mediterrâneo) por se tratar de uma das

maiores pragas na fruticultura mundial (DYCK et al., 2005; KNIPLING, 1955; KNIPLING et al., 1968). Para ambas as espécies mencionadas, a técnica se mostrou extremamente eficiente causando a erradicação ou eliminação dessas pragas nas áreas que aplicaram a técnica. Por outro lado, inúmeras tentativas foram realizadas para o controle de culicídeos, usando a técnica do inseto estéril, mas houve dificuldades, e em especial para *Ae. aegypti*. Isso se deve à baixa resistência desse tipo de inseto em receber doses de radiação, comprometendo a viabilidade de utilização dessa técnica no combate do vetor. Estudos mostraram que mesmo reduzindo-se as doses, a fim de aumentar a longevidade e a aptidão da espécie, o número total de machos estéreis ou parcialmente esterilizados era significativamente menor, tornando a aplicação dessa técnica menos competitiva em relação aos métodos já empregados (BENEDICT, 2003; SMITH, 1967).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares para a manipulação de genes surgiram métodos capazes de fazer com que um organismo passasse a expressar uma característica predeterminada e desejada. Estes organismos geneticamente modificados (OGMs) podem ser utilizados no combate à doenças ou no controle populacional do próprio vetor. A utilização de OGMs tem aumentado nas últimas décadas por conta da especificidade que se pode obter através da modificação em relação ao método clássico de seleção fenotípica (COLLI, 2011).

A forma clássica de seleção fenotípica esta baseada na utilização de cruzamentos entre organismos da mesma espécie que possuem variação alélica da característica desejada, ou que use fatores mutagênicos (radiação ionizante por exemplo) para translocação. Da prole gerada destes inúmeros cruzamentos é realizada seleção dos indivíduos que apresentem uma ou mais das características de interesse. Por outro lado, esse tipo de técnica acaba por enfrentar uma infinidade

de variações resultantes que independentemente da espécie, pode levar muitos anos sem a obtenção do organismo com as principais características desejadas, ou então que apresentem características secundárias indesejadas (COLLI, 2011).

A manipulação do código genético trouxe inúmeras vantagens, incluindo a compreensão mais clara de processos de fisiologia e biologia de inúmeros organismos. Além disso, também trouxe avanços tecnológicos significativos para a produção e aquisição de compostos dificilmente obtidos por vias tradicionais, por exemplo, a produção de insulina, algumas vacinas, plantas enriquecidas por um determinado composto químico (vitaminas). Paralelamente, a área de controle de pragas, também está se beneficiando com organismos modificados, pois estes passam a ser portadores de gene(s) que dificulta a propagação de pragas e doenças. Em outras palavras, OGMs podem introduzir uma nova característica que se torne predominante na população – quadro de substituição populacional - ou gerando desequilíbrio ou colapso na espécie a qual pertencem, sendo capazes de reduzir o número de indivíduos ao longo do tempo – quadro de supressão populacional (ALPHEY et al., 2010; HARRIS et al., 2011; OLIVEIRA; CARVALHO; CAPURRO, 2011).

No que diz respeito a produção e incorporação desse organismos na sociedade, deve-se levar em consideração que existem pelo menos três tipos de inovação quando se trata de animais geneticamente modificados. A primeira classe trata de animais modificados criados para aumentar a eficiência de um produto; a segunda, agrega animais que competem com produtos já bem estabelecidos e a terceira classe, tem organismos inovadores que trazem novas aplicações não antes testadas (VÀZQUEZ-SALAT; HOUEBINE, 2013). Assim, mosquitos geneticamente modificados se encaixam tanto na segunda quanto na terceira classe, pois

competem/complementam a utilização e aplicação de inseticidas (e outros métodos de controle) e também por se tratar de uma estratégia inovadora nunca antes aplicada em campo em larga escala.

A primeira linhagem transgênica para controle populacional de *Ae. aegypti* (linhagem OX513A, Oxitec Ltd., Inglaterra) foi estabelecida em 2002 (PHUC et al., 2007) e testada em campo apenas em 2010 (HARRIS et al., 2012). Resumidamente, essa linhagem é portadora de um gene letal dominante, ou seja, organismos portadores dessa construção morrem antes de alcançarem a fase adulta. Todavia esse sistema apresenta condicionalidade, que na presença de um antibiótico, tetraciclina, os indivíduos sobrevivem, pois a molécula que causa toxicidade é desativada por possuir maior afinidade química pelo antibiótico; enquanto que na ausência dele o inseto acumula essa proteína causando uma desregulação transcricional levando a morte na fase tardia do estágio larval (L4).

Esta linhagem transgênica foi obtida a partir da linhagem Rockefeller que é conhecida como a linhagem referência para diversos tipos de estudos e também por ser suscetível a inseticidas (ARAÚJO et al., 2013). E o processo de obtenção se dá pela microinjeção em ovos embrionados de *Ae. aegypti* (COATES et al., 1998; JASINSKIENE; JUHN; JAMES, 2007; JASINSKIENE et al., 1998; MCGRANE et al., 1988). Como principal característica esta linhagem apresenta o sistema letal, e também um marcador genético. Essa marcação é promovida pela expressão da proteína vermelha fluorescente (DsRed2) (GROSS et al., 2000) sob regulação da sequência promotora de actina-5 (Act5c), resultando na expressão da fluorescência no exoesqueleto das larvas (PHUC et al., 2007). Esses dois elementos foram inseridos juntamente com o sistema letal. A presença dessa marcação é importante e possui duas funções, a primeira é marcar de forma irrefutável a linhagem

transgênica e a segunda é quanto ao monitoramento e avaliação do projeto quando em fase de liberação em campo, pois somente uma marcação eficiente facilita a identificação do mosquito modificado, o que gera economia no tempo de identificação com ampla margem de segurança (BEHURA, 2006; HOY, 2002).

A figura 01 apresenta o esquema do transgene LA513A que promove a mortalidade das larvas da linhagem OX513A e que foi microinjetado nos embriões da linhagem Rockefeller. Este transgene é constituído pelo sistema ativador de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV). A proteína tTAV, que é produto da sequência tTAV, se liga e ativa a expressão do elemento de resposta à tetraciclina (tRE), uma sequência que inclui cópias múltiplas da sequência específica de DNA a que o tTAV se liga, isso ativa a sequência tetO (*Tet-controler operon/promoter*). Que por sua vez promove a expressão exacerbada de tTAV por retroalimentação positiva (*feedback* positivo).

Figura 01 - Esquema do transgene LA513 da linhagem OX513A de *Aedes aegypti*

Utilizando o elemento de transposição piggyBac, os mosquitos transformados são identificados pela fluorescência DsRed2. Fonte: Phuc et. al. (2007).

A expressão em altos níveis de tTAV é deletéria às células dos mosquitos, pois modifica a taxa de transcrição normal das células (figura 02A). Assim, por ter caráter acumulativo, a letalidade somente ocorre nos estágios tardios das formas imaturas, L3, L4 e pupa, dessa forma o inseto não alcança a fase adulta. O gene é condicional, pois a proteína tTAV se liga à tetraciclina com maior afinidade, logo, o antibiótico atua como um interruptor e regula a expressão da construção. O que permite que o inseto alcance a fase adulta e complete seu ciclo de vida. Na ausência

de tetraciclina, a proteína tTAV induzirá a resposta de tRE, enquanto que na presença de tetraciclina esse processo é interrompido (figura 02B) (OLIVEIRA; CARVALHO; CAPURRO, 2011). A expressão basal de tTAV (independente do tetO) é também bloqueada por tetraciclina nos mosquitos transgênicos e não tem efeito detectável independente da fase de desenvolvimento (FU et al., 2007; FURTH et al., 1994; GONG et al., 2005; GOSSEN et al., 1994; LYCETT; KAFATOS; LOUKERIS, 2004; ZHANG et al., 2010).

Figura 02 - Representação do sistema da letalidade condicional

A letalidade condicional causada pelo acúmulo de tTAV em duas situações, a primeira na ausência de tetraciclina. (A) que induz a morte no mosquito, onde a proteína tTAV se liga ao elemento tRE produzindo tetO e por retroalimentação positiva modifica a taxa de transcrição normal das células e passa a ser deletério; ou na presença de tetraciclina (B) onde tTAV, por ter maior afinidade por tetraciclina que pelo elemento tRE, nessa condição a maquinaria letal é interrompida e o mosquito alcança a fase adulta. Fonte: Oliveira et al. (2011)

Embora a linhagem descrita acima pareça ideal e finalizada para aplicação no campo como ferramenta de controle, algumas adequações ainda precisam ser formuladas para que esta linhagem possa ser encarada como um produto final e adequado e, com isso, poder ser utilizada de forma mais abrangente. Seguindo o pensamento de Vázquez-Salat e Houdebine (2013), ainda há dois fatores que devem ser levados em consideração tanto na fase de desenvolvimento, quanto para aplicação, o primeiro é a relação *redução de custo* com o *aumento na quantidade*, e o segundo fator é o *aumento da qualidade* (VÁZQUEZ-SALAT; HOUDEBINE, 2013).

Novas tecnologias procuram estar de acordo com esses fatores para que possam ser competitivos e eficientemente atrativos para o mercado, relacionando

essa especificações à linhagem OX513A, a linhagem teve pouco avanço no equilíbrio desses fatores. No que diz respeito a *redução de custo* com *aumento de quantidade* para esta linhagem há necessidade de realizar manualmente a separação sexual desses mosquitos, e este é um processo muito laborioso, que demanda mão de obra especializada. Além disso, aproximadamente 70-75% da produção é descartada, pois este montante corresponde a fêmeas que não são utilizadas no programa de liberação de mosquitos e machos de desenvolvimento tardio e que não são coletados/utilizados, o que onera maior custo na produção. Em ambos os casos, esses insetos consomem alimento, ocupam espaço, treinamento técnico especializado para sexagem para simplesmente serem descartados. Em relação ao segundo fator, *aumento na qualidade*, estudos apontam perda de aptidão dessa linhagem quando comparada com mosquitos da mesma espécie não-transgênicos (BARGIELOWSKI; ALPHEY; KOELLA, 2011; BARGIELOWSKI et al., 2011).

Num quadro hipotético onde a separação sexual não seja um gargalo, o inseto ainda é menos competitivo no campo, pois a ingestão de tetraciclina acaba removendo parte da microbiota intestinal desses machos, que tem papel fundamental em sua aptidão - ou *fitness* - (RIDLEY, 2011). Entretanto, mesmo havendo perda de *fitness*, essa linhagem pioneira se mostrou eficaz na supressão populacional em pelo menos duas localidades. O primeiro estudo ocorreu nas Ilhas Cayman, onde se obteve redução de 80% do índice de ovitrampa, um índice de medição populacional relativo (HARRIS et al., 2012); Outro estudo realizado posteriormente no Brasil mostra resultado semelhante (CARVALHO et al., 2015). Por se tratarem de áreas de estudo completamente diferentes entre si, ainda assim a linhagem utilizada em ambos experimentos mostra o mesmo tipo de eficácia. Um

terceiro estudo (manuscrito em preparação) mostra que a aplicação dessa linhagem se faz similar ao de um inseticida, que quando sua aplicação é interrompida, a população volta a crescer e repovoar o ambiente, alcançando seu número original.

Assim como para inseticidas, novos produtos que atendam melhor as expectativas de mercado consumidor devem ter múltiplas abordagens para o controle vetorial, o mesmo se faz verdadeiro na utilização de OGMs. Assim, este estudo propõe o estabelecimento de novas linhagens de controle populacional de *Ae. aegypti* que sejam geneticamente esterilizadas, ou seja, não tenha a capacidade de gerar descendentes e com a vantagem de não se utilizar radiação durante o processo (como aplicação de SIT), aumentando a capacidade desses machos de competirem por fêmeas da população selvagem. Esta proposta ainda pode incluir uma esterilização genética condicional, que em outras palavras, permite que machos ao serem liberados no ambiente sejam estéreis e machos utilizados para produção de ovos da colônia continuem férteis (figura 03) dependendo da presença/ausência do “antídoto”.

A vantagem desse sistema se deve a possibilidade de ter organismos estéreis sem o uso de qualquer tipo de radiação, e por se tratar de um OGM, o transgene não é inserido na população, pois não há prole. Toda postura oriunda de um cruzamento entre um macho transgênico e uma fêmea selvagem resultará em ovos inviáveis.

O “antídoto” mencionado pode ser um composto químico que tenha muita afinidade por uma das moléculas-chave da construção transgênica, dessa forma o “antídoto” seria ministrado logo após a eclosão das larvas e durante todas as fases de desenvolvimento do inseto, garantindo que o gene continue inativo. A produção de esperma possui elementos de grande interesse que podem ser utilizados para

regular a esterilidade condicionada como promotores de genes específicos, além de promover e regular especificamente produtos nos indivíduos do sexo masculino. A molécula efetora terá papel fundamental em como a esterilidade será promovida na gônada do inseto macho, dentre os candidatos temos moléculas de propriedades citotóxicas, apoptóticas ou inibitórias (CATTERUCCIA; CRISANTI; WIMMER, 2009).

Figura 03 - Esquema do modelo de liberação de machos geneticamente estéreis

Modelo da esterilização genética condicional em machos para supressão populacional, a primeira condição mostra o modelo com a possibilidade de obtenção de ovos férteis na presença do “antídoto” que bloqueia o gene esterilizador e permite que o macho seja fértil. Já na segunda condição, na ausência do “antídoto” os machos se tornam estéreis e sua prole é comprometida se tornando inviável.

1.1 Endonuclease

A utilização de uma endonuclease para a promoção de esterilidade já foi demonstrada em outro estudo utilizando mosquitos *Anopheles gambiae*, apresentando grande sucesso na obtenção de machos completamente estéreis que

quando copulam com fêmeas selvagens não deixam prole viável (WINDBICHLER; PAPATHANOS; CRISANTI, 2008; WINDBICHLER et al., 2007). Por outro lado, o sistema de esterilidade desse trabalho não apresenta condicionalidade, assim todos os machos são obrigatoriamente estéreis. Dessa forma, esse tipo de linhagem somente pode ser usada em escala laboratorial, não sendo possível sua utilização em larga escala. Primeiramente, por causa da produção dos ovos que é prejudicada por causa da esterilidade, e em segundo lugar, por sempre estar em heterozigose.

A linhagem demanda o contínuo cruzamento entre fêmeas transgênicas e machos selvagens para manter a linhagem funcional, e para tanto, faz-se necessária a separação manual das fêmeas transgênicas através do gene marcador, tornando a separação laboriosa e demorada. Este trabalho promovendo esterilidade em anofelinos teve como método de escolha para a endonuclease utilizada a frequência com que ela seria capaz de clivar. Nesse caso, o cromossomo sexual masculino (Y) em *Anopheles gambiae* (WINDBICHLER et al., 2007). *Ae. aegypti*, por sua vez não possui cromossomo sexual, e para essa espécie, o critério deverá ser a escolha da endonuclease que tiver a maior frequência de clivagem no genoma completo. Outras endonucleases já foram utilizadas para promover clivagens em *Ae. aegypti* demonstrando que se é possível expressar essas enzimas em um sistema transgênico (TRAVER; ANDERSON; ADELMAN, 2009).

A construção deste trabalho apresenta um elemento promotor tecido-específico, para direcionar e regular a expressão dessa molécula no momento da espermatogênese. A esterilidade promovida nesses machos se dá quando a endonuclease cliva o DNA genômico em todos os sítios disponíveis e desencadeia uma cascata apoptótica nas células que tiverem participando da espermatogênese. E de forma inovadora, a construção apresenta um sistema interligado para ativação

e inibição da construção como um todo que possa ser regulado de forma independente.

1.2 Antagonista de Inibidor de Apoptose

Inibidores de apoptose (IAP) são enzimas responsáveis pela regulação da cascata apoptótica através do bloqueio que realizam nas caspases, ligando-se diretamente a elas. Bloquear a ação da IAP dará início ao processo de morte celular (AUGELLO et al., 2009; GALBAN; BRADY; DUCKETT, 2008; WANG et al., 2008).

O antagonista de inibidor de apoptose encontrado em mosquitos da espécie *Aedes aegypti* é a enzima michelob_x (Mx) (CATTERUCCIA; CRISANTI; WIMMER, 2009; ZHOU et al., 2005). Este antagonista já foi utilizado em outro estudo e mostrou-se eficaz na ativação da cascata apoptótica e naturalmente está envolvido na regulação dos inibidores de apoptose durante situações de estresse ou presença de patógenos (WANG; CLEM, 2011). Em estudo de cultura de célula de intestino de *Aedes albopictus*, somente 20 horas após a transfecção foi que se iniciou o processo de morte celular. Segundo seus descritores, a atividade pro-apoptótica de Mx é completamente dependente de seu motivo ligante em IAP em sua porção N-terminal (ZHOU et al., 2005).

Linhagens transgênicas e estudos em células transfectadas mostram que a expressão desse tipo de molécula gera quadro apoptótico e que sua utilização como molécula efetora para quadro de supressão populacional é de grande potencial (CATTERUCCIA; CRISANTI; WIMMER, 2009; FU et al., 2010; ZHOU et al., 2005). Estudos anteriores e também estudos de transfecção desenvolvidos no Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo já mostraram

resultados promissores na utilização dessa molécula na promoção de apoptose para outros fins (manuscrito em preparação).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Estabelecer linhagens geneticamente estéreis condicionais para controle populacional de *Aedes aegypti*.

2.2 Específico

- Elaborar construções gênicas para composição dos plasmídeos de transformação;
- Microinjetar embriões de *Ae. aegypti* para obtenção de linhagens geneticamente modificadas;
- Caracterizar as linhagens obtidas através de ferramentas moleculares;
- Estabelecer colônia homozigota;
- Realizar ensaio em escala laboratorial para determinação de esterilidade de machos geneticamente modificados;

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Colônia de *Aedes aegypti* – Higgs (*White-eyes*)

A colônia matriz de mosquito da espécie *Ae. aegypti* (linhagem Higgs) foi mantida no Biotério de Artrópodes do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II) da Universidade de São Paulo - USP.

Os mosquitos adultos foram mantidos sob temperatura de 28 ± 1 °C, umidade relativa do ar de $80 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (claro : escuro). Os adultos foram alimentados com solução sacarose 10% (p/v) *ad libitum* usando chumaços de algodão embebidos na solução açucarada. As fêmeas realizaram o repasto sanguíneo semanalmente em camundongos da linhagem Balb/c anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 03 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg no músculo da coxa de uma das patas traseiras. Três dias após a alimentação sanguínea, um recipiente plástico revestido com papel filtro e contendo água foi colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem a oviposição. A postura foi retirada da gaiola depois de três dias no máximo e acondicionada sobre bandeja com papel absorvente para secagem por no mínimo 72 horas. Após a secagem, os ovos foram utilizados para eclosão das larvas com o objetivo de fornecer mosquitos adultos tanto para a colônia de manutenção, quanto para colônia de microinjeção. Para que ocorra a sincronização na eclosão das larvas, elas foram eclodidas em água autoclavada armazenada em pote fechado hermeticamente e preparado com antecedência. As larvas foram alimentadas com ração para peixe triturada Vipran Premium (Sera GmbH, Heinsberg, Alemanha) seguindo o regime de alimentação proposto por um estudo anterior desse mesmo grupo (CARVALHO et al., 2014). Ao atingirem o estágio de pupas, os indivíduos foram separados e feita sexagem para

montagem dos cruzamentos experimentais ou das colônias numa proporção 3 ♀ : 1 ♂.

Para os experimentos de microinjeção, foi adicionado tetraciclina (10 a 30 µg/ml) na solução de sacarose dos adultos.

3.2 Análises *in silico*

Para a montagem e análise das construções gênicas foram usados bancos de sequências disponibilizados na internet, GenBank e VectorBase (BENSON et al., 2009; LAWSON et al., 2007, 2009; MEGY et al., 2012; SAYERS et al., 2009) com o auxílio do *software* SnapGene® (GSL Biotech Chicago, IL, EUA). O código “Bio Restriction Analysis” (EDWARDS; CHERVITZ, 2003) em BioPerl (STAJICH et al., 2002) foi usado para seleção das endonucleases. Para a otimização de códons foi usada a plataforma Visual Gene Developer – Gene optimization (JUNG; MCDONALD, 2011).

3.3 Microinjeção

Em posse da sequência final da construção dos plasmídeos e a otimização dos códons, a sequência foi enviada para a empresa Epoch Life Science (TX, EUA) para síntese plasmidial.

3.3.1 Solução de Microinjeção

Os DNA de plasmídeos foram utilizados para a transformação de células competentes cepa DH10B de *Escherichia coli* (ThermoFisher Scientific – MA, EUA) preparada previamente. Primeiramente, os plasmídeos foram ressuspensos em água MilliQ em um volume de 50 µl e mantidos em gelo ou armazenados a

temperatura de -20 °C . Para a transformação das células competentes foi seguido o protocolo estabelecido no laboratório de mosquitos geneticamente modificados apresentado no item 3.3.1.1.

3.3.1.1 Transformação de célula competente e amplificação de DNA de plasmídeo

Brevemente, o protocolo utiliza células competentes (em alíquotas de 100 µl) que foram mantidas em gelo e foi adicionado 1 µl da solução de DNA de plasmídeo. A mistura foi mantida em microtubo no gelo por 30 minutos e posteriormente colocada a 42 °C por 45 segundos em bloco seco, após esse procedimento os tubos foram colocados novamente no gelo por mais 1 minuto. A mistura foi colocada em tubo aerado contendo 900 µl de meio LB líquido sem antibiótico (Luria-Bertani, ThermoFisher Scientific), e mantido em incubadora com agitação a temperatura de 37 °C por 60 minutos. Após esse período, as células foram plaqueadas (5, 25 e 50 µl) em meio sólido (LB ágar) com o antibiótico de seleção adequado (neste caso ampicilina 100 µg/ml para a o plasmídeo doador e kanamicina 50 µg/ml para o plasmídeo auxiliador. As placas foram incubadas por 12-16 horas a 37 °C. Colônias bacterianas isoladas foram usadas para amplificação e purificação do DNA de plasmídeo usando o kit EndoFree Plasmid Maxi® (Qiagen, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante.

3.3.1.2 Preparo da Solução de Injeção

A solução de injeção, por sua vez, contém os DNAs dos plasmídeos doador e auxiliador numa concentração de 0,5 e 0,3 µg/µl respectivamente, adicionalmente o tampão de injeção (fosfato dissódico 1M e fosfato monossódico 1M em pH 6,8) no volume de 7 µl (0,1 M), e o volume final de 20 µl pode ser ajustado com adição de

água MilliQ. A solução então passa por uma unidade filtrante com poros de 0,22 µm (Millex®-GV, Millipore, Japão) via centrifugação entre cinco a dez minutos a 11.000 g. A solução é mantida em gelo durante a utilização e armazenada a -20 °C. Ao se iniciar cada lote de microinjeção, a solução foi completamente descongelada e centrifugada por 30 minutos a aproximadamente 21.000 g e somente então utilizada para microinjeção.

3.3.1.3 Microinjeção de ovos embrionados

Entre dez e quinze fêmeas da colônia de microinjeção foram transferidas para um tubo de vidro de fundo chato contendo um chumaço de algodão umedecido com água no fundo e coberto com papel de filtro para postura dos ovos coletados no intervalo de 40 a 60 minutos. Os ovos foram alinhados com auxílio de estereomicroscópio de luz comum (Leica MZFLIII, Leica Alemanha) e todos com o lado posterior (oposto à micrópila) voltados para mesma direção. Posteriormente os embriões foram transferidos para lamínula com fita dupla-face.

Figura 04 - Esquema de obtenção e alinhamento de ovos de *Ae. aegypti*

Esquema do processo de obtenção e alinhamento de ovos de *Ae. aegypti* para microinjeção. Da esquerda para direita: Fêmeas realizando postura forçada em papel de filtro umido em tubo de vidro; Oviposição dos ovos após aproximadamente 60 minutos; Alinhamento dos ovos com o pólo posterior de cada um deles voltado para a mesma direção; Alinhamento final dos ovos transferidos para lamínula usando fita dupla-face e cobertos com óleo halocarbônico. Créditos das imagens e montagem do esquema: Ceres Maciel de Miranda e Margareth de Lara Capurro

O conjunto foi levemente dessecado e aos primeiros sinais (sulcos formados na casca dos ovos), os ovos foram cobertos com óleo halocarbônico 27 (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) para interromper a o processo de perda de água - como no esquema da figura 04. A lamínula com os ovos foi levada ao sistema de microinjeção e injetados individualmente no pólo posterior (JASINSKIENE; JUHN; JAMES, 2007) figura 05.

O sistema de microinjeção é composto por um estereomicroscópio comum (Leica S6E, Leica), com uma plataforma e chariot adaptados para movimentação da lamínula com os ovos. Acoplado a esse sistema está o microinjetor FentoJet® (Eppendorf, Hamburg – Alemanha) com a agulha contendo a solução de microinjeção na ponta. Para posicionar e mover a agulha, existe um micromanipulador automático TransferMan® NK2 (Eppendorf) também acoplado ao sistema. As agulhas utilizadas foram padronizadas a partir de estiramento e calor, usando capilares de vidro borosilicato (World Precision Instrument, Sarasota, Flórida, EUA) no equipamento Sutter modelo P97 (Sutter Instrument Co., Novato, Califórnia, EUA). As pontas das agulhas foram lixadas por no máximo 01 minuto no aparelho *KT Brown Type micro-pipette beveler* modelo BV-10 (Sutter).

Figura 05 - Microinjeção em ovos embrionados de *Aedes aegypti*

Visualização do processo de microinjeção em ovos embrionados de *Ae. aegypti*. A microinjeção se dá pela inserção da ponta da agulha contendo solução de microinjeção nos ovos e injetando-a no interior dos ovos (A – figura retirada de HARRELL, 2014). Créditos da fotografia dos ovos: Helena Araújo

3.4 Obtenção de linhagem transgênica

Os ovos embrionados microinjetados permanecem em repouso por 3 a 5 dias (período que ocorre a recuperação dos embriões) e então foram colocados para que ocorresse a eclosão das larvas (conforme descrito no item 3.1). As larvas foram alimentadas e mantidas nas mesmas condições apresentadas no item 3.1, e a dieta foi suplementada com solução de tetraciclina numa concentração final de 10 a 30 µg/ml. Ao atingirem a fase adulta esses adultos injetados foram individualizados e separados por gênero sexual. Para cada um dos machos foram colocadas 10 fêmeas virgens do tipo selvagem para realizarem cópula – para esse tipo de cruzamento se dá o nome de “*família*”. As fêmeas injetadas, por sua vez, formaram grupos de até dez fêmeas que foram colocadas na presença de machos virgens do tipo selvagem (em mesma densidade 1:1) – para esse tipo de cruzamento foi dada a designação de “*pool*”. As fêmeas de todos os cruzamentos (*pools* e famílias) foram alimentadas como descrito no item 3.1 e os ovos oriundos desse cruzamento foram colocados para secar para posterior eclosão.

3.4.1 Seleção de cruzamentos parentais portadores da construção transgênica

Para cada um dos cruzamentos, os ovos obtidos foram colocados em potes retangulares (volume de 500 ml) com 200-250 ml de água deionizada para eclosão das larvas devidamente etiquetados, para facilitar o rastreamento dos cruzamentos parentais. As larvas foram mantidas e alimentadas conforme descrito no item 3.1 e sua dieta também foi suplementada com 10-30 µg/ml de tetraciclina. As larvas ao atingirem o estágio L3/L4, foram peneiradas e lavadas em água corrente para remoção de resíduos de dieta e exúvias, e foram transferidas para potes (volume de 200 ml) com identificação em 50 ml de água deionizada.

A seleção dos indivíduos portadores da construção transgênica se dá pela observação e seleção de cada uma das larvas sob luz fluorescente. Para isso, as larvas são concentradas em papel de filtro qualitativo (Whatman®, GE Life Science, EUA) em sistema de sucção formado por um funil de Büchner acoplado a um kitassato de 500 ml e conectado a bomba de vácuo por mangueiras de silicone.

O papel de filtro umedecido contendo as larvas foi posicionado sobre placa de petri para facilitar o transporte do material. As larvas foram observadas em estereomicroscópio (Leica MZFLIII) com luz fluorescente (filtros de excitação a 563 nm e emissão a 582 nm) para identificação da marcação genética pré-definida pela construção transgênica, ou seja, olhos e tecido nervoso com a expressão da proteína vermelha fluorescente DsRed.

No caso de um dos cruzamentos serem encontradas larvas portadoras da marcação genética, elas eram segregadas das demais e a emergência do adulto era esperada. Esse adulto posteriormente foi copulado com indivíduos selvagens na proporção de 1 ♂ : 3 ♀ para aumentar o número de indivíduos transgênicos e por fim estabelecer linhagens homozigotas para essa construção. Assim como nos

cruzamentos parentais, fez-se necessária a suplementação constante de tetraciclina (10-30 µg/ml) para todos os indivíduos para evitar que a construção seja ativada e promova esterilidade nos machos.

3.4.2 Linhagem em homozigose

Após o estabelecimento das linhagens, no decorrer das gerações subsequentes, cruzamentos e endocruzamentos foram formados entre mosquitos previamente selecionados com a marcação transgênica de interesse como descrito no item 3.4.1. Dessa forma, ao longo das gerações, a expectativa foi que a frequência de indivíduos portadores da marcação transgênica em relação ao não-transgênicos aumentasse. A linhagem foi considerada homozigota quando após, pelo menos, três gerações não se encontrou mais indivíduos tipo selvagem, apenas indivíduos portadores da marcação transgênica.

3.5 Caracterização molecular das linhagens transgênicas

3.5.1 Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR)

A fim de verificar a presença de transcritos oriundos dos transgenes incorporados no genoma do inseto, foi realizada a extração de RNA total utilizando o reagente comercial TRIZol® (Invitrogen – EUA) seguindo as normas do fabricante. Para cada amostra foram usados 10 insetos inteiros, sendo elas de diferentes fases de desenvolvimento descritas a seguir; larvas dos estádios L2, L3 e L4, pupa macho (PM), pupa fêmea (PF), adulto macho (AM) e adulto fêmea (AF). Para avaliação do perfil de expressão do gene de $\beta 2$ -tubulina foram adicionados duas amostras para

extração de RNA total, sendo uma das amostras composta por 10 aparelhos reprodutores de adultos machos (aparelho reprodutor isolado contendo testículos, vasos deferentes, vesícula seminal e glândulas acessórias – TS) e a segunda amostra composta pela carcaça (CC) desses mesmos insetos sem o aparelho reprodutor. Após a extração de RNA total de cada amostra, o mesmo foi quantificado em nanodrop 2000c[®] (Thermo Scientific, EUA) e submetido ao tratamento de eliminação de DNA genômico utilizando DNase I Amp[®] (Invitrogen, EUA) seguindo também as recomendações do fabricante. Esta reação demanda a confirmação da ausência de DNA nas amostras através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando um gene constitutivo (neste caso o gene Actina 1 – AAEL001928) sugerido por Azevedo (2014). Em seguida as amostras foram submetidas à reação com a enzima transcriptase reversa SuperScript[™] II (Invitrogen) para formação da primeira fita de cDNA seguindo as orientações do fabricante.

Para as diferentes PCRs se utilizou os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) apresentados na tabela 01 para amplificação de fragmentos específicos das amostras de cDNA de cada uma das linhagens para o gene de *micelob_x* (origem endógena e transgênica) e actina (como gene constitutivo e controle). Para a reação foi utilizada a enzima Taq DNA Polymerase (5 U/μl) (Sinapse Inc) seguindo as recomendações do fabricante.

Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão utilizados para todos os pares mencionados na tabela 01 com a descrição dos *primers* foi de 94 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C / 55 °C / 45 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos para os *primers* de *micelob_x* (endógena e transgênica) com 30 ciclos, primers de actina 1 com 25 ciclos e β2-tubulina com 30 ciclos.

Tabela 01 - Sequência, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados dos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR

Gene	Primer	Sequência	Tamanho amplificado	T °C de anelamento
Michelob_x endógena	M_x WT	5'-AATTCCACCAACTCCTCCGT-3'	150 bp	60 °C
	M_x R	5'-GCTTGTTGCACAGCAGACAT-3'		
Michelob_x transgênica	M_x TT	5'-AATTCCACCAACTCCTCCAC-3'	150 bp	60 °C
	M_x R	5'-GCTTGTTGCACAGCAGACAT-3'		
Actina 1	ACT F	5'-ATTGCTCCACCAGAACGTAAA-3'	150 bp	55 °C
	ACT R	5'-CAGGATTAACCTTAGAAGCACT-3'		
β2 Tubulina	BT F	5'-GCAAAAATAGTAGCTACTTCGTCGAATGGATCC-3'	350 bp	45 °C
	BT R	5'-CGGATAATTTTCAGCCATTTTT-3'		

3.5.2 Eletroforese de DNA

Cada amostra de DNA foi previamente preparada com adição de 1/5 do volume de tampão de amostra Orange G, contendo sacarose 65% (p/v), Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM e Orange G (Sigma Steinhein, Alemanha) 0,3% (p/v). A eletroforese era realizada em gel composto de agarose (Invitrogen) 1,0% (p/v) dissolvida em tampão TBE 1 X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 50 mM). A mistura foi aquecida para completa solubilização e posteriormente foi adicionado brometo de etídio (0,5 µg/ml). O gel foi transferido para cuba de eletroforese horizontal Owl EasyCast™ E2 (Thermo Fisher Scientific, MA EUA) e após solidificação, a cuba foi preenchida com TBE 1 X até que o gel fosse completamente coberto (e/ou até a marca de preenchimento máximo da cuba) e foram aplicados 10-15 µl de amostra em cada poço. O marcador de peso molecular utilizado nas eletroforese foi 1 Kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen). A eletroforese foi realizada pela aplicação constante de uma diferença de potencial de 100 V por aproximadamente 60 minutos.

Ao término da eletroforese, a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em fotodocumentador InGenius3 (Syngene, Synoptics Ltd, Inglaterra)

utilizando filtro apropriado para captura usando brometo de etídio e as imagens foram obtidas com auxílio do software GeneSys e GeneSys Tools (Syngene).

3.6 Processo de dissecação de aparelho reprodutor masculino

Dez machos para cada linhagem foram nocauteados por inalação de gás CO₂ e mantidos em placa de petri sobre gelo. Cada macho foi posicionado em esteriomicroscópio (Leica MZFLIII) sobre lâmina de vidro ao lado de uma gota de 20 µl de tampão PBS 1 X (NaH₂PO₄ 2 mM, pH 7,0 e contendo NaCl 140 mM). Com auxílio de um estilete e uma pinça de ponta fina, o último segmento abdominal foi pinçado enquanto o restante do corpo do inseto estava fixo com a ajuda do estilete. O segmento abdominal foi então puxado com cuidado em direção da gota de PBS 1 X até que a membrana que mantém os segmentos abdominais unidos se rompesse expondo o conteúdo interno do abdome. Uma vez imerso no tampão, o segmento abdominal continuou a ser puxado até que houvesse rompimento dos tecidos e estivesse completamente livre do restante da carcaça, ou até que os dois testículos estivessem livres e imersos, mas ainda unidos ao segmento puxado. A carcaça foi então transferida para tubo para posterior processo de extração de RNA descrito no item 3.5.2.

O último seguimento abdominal contendo o aparelho reprodutor na gota de PBS 1 X foi dissecado com o auxílio de estiletes de pontas finas (e um deles com a ponta levemente recurvada a 45 graus), assim o restante de tecido era dissecado expondo as glândulas acessórias, a vesícula seminal e os canais deferentes, a genitália e os demais tecidos foram descartados. Esse conjunto de tecidos que compõem o aparelho reprodutor masculino está exibido na figura 06. Esse conjunto de diferentes tecidos foram agrupados e renomeados como testículos (TS) para

facilitar a escrita. Para cada reação foram usados 10 testículos dissecados que foram colocados em tubos para processamento e extração de RNA total conforme o item 3.5.2.

Figura 06 - Aparelho reprodutor masculino de mosquito macho da espécie *Ae. aegypti*

Aparelho reprodutor masculino de mosquitos *Ae. aegypti* em detalhe os tecidos que foram dissecados para extração de RNA total; Glândulas acessórias, vesícula seminal, canais deferentes e testículos. As peças que compõem a genitália propriamente dita (último segmento abdominal) foram descartadas assim como corpo gorduroso e porção final do intestino posterior. Fonte: Danilo O. Carvalho (2016)

3.7 Desafio de Esterilidade

Os ovos das linhagens transgênicas foram colocados em água para a eclosão das larvas e foram mantidas conforme o item 3.1, porém as larvas não tiveram sua dieta suplementada com tetraciclina. Ao atingirem a fase de pupa os machos foram separados, e as fêmeas foram descartadas. Os machos foram individualizados em pequenos potes plásticos de 200 ml, e cada macho recebeu 5 fêmeas tipo selvagem permanecendo por pelo menos 24 horas para realizarem cópula.

Após o intervalo de confinamento de cópula as fêmeas realizaram repasto sanguíneo por pelo menos 30 minutos e três dias após o repasto, elas foram individualizadas em dispositivo de oviposição individual (manuscrito em preparação), o mesmo foi realizado com o grupo controle, onde machos não-transgênicos foram

usados. Esse dispositivo de oviposição consiste em uma placa de cultura celular de 24 poços que possui um papel de filtro circular umedecido com água deionizada no fundo do poço. As fêmeas foram nocauteadas em atmosfera de CO₂ (gás dióxido de carbono) e mantidas em baixa temperatura (placas de petri em caixa de isopor com gelo). A tampa da placa de cultura celular era posicionada sobre gelo e com o fundo voltado para cima, cada fêmea foi colocada em cada uma das marcações da tampa e registrada sua posição de acordo com o cruzamento de origem (fazendo uso das marcações existente de colunas e fileiras). As fêmeas foram posicionadas com a ajuda de uma pinça, e ao se completar, a placa foi posicionada de cabeça para baixo e fechada, confinando as fêmeas dessa forma até que se recuperassem da anestesia (entre 10 e 15 minutos). A tampa foi firmemente fixada com fita adesiva para evitar escapes, mas ainda sim permitir que ocorresse troca gasosa.

As fêmeas permaneceram por 24 horas, e logo depois, as placas foram colocadas em caixa de isopor com gelo para nocautear novamente as fêmeas que foram transferidas para uma gaiola de descarte usando um sugador elétrico. As posturas com os ovos foram deixadas para secar por 72 horas nas condições do biotério. Para cada fêmea foi determinado o número total de ovos (fecundidade), assim como o número total de larvas eclodidas desses ovos (fertilidade). Para a eclosão dos ovos foi usado o processo descrito no item 3.1. Os dados foram tabulados e analisados conforme o item 3.8.

3.8 Análise dos resultados

Todos os dados foram tabulados e analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism[®] (versão 5.00) em plataforma operacional Windows 7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transformação dos mosquitos tem como base um elemento de transposição de classe II que foi dividido em dois plasmídeos. Essa divisão fez com que o transposon tivesse sua região codificante para a transposase removida e substituída pela construção de interesse; assim a construção ficaria flanqueada pelos braços direito e esquerdo do elemento de transposição, sendo esse o plasmídeo doador. O segundo plasmídeo possui apenas a porção codificante da transposase removida, dessa forma têm-se um sistema bipartido (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002; COATES et al., 1998, 2000), como apresentado na figura 07 (figura modificada de IVICS et al., 2011).

Figura 07 - Esquematização do processo de inserção genômica via elemento de transposição por sistema bipartido

Sistema vetorial por transposon para inserção genica estável (a) Plasmídeos do sistema bipartido de inserção gênica. O sistema é composto por dois plasmídeos: um plasmídeo (doador) contendo o gene de interesse (GOI) flanqueado entre os braços do elemento de transposição (TIR; setas pretas com orientação oposta) e outro plasmídeo (auxiliador) expressando a transposase por promotor adequado (seta preta). (b) O GOI é removido do plasmídeo doador e integrado no genoma pela transposase (esferas roxas) em sítio específico. Figura modificada de Ivics et al (2011).

4.1 Elementos das construções transgênicas

A estratégia de gerar esterilidade em mosquitos não é inovadora (WINDBICHLER et al., 2007), porém a forma e os elementos utilizados para a obtenção de machos geneticamente esterilizados condicionalmente traz o caráter inovador e a torna mais próxima da aplicabilidade desse tipo de ferramenta. Portanto, foi realizada seleção de moléculas efetoras e sequências promotoras de DNA para a composição final dos plasmídeos transformadores para possibilitar a expressão dessa construção da forma esperada.

As escolhas dos elementos que compõem as construções genéticas tiveram base na busca em artigos publicados (referenciados apropriadamente na apresentação de cada elemento) e na busca de sequências de interesse, que foram obtidas nos bancos de sequências VectorBase (LAWSON et al., 2007, 2009; MEGY et al., 2012) e GenBank - NCBI (BENSON et al., 2009; SAYERS et al., 2009). E em posse delas, as sequências foram colocadas em ordem apropriada de acordo com a funcionalidade do inserto mantendo a ordem e direção de leitura entre região promotora e região codificadora com o auxílio do *software* SnapGene® (GSL Biotech Chicago, IL, EUA).

O sistema bipartido escolhido para transformação foi pMos/Mariner 3XP3_DsRed (COATES et al., 1998, 2000), onde todos os portadores da construção apresentam fluorescência no comprimento de onda de excitação a 563 nm e emissão a 582 nm, principalmente nos olhos e nervo ótico (figura 08) e em raros casos nas papilas anais e tubo nervoso. Dessa forma, independentemente dos demais elementos que compõem o plasmídeo, somente os indivíduos transgênicos apresentaram fluorescência vermelha nos olhos (BAIRD; ZACHARIAS; TSIEN, 2000; THOMAS et al., 2002).

Figura 08 - Comparação entre indivíduos transgênicos e selvagens de acordo com a marcação transgênica presente nos olhos e nervo ótico

Marcação transgênica presente nos olhos promovido pela expressão do gene DsRed regido pelo promotor 3XP3. A – indivíduos transgênicos portadores da construção; B – indivíduos tipo-selvagem não portadores da marcação transgênica. Fonte: D. O. Carvalho (2013)

Além do elemento de marcação transgênica, também foram inseridos no plasmídeo doador outros elementos adicionais necessários para a transformação do inseto a fim de gerar quadro de esterilidade condicional: 1) elemento regulador tecido específico - promotor; 2) molécula efetora e sinal de localização; 3) sistema condicional de expressão.

A partir da seleção dos elementos que compõem o plasmídeo doador, foi realizada otimização dos códons para a espécie *Ae. aegypti*, visto que alguns elementos são oriundos de espécies evolutivamente muito distante dele e a frequência que determinados códons são usados para codificar um mesmo aminoácido pode mudar entre as espécies. Portanto sem mudar a sequência peptídica, os códons foram ajustados de acordo com a frequência em que eles são mais comumente encontrados no organismo de interesse. Essa forma aumenta as chances da sequência inserida ser transcrita pela maquinaria celular, resultando em uma maior expressão dos genes da construção inserida (ARGENTINE; JAMES, 1993). Para a otimização dos códons foi usada tabela de frequência de códons determinada para *Ae. aegypti* segundo o banco de dados de sequência de DNA do

GenBank através de uma interface na web que provê dados no formato de tabela, apresentado na tabela 02 (dados compilados do GenBank em tabela modificada).

Tabela 02 - Frequência de uso de códons em *Aedes aegypti*

Aminoácido	Códon	Frequência (%)	Aminoácido	Códon	Frequência (%)
Phe	UUU	11,8	Ser	UCU	8,8
	UUC	30,5		UCC	15,7
Leu	UUA	5,0		UCA	8,8
	UUG	18,9		UCG	18,5
	CUU	9,5	Pro	CCU	8,6
	CUC	11,5		CCC	10,7
	CUA	7,7		CCA	15,4
	CUG	32,2		CCG	16,8
Ile	AUU	17,5	Thr	ACU	10,9
	AUC	27,9		ACC	20,2
	AUA	7,1		ACA	9,6
Met	AUG	23,7		ACG	13,7
Val	GUU	17,2	Ala	GCU	19,1
	GUC	17,8		GCC	26,1
	GUA	9,9		GCA	13,2
	GUG	20,7		GCG	12,2
Tyr	UAU	11,2	Cys	UGU	8,8
	UAC	23,7		UGC	12,3
STOP	UAA	1,1	STOP	UGA	0,6
	UAG	0,6	Trp	UGG	11,6
His	CAU	11,0	Arg	CGU	11,0
	CAC	15,3		CGC	10,1
Gln	CAA	17,2		CGA	9,5
	CAG	25,3		CGG	8,5
Asn	AAU	19,9		AGA	5,1
	AAC	30,4		AGG	4,3
Lys	AAA	23,2	Ser	AGU	12,2
	AAG	35,2		AGC	14,5
Asp	GAU	31,7	Gly	GGU	17,8
	GAC	25,1		GGC	16,8
Glu	GAA	34,0		GGA	24,1
	GAG	24,9		GGG	6,0

Frequência do uso para cada um dos códons usado por *Ae. aegypti*. Tabela modificada da web: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=7159>

4.1.1 Elemento regulador

A produção de espermatozoide apresenta etapas dependentes de genes que regulam a formação de estruturas fundamentais para o espermatozoide ocupar as espermatecas das fêmeas e posteriormente fertilizar os ovos, enzimas e proteínas oriundas das glândulas acessórias auxiliam na fecundação das fêmeas. O axonema dos espermatozoides faz parte do sistema responsável pela locomoção do espermatozoide, permitindo que ele se movimente. Essa é uma estrutura formada por microtúbulos, composta basicamente por dímeros em cadeias de uma proteína estrutural, a tubulina (sendo α e β seus dímeros). A isoforma dois de β -tubulina (β 2-tubulina: DQ833526) é em parte a principal responsável pela mobilidade do espermatozoide (NIELSEN; GADAGKAR; GUTZWILLER, 2010). O promotor do gene β 2-tubulina é responsável pela ativação do gene tecido-específico, e é restrito a uma região de 956 bp (pares de base) para dirigir a expressão específica no testículo, que se inicia ainda durante a fase larval no terceiro estadio. Sabendo que se trata de uma região reguladora específica estudos mostraram seu potencial para ser usada em construções transgênicas que tem como foco o aparelho reprodutor masculino desse inseto (CATTERUCCIA; BENTON; CRISANTI, 2005; SANTEL et al., 2000; SMITH et al., 2007).

Para confirmar o perfil da expressão tecido-específica desse gene descrita por Smith e colaboradores (2007), foi realizada uma RT-PCR usando como amostra cDNA de indivíduos de diferentes estágios/estádios de desenvolvimento da linhagem Higgs tipo selvagem e não transformada. O perfil transcricional pode ser observado na figura 09, onde foram utilizadas larvas de 3º e 4º estadio (L3 e L4), pupas macho e fêmea (PM e PF) e adultos machos e fêmeas (AM e AF), além do aparelho reprodutor masculino completo (testículo, canais deferentes, vesícula seminal e

glândulas acessórias -TS) dissecado e a carcaça de machos (cabeça, tórax e abdome - CC) das quais foi extraído o aparelho reprodutor masculino. Na figura 09 é possível observar que para o gene de actina 1 (AAEL001928) - usado como controle constitutivo para avaliar a integridade das amostras - houve amplificação do fragmento de 150 bp para todas as amostras exceto para o aparelho reprodutor masculino (a ser discutido posteriormente). Por outro lado, em relação a amplificação do fragmento do gene de β 2-tubulina, nem todas as amostras apresentaram amplificação do fragmento de 350 bp, confirmando o perfil transcricional apresentado por Smith e colaboradores em 2007. Onde as amostras correspondentes ao sexo feminino, tanto pupas, quanto em adultos fêmeas, não apresentam amplificação. Porém houve amplificação desse fragmento nos machos (pupas e adultos) e a partir do terceiro estadio de desenvolvimento (onde segundo literatura, inicia-se a espermatogênese). Além disso, carcaças de machos dissecados, não apresentaram amplificação para o gene de β 2-tubulina, mostrando especificidade tecidual da expressão desse gene.

Ainda na figura 09, pode-se notar que não houve amplificação para o fragmento do gene de actina na amostra de tecido reprodutor masculino, como era esperado, mas houve amplificação para β 2-tubulina. Todavia, o inverso ocorre com as carcaças dos machos; o que significa que o marcador utilizado para gene de actina 1 não possui transcrição no aparelho reprodutor dos machos, somente em sua carcaça, e que por sua vez β 2-tubulina está presente apenas no aparelho reprodutor masculino, pois não houve amplificação desse fragmento na carcaça do inseto.

Figura 09 - Perfil transcricional dos genes de $\beta 2$ -tubulina e actina em diferentes fases de desenvolvimento

4.1.2 Sistema condicional de expressão

O sistema de condicionalidade escolhido possui um fator de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV). A proteína tTAV na ausência desse antibiótico ativa a expressão do elemento de resposta à tetraciclina (tRE), uma sequência que inclui cópias múltiplas da sequência específica de DNA a que o tTAV se liga e ativa a sequência tetO (*Tet-controlled operator/promoter*). Esse sistema pode potencializar o início da transcrição de qualquer sequência que esteja a frente do tetO (HANDLER, 2002; LYCETT; KAFATOS; LOUKERIS, 2004). Na presença de tetraciclina, o ativador de transcrição (tTAV) possui maior afinidade química por tetraciclina formando um complexo que não pode ser desfeito, sendo impedido de se ligar ao tetO mantendo o restante da construção desligada (FURTH et al., 1994; HORN; WIMMER, 2003; LYCETT; KAFATOS; LOUKERIS, 2004). Dessa forma, é possível ativar ou inibir uma construção inserida no genoma do inseto com a presença e ausência de tetraciclina no meio em que ele vive.

Em outras palavras, podemos utilizar um promotor tecido-específico para iniciar a transcrição de tTAV, esse por sua vez, na ausência de tetraciclina, se liga ao tetO que sinaliza o início da transcrição de uma molécula de interesse no tecido que tiver o promotor tecido-específico ativado. Na presença de tetraciclina, o promotor tecido-específico é ativado, inicia-se a transcrição de tTAV que se liga a tetraciclina e a molécula que seria expressa pela sinalização tetO permanece inativa.

Vale ressaltar que o elemento tetO necessita de complementação para ser totalmente funcional e iniciar (ou sinalizar) a transcrição, nesse caso foi usado um promotor mínimo onde somente há motivos essenciais para início da transcrição e não faz necessidade de nenhum fator de transcrição, servindo apenas para acoplar a polimerase e iniciar a transcrição. Para uma das construções propostas, foi usado o promotor mínimo originalmente da proteína HSP70 (*Heat Shocking Protein 70*) que tem sido usado amplamente em diferentes construções em diferentes organismos (GOSSEN; BUJARD, 1992). Essa é uma sequência de 130 bp que esta posicionada logo a frente do tetO. A utilização desse promotor quimérico se mostrou eficiente em outras linhagens obtidas no laboratório.

4.1.3 Moléculas Efetoras

Muitas moléculas efetoras podem ser utilizadas para gerar o quadro de esterilidade proposto no esquema apresentado na figura 03, dentre as possibilidades encontradas, podemos mencionar citotoxinas, enzimas de restrição, ativadores ou inibidores de transcrição e também antagonistas de diversas moléculas. Dentre as propostas apresentadas, dois tipos de moléculas foram escolhidos para compor a construção de esterilidade condicionada; a primeira uma endonuclease e a segunda um antagonista de inibidor de apoptose. De forma geral, as duas moléculas estão

envolvidas no desencadeamento da cascata apoptótica nas células em que a construção for expressa. Para a regulação da expressão dessas duas moléculas, serão usados os dois elementos apresentados nos itens 4.1.1 e 4.1.2, ou seja, tanto o promotor de $\beta 2$ -tubulina, como o sistema condicional são partes em comum entre as duas construções. Assim, o que diferencia as duas construções é a molécula efetora escolhida para promover morte celular condicionalmente nas células formadoras de espermatozoides (Fig 10 e 12). O anexo I mostra o alinhamento entre as sequências da construção sintetizada pela empresa e a sequência original enviada para síntese utilizando a plataforma *on-line* Clustal Omega (MCWILLIAM et al., 2013) com os parâmetros padrões oferecidos pela ferramenta.

Novamente, usando os elementos apresentados, a construção tem o promotor de $\beta 2$ -tubulina que ativa o sistema de regulação por tetraciclina, e por sua vez estimula o momento da produção da molécula efetora na ausência de tetraciclina. Com a produção dessa molécula, as células que originarão os espermatozoides estarão comprometidas e o quadro de esterilidade será produzido nesses machos. Por outro lado, na presença de tetraciclina, o promotor de $\beta 2$ -tubulina ainda é capaz de ativar o sistema de condicional de expressão, que por sua vez, é bloqueado por conta da presença de tetraciclina, não ocorre a sinalização da transcrição e a molécula efetora não é produzida e as células dos testículos passam a produzir espermatozoides normalmente.

4.2 Endonuclease – *CviAI*

No que diz respeito à endonuclease para a busca e escolha da mais apropriada para essa aplicação, foi realizada uma classificação das enzimas de restrição e a partir dessa classificação, a escolha de uma endonuclease levou em

conta parâmetros classificatórios apresentados a seguir: a) número de clivagens capaz de realizar no genoma de *Ae. aegypti*; b) temperatura de atividade; c) tamanho do sítio de clivagem; d) sensibilidade à metilação; e) tipo de enzima de restrição (tipo I, II ou III).

Dessa forma, usando ferramentas de bioinformática e tabulação classificatória, o número de cortes que cada enzima era capaz de realizar, o código de classificação das enzimas de restrição se utilizou o “*Bio Restriction Analysis* (EDWARDS; CHERVITZ, 2003), que usou o banco de dados do catálogo NEB (*New England Biolabs*) e o genoma de *Ae. aegypti* anotado do GenBank sob INSDC: AAGE000000000.2 e GI: 78165793 com 17.343 genes (NENE et al., 2007). Este código contabilizou o número de vezes que cada uma das enzimas era capaz de clivar o genoma de *Ae. aegypti* sinteticamente. Das 532 enzimas iniciais, 378 foram desclassificadas por apresentarem número de corte inferior a 1 milhão de cortes, restando 154 enzimas (tabela 03).

Dessa forma o próximo critério de seleção foi eliminar enzimas que apresentassem sítios de restrição idênticos a qualquer outra enzima, ou seja, eliminar da classificação as isoquimeras. Das demais enzimas foram retiradas os isoquimeros mantendo apenas uma delas, esse processo reduziu para 54 candidatas.

Com isso o próximo passo de classificação foi a temperatura de atividade da enzima. Por se tratar de um animal que depende da temperatura do ambiente para executar suas atividades metabólicas, enzimas com temperatura maior que 37 °C foram desclassificadas. Nesse quesito 17 candidatas foram desclassificadas, restando 38 enzimas.

Tabela 03 - Classificação das enzimas de restrição com número de corte no genoma maior que 1 milhão

Posição	Enzima	Cortes
1	<i>HindI</i>	30,032,972
2	<i>TspEI</i>	15,059,923
3	<i>Tsp509I</i>	15,059,923
4	<i>TasI</i>	15,059,923
5	<i>Sse9I</i>	15,059,923
6	<i>CviTI</i>	12,095,603
7	<i>CviJI</i>	12,095,603
8	<i>Tru9I</i>	8,779,417
9	<i>Tru1I</i>	8,779,417
10	<i>MseI</i>	8,779,417
11	<i>XapI</i>	5,898,953
12	<i>ApoI</i>	5,898,953
13	<i>AcsI</i>	5,898,953
14	<i>TthHB8I</i>	5,537,960
15	<i>TaqI</i>	5,537,960
16	<i>EsaBC3I</i>	5,537,960
17	<i>Hpy188III</i>	5,516,800
18	<i>Hpy178III</i>	5,516,800
19	<i>HpyCH4V</i>	5,486,819
20	<i>CviRI</i>	5,486,819
21	<i>Hinfl</i>	4,891,319
22	<i>Hpy188I</i>	4,884,620
23	<i>AluI</i>	4,796,029
24	<i>NlaIII</i>	4,645,879
25	<i>Hsp92II</i>	4,645,879
26	<i>HpyCH4I</i>	4,645,879
27	<i>FatI</i>	4,645,879
28	<i>CviAII</i>	4,645,879
29	<i>Tsp4CI</i>	4,099,322
30	<i>TaaI</i>	4,099,322
31	<i>HpyCH4III</i>	4,099,322
32	<i>Bst4CI</i>	4,099,322
33	<i>Sau3AI</i>	4,042,349
34	<i>NdeII</i>	4,042,349
35	<i>MboI</i>	4,042,349
36	<i>Kzo9I</i>	4,042,349
37	<i>DpnII</i>	4,042,349
38	<i>DpnI</i>	4,042,349
39	<i>Chai</i>	4,042,349
40	<i>BstKTI</i>	4,042,349
41	<i>BstENII</i>	4,042,349
42	<i>Bsp143I</i>	4,042,349
43	<i>BscFI</i>	4,042,349
44	<i>BfuCI</i>	4,042,349
45	<i>Acil</i>	3,759,709

Tabela 03 - Classificação das enzimas de restrição com número de corte no genoma maior que 1 milhão (cont.)

46	<i>TfiI</i>	3,665,108
47	<i>Hpy8I</i>	3,524,773
48	<i>MaeIII</i>	3,444,525
49	<i>DdeI</i>	3,416,845
50	<i>BstDEI</i>	3,416,845
51	<i>TscI</i>	3,271,267
52	<i>TaiI</i>	3,271,267
53	<i>MaeII</i>	3,271,267
54	<i>HpyCH4IV</i>	3,271,267
55	<i>RsaI</i>	3,170,503
56	<i>Csp6I</i>	3,170,503
57	<i>AfaI</i>	3,170,503
58	<i>XspI</i>	2,962,089
59	<i>MaeI</i>	2,962,089
60	<i>BfaI</i>	2,962,089
61	<i>SatI</i>	2,475,542
62	<i>ItaI</i>	2,475,542
63	<i>Fsp4HI</i>	2,475,542
64	<i>Fnu4HI</i>	2,475,542
65	<i>BthCI</i>	2,475,542
66	<i>MwoI</i>	2,392,014
67	<i>HpyF10VI</i>	2,392,014
68	<i>BstMWI</i>	2,392,014
69	<i>ScrFI</i>	2,271,124
70	<i>MspR9I</i>	2,271,124
71	<i>BstSCI</i>	2,271,124
72	<i>BssKI</i>	2,271,124
73	<i>Bme1390I</i>	2,271,124
74	<i>MspI</i>	2,225,385
75	<i>HpaII</i>	2,225,385
76	<i>HapII</i>	2,225,385
77	<i>BsiSI</i>	2,225,385
78	<i>SecI</i>	2,029,126
79	<i>BssECI</i>	2,029,126
80	<i>BseDI</i>	2,029,126
81	<i>BsaJI</i>	2,029,126
82	<i>Cac8I</i>	2,001,263
83	<i>BstC8I</i>	2,001,263
84	<i>BsII</i>	1,987,432
85	<i>BsiYI</i>	1,987,432
86	<i>BseLI</i>	1,987,432
87	<i>Bsc4I</i>	1,987,432
88	<i>PaiI</i>	1,980,700
89	<i>HaeIII</i>	1,980,700
90	<i>BsuRI</i>	1,980,700
91	<i>BshI</i>	1,980,700
92	<i>BshFI</i>	1,980,700
93	<i>PspN4I</i>	1,929,589

Tabela 03 - Classificação das enzimas de restrição com número de corte no genoma maior que 1 milhão (cont.)

94	<i>NlaIV</i>	1,929,589
95	<i>BspLI</i>	1,929,589
96	<i>BscBI</i>	1,929,589
97	<i>HspAI</i>	1,846,786
98	<i>HinP1I</i>	1,846,786
99	<i>Hin6I</i>	1,846,786
100	<i>HhaI</i>	1,846,786
101	<i>CfoI</i>	1,846,786
102	<i>BstHII</i>	1,846,786
103	<i>AspLEI</i>	1,846,786
104	<i>UnbI</i>	1,714,818
105	<i>Sau96I</i>	1,714,818
106	<i>PspPI</i>	1,714,818
107	<i>FmuI</i>	1,714,818
108	<i>Cfr13I</i>	1,714,818
109	<i>BsiZI</i>	1,714,818
110	<i>AsuI</i>	1,714,818
111	<i>AspS9I</i>	1,714,818
112	<i>ThaI</i>	1,672,829
113	<i>SelI</i>	1,672,829
114	<i>MvnI</i>	1,672,829
115	<i>FnuDII</i>	1,672,829
116	<i>BstUI</i>	1,672,829
117	<i>BstFNI</i>	1,672,829
118	<i>Bsh1236I</i>	1,672,829
119	<i>AccII</i>	1,672,829
120	<i>TseI</i>	1,661,964
121	<i>Tsp45I</i>	1,549,697
122	<i>NmuCI</i>	1,549,697
123	<i>PspGI</i>	1,513,509
124	<i>Psp6I</i>	1,513,509
125	<i>MvaI</i>	1,513,509
126	<i>EcoRII</i>	1,513,509
127	<i>BstOI</i>	1,513,509
128	<i>BstNI</i>	1,513,509
129	<i>Bst2UI</i>	1,513,509
130	<i>BsiLI</i>	1,513,509
131	<i>BseBI</i>	1,513,509
132	<i>SspI</i>	1,504,883
133	<i>DraI</i>	1,390,799
134	<i>AhaIII</i>	1,390,799
135	<i>SduI</i>	1,301,391
136	<i>MhII</i>	1,301,391
137	<i>Bsp1286I</i>	1,301,391
138	<i>BmyI</i>	1,301,391
139	<i>Hpy99I</i>	1,275,398
140	<i>TatI</i>	1,185,571
141	<i>XceI</i>	1,123,515
142	<i>NspI</i>	1,123,515

Tabela 03 - Classificação das enzimas de restrição com número de corte no genoma maior que 1 milhão (fim)

143	<i>BstNSI</i>	1,123,515
144	<i>VpaK11BI</i>	1,073,095
145	<i>VpaK11AI</i>	1,073,095
146	<i>SinI</i>	1,073,095
147	<i>Psp03I</i>	1,073,095
148	<i>Eco47I</i>	1,073,095
149	<i>Bme18I</i>	1,073,095
150	<i>Avall</i>	1,073,095
151	<i>AflI</i>	1,073,095
152	<i>SmlI</i>	1,071,200
153	<i>SmiMI</i>	1,054,813
154	<i>MslI</i>	1,054,813

Tabela classificatória decrescente de acordo com o número de cortes que cada enzima do catálogo NEB é capaz de realizar e que foi obtida como resultado do código usado para classificação enzimática Bio Restriction Analysis.

A presença de metilação no DNA genômico pode inibir a atividade de algumas enzimas de restrição, dessa forma enzimas que possuíam sensibilidade a metilação também foram descartadas dessa seleção, assim restaram 19 enzimas. O próximo critério de seleção foi o tamanho do sítio de clivagem, ou seja, o número de bases nucleicas reconhecida por cada uma das enzimas, dessa forma enzimas que reconhecem sítios com mais de cinco pares de bases foram descartadas, restando 11 enzimas (apresentadas na tabela 04).

Por ordem classificatória, a primeira candidata para se utilizar na construção do plasmídeo foi a *HindI*, Essa enzima pode clivar (baseado na análise *in silico*) mais de 30 milhões de vezes o genoma de *Ae. aegypti* por apresentar um sítio de clivagem de apenas três pares de bases (CAC). Ela possui uma temperatura de ativação de 37 °C e é uma enzima de restrição do tipo I, definida como um grupo complexo, com múltiplas subunidades, que tem combinação enzimática do tipo restrição-e-modificação que corta o DNA em posições aleatórias e distantes do sítio de reconhecimento. Por esses motivos, a enzima *HindI* foi descartada e uma segunda classificação foi feita levando em consideração a menor temperatura de

clivagem, uma vez que todas as candidatas remanescentes são enzimas do tipo II. Assim, de acordo com a segunda classificação, apresentada na tabela 1, a candidata para utilização na construção do DNA do plasmídeo foi a endonuclease *CviAII*.

Tabela 04 - Classificação das endonucleases do catálogo NEB de acordo com o número de cortes no genoma de *Ae. aegypti* a temperatura de ativação

Posição	Enzima	Frequência de corte	T °C*	Tipo**
1	<i>HindI</i>	30.032.972	37	I
2	<i>CviAII</i>	4.645.879	25	II
3	<i>SeI</i>	1.672.829	26	II
4	<i>TspEI</i>	15.059.923	37	II
5	<i>CviTI</i>	12.095.603	37	II
6	<i>Tru9I</i>	8.779.417	37	II
7	<i>CviRI</i>	5.486.819	37	II
8	<i>AluI</i>	4.796.029	37	II
9	<i>BfaI</i>	2.962.089	37	II
10	<i>MspI</i>	2.225.385	37	II
11	<i>HaeIII</i>	1.980.700	37	II

A classificação levou em consideração o número de cortes que cada enzima seria capaz de fazer no genoma de *Ae. aegypti* usando o código Bio Restriction Analysis, seguido pelo do tipo de enzima e a temperatura de ativação. * - Temperatura de ativação e atividade. ** - Corresponde a classe de enzima descrito no catálogo NEB, este tipo de enzima é definido como um grupo complexo, de múltiplas subunidades, tem combinação enzimática tipo restrição-e-modificação que corta o DNA em posições aleatórias e distantes do sítio de reconhecimento; já enzimas do tipo II são as mais comuns e dependem apenas de magnésio para realizarem a clivagem.

A enzima de restrição *CviAII* reconhece um sítio de quatro pares de bases (CATG) essa endonuclease encontrada no Chlorovírus PBCV-I, vírus qual está associado a espécie *Paramecium bursaria* (VAN ETEN; DUNIGAN, 2012; ZHANG et al., 1992). Ela tem temperatura de ativação de 25 °C e não é sensível à metilação do tipo *dam*, *dcm* ou CpG. Quando exposta a 37 °C, essa endonuclease reduz sua atividade para apenas 20%. E de acordo com o código usado, essa enzima é capaz de clivar 4,6 milhões de vezes o genoma do mosquito *Ae. aegypti*.

Dessa forma, espera-se que após a clivagem do genoma nas células formadoras de esperma, que seja desencadeado o processo de morte celular por apoptose. Assim, os testículos não serão capazes de finalizar a formação dos espermatozoides, ou que esses sejam defeituosos. Gerando um quadro de esterilidade nesses machos portadores dessa construção. A construção final com todos os elementos é apresentada na figura 10.

Todavia esta construção por ter tomado mais tempo do que imaginado para sua síntese não foi possível realizar as microinjeções a tempo de incluir seus resultados.

Figura 10 - Mapa da construção do plasmídeo de transformação para *Ae. aegypti* pMos com o elemento de esterilidade via *Cvi*AI

Mapa do plasmídeo pMos com a construção de *Cvi*AI. Sendo 3XP3 promotor específico de olhos que expressa a proteína DsRed (fluorescente vermelha), o sítio de ligação do fator de transcrição tetO, seguido da enzima de restrição, a endonuclease *Cvi*AI, o promotor β 2-tubulina que será responsável pela expressão contínua do ativador de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV) seguido pela porção 3'UTR do SV40.

4.2.1 Sinal de Localização Nuclear

Visto que a enzima CviAll não havia sido utilizada anteriormente para expressão em construções transgênicas, decidiu-se utilizar um sinal de localização nuclear para direcionar o local em que esta enzima deve atuar. Assim foi realizada uma busca de peptídeos utilizados como Sinal de Localização Nuclear (NLS) e o NLS do vírus SV40 foi o sinal mais frequentemente encontrado e usado em diferentes abordagens. A sequência de 21 bp que corresponde a sequência peptídica PKKKRKV foi obtida no banco de dados GenBank.

4.3 Antagonista de IAP – Michelob_x

Embora a atividade transcricional de caspases e IAP seja constante e constitutiva no corpo do inseto, para Mx a expressão é restrita. Sendo apenas para células destinadas a morrerem durante a fase de desenvolvimento ou em resposta a estímulo citotóxico, por exemplo, radiação ionizante (ZHOU et al., 2005). Mesmo frente esse quadro de especificidade, e a fim de diferenciar a expressão de Mx produzida naturalmente por seu promotor original de uma Mx produzida pelo promotor de β 2-tubulina, foram trocadas duas bases na posição 177 e 178 da sequência de ácidos nucleicos, essa troca não altera a conformação tridimensional da enzima e nem sua atividade, pois se trata de uma mutação neutra. Dessa forma, utilizando iniciadores (*primers*) específicos foi possível identificar indivíduos que estivessem produzindo Mx via construção transgênica daquela de origem endógena. Essa troca pode ser facilmente visualizada na figura 11 onde no destaque é apresentado o local onde foi realizada a troca para diferenciar as duas Mx e os *primers* utilizados apresentados na tabela 01. A construção final com todos os elementos incluindo a M_X alterada é apresentada na figura 12.

Figura 11 - Alinhamento entre as sequências de michelob_x transgênica (Mx-T) e endógena (Mx-E) e a posição dos primers

Alinhamento entre as duas sequências de michelob_x mostrando o sítio diferencial entre aquela produzida pela construção transgênica (Mutated M_X) e a endógena (Endogenous M_X) pelo destaque em vermelho; e a posição dos primers para amplificação específica do fragmento produzido pelas duas vias (transgênica e original).

Figura 12 - Mapa da construção do plasmídeo de transformação para *Ae. aegypti* pMos com o elemento esterilidade via Mx-T.

Mapa do plasmídeo pMos com a construção de michelob_x entre os braços do elemento de transposição. Sendo 3XP3 promotor específico de olhos que vai expressar a proteína DsRed (fluorescente vermelha), o sítio de ligação do fator de transcrição ttO, seguido do antagonista de inibidor de apoptose (Mx-T), o promotor β 2-tubulina que será responsável pela expressão contínua do ativador de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV) seguido pela porção 3'UTR (SV40).

4.3.1 Microinjeção da construção de pMos_3XP3_DsRed_Mx_SCC em ovos embrionados

Com a síntese comercial do plasmídeo finalizada e entregue, o plasmídeo foi submetido à transformação em célula competente seguido de amplificação e purificação utilizando o kit EndroFree® Plasmid Purification (Qiagen, Alemanha) conforme descrito no item 3.3.1.1 e seguindo o protocolo do fabricante. A solução de injeção foi preparada como descrito no item 3.3.1.2 e os ovos foram alinhados e microinjetados como descrito no item 3.3.1.3. Um total de quatro lotes de injeção totalizando em 1.708 ovos injetados. Desses ovos, 181 larvas sobreviveram ao processo de microinjeção, o que representa uma taxa de sobrevivência de 10,6% (tabela 05). A partir dessas larvas, aguardou-se a emergência do adulto e 117 cruzamentos foram montados conforme descrito no item 3.4.1, sendo 105 formados por famílias de machos e 12 cruzamentos formados por até 10 fêmeas injetadas cada. Em seis desses cruzamentos foram obtidos indivíduos portadores da marcação transgênica, sendo então possível estabelecer seis linhagens transgênicas nomeadas de acordo com o código do cruzamento: MFA07, MPD02, MPD01, MFDX, MPC02 e MPC03.

Tabela 05 - Detalhamento dos lotes de microinjeção da construção de Mx e obtenção de linhagens transgênicas

Lote de Injeção	Ovos injetados	Larvas sobreviventes	Taxa de sobrevivência	Linhagens Transgênicas
A	389	11	2,8%	0
B	276	18	6,5%	1
C	698	90	12,9%	2
D	345	62	18%	3
Total	1.708	181	10,6%	6

Detalhamento dos lotes de injeção utilizando a construção pMos_3XP3_DsRed_SCC_Mx. Com o total de ovos injetados, total de larvas sobreviventes ao processo de microinjeção, além da determinação da taxa de sobrevivência e da quantidade de linhagens transgênicas obtidas para cada lote de injeção.

4.3.2 Caracterização molecular

Com o estabelecimento das linhagens transgênicas, faz-se necessária a caracterização molecular dessas linhagens a fim de saber se ocorre transcrição da construção como esperado. Para responder essa questão foi utilizada a técnica de RT-PCR, reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase para mostrar o perfil transcricional da construção em diferentes fases do desenvolvimento.

Para a construção pMos_3XP3_DsRed_Mx_SCC foram obtidas seis linhagens transgênicas. O RNA total foi extraído em diferentes fases de desenvolvimento do mosquito para cada uma das linhagens, larvas L2, L3 e L4, pupa macho (PM), pupa fêmea (PF), adulto macho (AM) e adulto fêmea (AF). Para nenhuma das amostras coletadas de todas as linhagens usadas nesse experimento se observou amplificação para o fragmento de Mx de origem endógena – Mx-E. Visto que esse processo se trata de regulação de via apoptótica e que esse antagonista tem papel importante na ativação desse processo, era de se esperar que não houvesse amplificação da Mx-E (WANG; CLEM, 2011; WANG et al., 2008; ZHOU et al., 2005).

A linhagem MFA07 apresentou amplificação do fragmento do gene de actina 1 no tamanho esperado (150 bp) para todas as amostras utilizadas (figura 13). Já para o gene de β 2-tubulina houve amplificação apenas nas amostras de PM e AM, como esperado pelo perfil anteriormente demonstrado no item 4.1.1 com 350 bp. A Mx-T apresentou bandas de tamanho esperado de 150 bp e adicionalmente bandas nas amostras de fêmeas (pupas e adultos) que não era esperado (figura 13). Todavia essa pode ser uma falha no sistema de expressão gerado pelo promotor mínimo (originalmente o promotor do gene HSP70 – *Heat Shock Protein 70*) inserido logo após o elemento regulador tetO. Esse promotor mínimo pode ser capaz de promover uma expressão em níveis basais desse transcrito sem necessidade dos demais componentes regulatórios (CORBY-HARRIS et al., 2010; MOREIRA et al., 2000, 2002; PINDYURIN et al., 2016).

Figura 13 - Perfil de transcrição dos genes de actina 1, β 2-tubulina e Mx-T para todas as diferentes linhagens transgênicas

Gel de agarose 1% com bandas dos fragmentos amplificados mostrando a expressão do gene de actina (Act-1) com amplificação de fragmento de 150 pb, do gene de β 2-tubulina (B2-tub) com amplificação de fragmento de 350 pb e do gene de michelob_x de origem transgênica (Mx-T) com amplificação de fragmento de 150 pb para todas as linhagens transgênicas.

A linhagem MPD01 apresentou amplificação do fragmento do gene de actina 1 no tamanho esperado (150 bp) para todas as amostras utilizadas (figura 13). E para o gene de β 2-tubulina houve amplificação nas amostras de PM e AM, como esperado (figura 13). Por outro lado, para o gene Mx-T não houve expressão transcricional desse gene por não apresentar bandas em nenhuma das amostras coletadas (figura 13). Outros estudos mostram que mesmo com a obtenção de linhagens transgênicas algumas deixam de produzir a característica inserida, mesmo apresentando a marcação gerada pelo gene marcador (FRANZ et al., 2009; HANDLER, 2004).

A linhagem MPC03, por sua vez, também apresentou amplificação do fragmento do gene de actina 1 no tamanho esperado (150 bp) para as amostras utilizadas (figura 13). Para o gene de β 2-tubulina houve amplificação apenas nas amostras de PM e AM, assim como na linhagem anterior e também pelo perfil anteriormente demonstrado no item 4.1.1 (figura 13) com 350 bp. O gene Mx-T apresentou bandas no tamanho esperado de 150 bp para as amostras de pupa macho e de fêmeas e bandas mais sutis nas amostras de adultos

(machos e fêmeas – figura 13). Como reportado anteriormente, essa expressão em fêmeas (pupas e adultos) pode ser decorrente da falha no sistema de expressão causado pelo promotor mínimo inserido logo após o elemento regulador tetO. Causando uma expressão contínua desse transcrito.

No que diz respeito a linhagem MPC02, ela apresentou amplificação do fragmento do gene de actina 1 no tamanho esperado (150 bp) para todas as amostras utilizadas (figura 13). Enquanto que o gene de β 2-tubulina houve amplificação apenas nas amostras PM e AM, novamente como esperado (figura 13). Mx-T apresentou bandas de tamanho esperado de 350 bp nas amostras PM, PF, AM e AF. Novamente, as bandas nas amostras de fêmeas (pupas e adultos) podem ser a mesma falha no sistema de expressão anteriormente apresentado e gerado pelo promotor mínimo (figura 13).

A linhagem MFDX apresentou amplificação do fragmento do gene de actina 1 no tamanho esperado (150 bp) para todas as amostras utilizadas (figura 13). Já para o gene de β 2-tubulina houve amplificação de 350 bp apenas nas amostras de PM e AM (figura 13). Para Mx-T houve amplificação dos fragmentos e bandas no tamanho esperado de 150 bp para as amostras L4, PM e AM, e não houve amplificação para as demais amostras (figura 13).

A linhagem MPD02 apresentou amplificação do fragmento do gene de actina 1 no tamanho esperado (150 bp) para todas as amostras utilizadas (figura 13). Para o gene de β 2-tubulina houve amplificação apenas nas amostras de PM e AM, como esperado pelo perfil, mostrado na figura 13 com amplificação de 350 bp. A amplificação do fragmento na amostra L3 e L4 pode ser explicada pela composição da amostra, que se deu de forma aleatória usando 10 larvas. De acordo com literatura, larvas de terceiro estadió já são aptas a iniciarem a espermatogênese (se forem macho) e, portanto expressarem β 2-tubulina. Como a distinção morfológica sexual em larvas nesse estadió não é possível, não se pode afirmar que todas as amostras pertenciam ao mesmo sexo. Assim durante a extração de

RNA total podem ter sido selecionadas larvas tanto de machos, como de fêmeas para a mesma amostra (CHRISTOPHERS, 1960; SMITH et al., 2007).

O gene Mx-T apresentou amplificação do fragmento e bandas de tamanho esperado de 150 bp para as amostras L3, PM e AM, esse perfil corresponde comparativamente de forma similar ao esperado para o gene de $\beta 2$ -tubulina, onde apenas os indivíduos macho apresentariam amplificação do fragmento - o mesmo ocorreu com a linhagem MFDX, anteriormente apresentada. A amplificação na fase larval tanto para a linhagem MFDX e MPD02 pode se explicar da mesma forma que as amplificações apresentadas para o gene de $\beta 2$ -tubulina, onde não se pode determinar o gênero sexual morfológicamente.

4.3.3 *Linhagem homozigótica*

A partir dos mosquitos transgênicos encontrados de cada cruzamento foram estabelecidas colônias a fim de aumentar a quantidade de insetos portadores da construção transgênica ao longo das gerações. Portanto, semanalmente os ovos eram submetidos para eclosão das larvas, e essas passavam pelo processo de triagem sob luz fluorescente. Esse processo se repetiu ao longo das gerações para selecionar apenas os transgênicos. Na tabela 06 é possível observar o aumento da taxa de indivíduos transgênicos ao longo das gerações. Entretanto até o presente momento não foram estabelecidas linhagens em plena homozigose, todas se encontram em processo de contínua seleção e estabelecimento.

Para as linhagens mais recentes - MFDX, MPD02 e MPD01 – a taxa de homozigose ainda é baixa quando comparada com as demais linhagens devido a terem sido obtidas tardiamente, o que é possível observar na tabela 06 por essas linhagens ainda não terem atingido a sétima geração pós estabelecimento da colônia transgênica.

Tabela 06 - Porcentagem de larvas transgênicas durante seleção de indivíduos com marcação

Linhagem	Geração					
	F2	F3	F4	F5	F6	F7
MFA07	20%	35%	45%	55%	70%	85%
MPC02	20%	40%	50%	55%	65%	70%
MPC03	25%	45%	60%	70%	75%	90%
MPD02	20%	35%	40%	55%	60%	- *
MPD01	15%	25%	30%	40%	50%	- *
MFDX	20%	35%	40%	55%	65%	- *

Porcentagem de indivíduos portadores da marcação transgênica no montante observado para obtenção de ovos da próxima geração. * - linhagens recentemente obtidas que ainda não alcançaram a sétima geração.

4.3.4 Desafio de Esterilidade

A linhagem MPD01 não foi utilizada para o desafio de esterilidade por não ter apresentado amplificação dos fragmentos de cDNA do gene regulado pela construção transgênica através da análise molecular executada e mostrada anteriormente no item 4.3.2.2. Para as demais linhagens, foi seguido o processo descrito no item 3.7. E apenas as fêmeas ingurgitadas, ou seja, que se alimentaram completamente de sangue, foram usadas nesse processo.

Para a linhagem MFA07, das 150 fêmeas usadas, apenas 66 fêmeas realizaram postura de ovos (representando 44% do total de fêmeas). A linhagem apresentou uma média de 100,2 ovos por fêmea – fecundidade (Intervalo de Confiança a 95% (IC) de 88,3 a 112,2); o controle experimental que usou apenas a linhagem não transformada teve uma fecundidade de 111,3 ovos (IC 95% de 102,6 a 120). Quando comparados esses dois grupos com o teste t, eles não apresentaram diferença estatisticamente significativa apresentando um valor de $P = 0,097$ como mostrado no gráfico 01.

Gráfico 01 - Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem MFA07

Teste de esterilidade realizado entre a linhagem transgênica MFA07 e linhagem tipo selvagem Higgs (CTRL), apresentando o número de ovos/fêmea ($p = 0,097$) e o número de larvas/fêmea de cada uma das linhagens ($p = 0,213$). Em ambos os casos não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Em relação a avaliação da esterilidade via taxa de eclosão desses ovos depositados, para a linhagem MFA07 houve uma média do número de larvas por fêmea de 56 larvas, enquanto que para o controle foi de 59,4 como mostra o gráfico 01. Esses não apresentaram diferença estatística usando teste t com valor de $p = 0,213$.

Para a linhagem MPC03, das 150 fêmeas usadas, apenas 104 fêmeas realizaram postura de ovos nas condições oferecidas (representando 69,3% do total de fêmeas). Isso correspondeu a uma média de 111,9 ovos por fêmea (IC 95% de 104,6 a 119,2); o controle experimental, como apresentado anteriormente teve uma média de ovos depositados de 111,3 ovos por fêmea (IC 95% de 102,6 a 120). Quando comparados os grupos com o teste t, eles não apresentaram diferença

estatisticamente significativa apresentando valor de $p = 0,875$, como mostrado no gráfico 02.

Para a linhagem MPC03 houve uma média do número de larvas por fêmea de 62,2 larvas, enquanto que para o controle foi de 59,4 como mostra o gráfico 02. Esta linhagem também não apresentou diferença estatística usando teste t com valor de $p = 0,645$.

Gráfico 02 - Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem MPC03

Teste de esterilidade realizado entre a linhagem transgênica MPC03 e linhagem tipo selvagem Higgs (CTRL), apresentando o número de ovos/fêmea ($p = 0,875$) e o número de larvas/fêmea ($p = 0,645$) de cada uma das linhagens. Em ambos os casos não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Para a linhagem MPC02, das 150 fêmeas usadas, apenas 71 fêmeas realizaram postura de ovos nas condições oferecidas (representando 47,3% do total das fêmeas). Isso correspondeu a uma média de 89,9 ovos por fêmea (IC95% de 80 a 99,93); o controle experimental, como apresentado anteriormente teve uma média de ovos depositados de 111,3 ovos por fêmea (IC 95% de 102,6 a 120). Quando

comparados os grupos com o teste t, eles apresentaram diferença estatisticamente significativa com valor de $p = 0,001$ como mostrado no gráfico 03.

A linhagem MPC02 obteve uma média de número de larvas por fêmea de 42,86 larvas, enquanto que para o controle foi de 59,4 como mostra o gráfico 03. Assim como para o número de ovos, esta linhagem também apresentou diferença estatística usando teste t com valor de $p = 0,002$.

Gráfico 03 - Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem MPC02

Teste de esterilidade realizado entre a linhagem transgênica MPC02 e linhagem tipo selvagem Higgs (CTRL), apresentando o número de ovos/fêmea ($p = 0,001$) e o número de larvas/fêmea ($p = 0,002$) de cada uma das linhagens. Em ambos os casos houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Para a linhagem MFDX, das 150 fêmeas usadas, apenas 49 fêmeas realizaram portura de ovos nas condições oferecidas (representando 32,7% do total de fêmeas). Isso correspondeu a uma média de 102,3 ovos por fêmea (IC95% de 87,2 a 117,3); o controle experimental, como apresentado anteriormente teve uma média de ovos depositados de 111,3 ovos por fêmea (IC 95% de 102,6 a 120). Quando comparados os grupos com o teste t, eles não apresentaram diferença estatisticamente significativa com valor de $p = 0,567$, como mostrado no gráfico 04.

A avaliação da esterilidade via taxa de eclosão desses ovos depositados, para a linhagem MFDX apresentou fecundidade de 33,4, enquanto que para o controle foi de 59,4 como mostra o gráfico 04. Dessa forma esta linhagem apresenta diferença estatística usando teste t com valor de p igual a 0,0003.

Gráfico 04 - Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem MFDX

Teste de esterilidade realizado entre a linhagem transgênica MFDX e linhagem tipo selvagem Higgs (CTRL), apresentando o número de ovos/fêmea ($p = 0,567$) e o número de larvas/fêmea ($p = 0,0003$) de cada uma das linhagens. Não houve diferença estatisticamente significativa para fecundidade mas a fertilidade apresentou diferença significativa.

Para a linhagem MPD02, das 150 fêmeas usadas, apenas 40 fêmeas realizaram portura de ovos nas condições oferecidas. Isso correspondeu a uma média de 111,7 ovos por fêmea (IC95% de 94 a 129,3); o controle experimental, como apresentado anteriormente teve uma média de ovos depositados de 111,3 ovos por fêmea (IC 95% de 102,6 a 120). A fecundidade comparada dos grupos através do teste t, não apresenta diferença estatisticamente significativa com valor de $p = 0,334$ como mostrado no gráfico 05.

A avaliação da esterilidade via determinação da fertilidade, para a linhagem MPD02 apresentou uma média do número de larvas por fêmea de 22,5 larvas, enquanto que para o controle foi de 59,4 como mostra o gráfico 05. Dessa forma esta linhagem apresenta diferença estatística usando teste t com valor de $p < 0,0001$.

Gráfico 05 - Teste de esterilidade em heterozigose em relação ao controle da linhagem MPD02

Teste de esterilidade realizado entre a linhagem transgênica MPD02 e linhagem tipo selvagem Higgs (CTRL), apresentando o número de ovos/fêmea ($p = 0,334$) e o número de larvas/fêmea ($p < 0,0001$) de cada uma das linhagens. Não houve diferença estatisticamente significativa para fecundidade mas a fertilidade apresentou diferença significativa.

De forma geral, ao avaliar a taxa de eclosão entre as diferentes linhagens transgênicas em relação a linhagem controle (não transformada) usando análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis, existe diferença estatisticamente significativa com valor de p menor que 0,0001. As únicas linhagens que apresentaram diferença significativa em relação ao controle foram as linhagens MPD02 e MFDX como mostrado no gráfico 06 pelo teste de comparação múltipla de Dunn (teste de médias). A linhagem MPC02, que no teste t apresentou diferença

significativa em relação ao controle, usando teste Kruskal-Wallis essa diferença não foi observada (gráfico 06).

Gráfico 06 - Taxa de eclosão entre as linhagens transgênica e a linhagem controle

Taxa de eclosão (fertilidade) obtida pela razão entre o número de larvas/fêmea e o número de ovos/fêmea de cada uma das linhagens transgênicas, MFA07, MPC03, MPC02, MFDX e MPD02 e da linhagem controle Higgs (CTRL). A diferença estatística se deu entre o controle e as linhagens MFDX (**) e MPD02 (***) com $p > 0,0001$.

Dentre os resultados obtidos as linhagens MFA07 e MPC03 não apresentaram diferença estatística no que diz respeito o número de ovos e ao número de larvas, assim como para a taxa de eclosão, assim sendo essas linhagens não apresentam o efeito esperado de esterilidade previsto pela construção transgênica inserida no genoma desses insetos. Linhagens portadoras de outras construções deste e de outros laboratórios comumente apresentam esse tipo de efeito, as causas que podem gerar esse efeito podem ser diversos, desde efeito posicional no genoma do inseto, por exemplo região de heterocromatina, onde ocorre pouca ou nenhuma transcrição. Outra hipótese é que tenha ocorrido um grande número de inserções no mesmo local e acabou se formando uma região de heterocromatina (DORER, 1994; ELGIN, 1996).

Em relação a fecundidade, o número de ovos depositados por cada fêmea, não era esperado que houvesse diferença significativa entre as linhagens transgênicas quando comparadas ao controle. Essa hipótese está baseada no fato de que mesmo não ocorrendo cópula, fêmeas que realizaram repasto sanguíneo ainda são capazes de depositar ovos nos criadouros; embora estes não sejam viáveis, por não estarem fecundados não ocorre a eclosão de larvas (FORATTINI, 2002).

Todavia linhagem MPC02 foi a única que apresentou diferença significativa tanto na fecundidade quanto na fertilidade. Essa redução da fecundidade pode estar relacionada a redução na aptidão (*fitness*) dessa linhagem o que leva a ter parâmetros diferentes do que se é esperado pela linhagem controle não transformada. Esses parâmetros para determinação da redução de *fitness* já foram discutidos para outras linhagens transgênicas e não é incomum que ocorra em organismos geneticamente modificados. A avaliação do *fitness* é realizada sempre que se comprova a eficiência de uma linhagem diante do papel que foi estabelecido com a construção inserida e que determina se a linhagem é competitivamente favorável a ser utilizada em liberações de condição de gaiolas de campo ou no ambiente (AMENYA et al., 2010; CATTERUCCIA; GODFRAY; CRISANTI, 2003; IRVIN et al., 2004; MARRELLI et al., 2006; SCOTT et al., 2006).

No que diz respeito a promoção de esterilidade em machos de *Ae. aegypti* via transgenia, ao observar a tabela 07 é possível identificar que as linhagens MFA07, MPC03, não somente apresentaram nenhum efeito estéril, como elas apresentam um ligeiro aumento em relação ao controle, mas como mencionado anteriormente não há diferença estatisticamente significativa. A linhagem MPC02, embora apresente algum efeito de esterilidade com redução de 8,4% não pode ser

considerada como efeito da molécula efetora, uma vez que a fecundidade também apresentou redução que não era esperada, por esse motivo essa linhagem foi considerada como negativa para o efeito de esterilidade gerada unicamente pela molécula efetora usada.

Tabela 07 - Linhagens transgênicas em relação ao número total e médio de ovos e larvas

Linhagem	Total de ovos (média)	Total de Larvas (média)	Taxa de Eclosão (IC 95%)	Redução (esterilidade)*
Controle	10.575 (111,3)	5.644 (59,4)	48,9% (42,2-55,6)	-
MFA07	6.715 (100,2)	3.752 (56,0)	48,4% (40-56,7)	+ 4,7%
MPC03	5.215 (102,3)	1.705 (33,4)	52,4% (46,4-58,5)	+ 4,3%
MPC02	6.841 (88,8)	3.343 (43,4)	41,3% (33,3-49,2)	- 8,4%
MFDX	11.972 (111,9)	6.662 (62,3)	30% (21,8-38,3)	- 38,7%
MPD02	4.578 (111,7)	921 (22,5)	17,4% (10,6-24,2)	- 62,3%

Número total de ovos e de larvas obtidos para cada uma das linhagens utilizadas nesse experimento além da média de ovos por fêmea e média de larvas eclodidas por fêmea. Além da taxa de eclosão geral obtida para cada linhagem com os respectivos intervalos de confiança a 95%. * - valores correspondentes a porcentagem diferencial entre a taxa de eclosão da linhagem controle em relação a cada linhagem transgênica.

Por outro lado, as linhagens MFDX e MPD02 apresentaram resultados promissores no que diz respeito a geração de esterilidade na ausência de tetraciclina. Essas linhagens apresentaram esterilidade de 38,7% e 62,3% respectivamente, na condição de heterozigose (tabela 06) como apresentado na tabela 07. Estudos similares com linhagens em completa homozigose apresentam resultados que apontam para 100% de esterilidade em cruzamentos realizados de forma similar em uma espécie do gênero *Anopheles* (KLEIN et al., 2012; WINDBICHLER; PAPATHANOS; CRISANTI, 2008). O aumento na frequência de alguns alelos em alguns casos pode aumentar a expressão da construção ou do gene de interesse, dessa forma, linhagens que apresentem, nesse caso as duas cópias do gene no cromossomo onde ocorreu a inserção, pode aumentar a

expressão resultando em esterilidade completa como foi visto nos trabalhos em anofelinos que utilizaram linhagens homozigotas (KLEIN et al., 2012; WINDBICHLER; PAPATHANOS; CRISANTI, 2008; ZHOU et al., 2011)

5 CONCLUSÃO

A partir do resultado obtido do desafio de esterilidade pela expressão de *micelob_x* regida pelo promotor de $\beta 2$ -tubulina em linhagens transformadas e estáveis de mosquitos da *Ae aegypti* nos leva a concluir que existe a necessidade um entendimento mais aprofundado sobre a dinâmica da espermatogênese e o papel da apoptose nesse processo e como aumentar a eficiência desse sistema sem reduzir a aptidão (*fitness*) da linhagem.

Todavia, os resultados nos encorajam a prosseguir com os estudos e estabelecer linhagens em completa homozigose e para repetir o desafio de esterilidade aqui apresentado, pois nessa situação onde não existirá a possibilidade de ter indivíduos portadores de espermatozoides viáveis, e que são parcialmente capazes de fecundarem as fêmeas e consequentemente deixando prole viável. Adicionalmente, existe a necessidade prosseguir com as microinjeções da segunda construção que utiliza a endonuclease *CviAI* e testar também sua eficiência em promover esterilidade em machos de *Ae. aegypti*.

Este trabalho abre uma nova oportunidade de manipulação que poderá ser empregada em conjunto com outras linhagens e estratégias de controle de vetores que tenham como objetivo reduzir o número de casos de transmissão de doenças vinculadas a esse vetor em especial.

REFERÊNCIAS*

- 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, n. 1, p. 1–10, abr. 2002.
- ALPHEY, L. et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 10, n. 3, p. 295–311, abr. 2010.
- AMENYA, D. A. et al. Comparative fitness assessment of *Anopheles stephensi* transgenic lines receptive to site-specific integration. **Insect Mol. Biol.**, v. 19, n. 2, p. 263–269, abr. 2010.
- ARAÚJO, A. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 1, p. 297–306, 2013.
- ARAÚJO, H. et al. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 11 jun. 2015.
- ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Codon preference of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Insect Mol. Biol.**, v. 1, n. 4, p. 189–194, maio 1993.
- ASMAN, S. M.; MCDONALD, P. T.; PROUT, T. Field studies of genetic control systems for mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 26, p. 289–318, jan. 1981.
- AUGELLO, C. et al. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**, v. 9, p. 125, jan. 2009.
- AZEVEDO, D. S. **Characterization of actin expression profile in *Aedes aegypti***. [s.l.] Universidade de São Paulo, 4 jun. 2014.
- BAIRD, G. S.; ZACHARIAS, D. A.; TSIEN, R. Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 22, p. 11984–1189, 24 out. 2000.
- BARGIELOWSKI, I. et al. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20699, jan. 2011.
- BARGIELOWSKI, I.; ALPHEY, L.; KOELLA, J. C. Cost of mating and insemination capacity of a genetically modified mosquito *Aedes aegypti* OX513A compared to its wild type counterpart. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26086, jan. 2011.

* - De acordo com:

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

BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Mol. Ecol.**, v. 15, n. 11, p. 3087–113, out. 2006.

BENEDICT, M. Q. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 8, p. 349–355, ago. 2003.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D26–31, jan. 2009.

CAMPBELL, L. P. et al. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. **Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.**, 2015.

CANTON, P. E. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 595–600, mar. 2011.

CARVALHO, D. O. et al. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **J. Vis. Exp.**, n. 83, p. 1–10, jan. 2014.

CARVALHO, D. O. et al. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 7, p. e0003864, jul. 2015.

CARVALHO, M. S. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Rev. Saúde Públ.**, v. 38, n. 5, p. 623–629, out. 2004.

CATTERUCCIA, F.; BENTON, J. P.; CRISANTI, A. An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 11, p. 1414–7, nov. 2005.

CATTERUCCIA, F.; CRISANTI, A.; WIMMER, E. A. Transgenic technologies to induce sterility. **Malar. J.**, v. 8 Suppl 2, p. S7, jan. 2009.

CATTERUCCIA, F.; GODFRAY, H. C. J.; CRISANTI, A. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5610, p. 1225–7, 21 fev. 2003.

CHRISTOPHERS, R. ***Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure**. 2009. ed. Cambridge: London : The Syndics of the Cambridge University Press, Bentley House, 200, Euston Road, N.W.I., 1960.

COATES, C. J. et al. Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, n. 7, p. 3748–3751, 31 mar. 1998.

COATES, C. J. et al. Purified mariner (Mos1) transposase catalyzes the integration of marked elements into the germ-line of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 11, p. 1003–1008, nov. 2000.

COLLI, W. Organismos Transgênicos no Brasil: regular ou desregular? **Rev. USP**, v. n.89, p. 148–173, 2011.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1^o. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1998.

CORBY-HARRIS, V. et al. Activation of akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–10, 2010.

DORER, D. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. **Cell**, v. 77, n. 7, p. 993–1002, 1 jul. 1994.

DYCK, V. et al. History of the Sterile Insect Technique. In: **Sterile Insect Technique**. [s.l.] Springer Netherlands, 2005. p. 3–36.

EDWARDS, R.; CHERVITZ, S. **Bi::Restriction::Analysis**, 2003. Disponível em: <<http://search.cpan.org/~cjfields/BioPerl-1.6.924/Bio/Restriction/Analysis.pm#COPYRIGHT>>. Acesso em: 16 fev. 2015

ELGIN, S. C. R. Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 6, n. 2, p. 193–202, abr. 1996.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica - Princípios gerais, morfologia e glossário taxonômico**. 1. ed. São Paulo: EdUSP, 1996. v. 1

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia**. 1. ed. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2

FRANZ, A. W. E. et al. Stability and loss of a virus resistance phenotype over time in transgenic mosquitoes harbouring an antiviral effector gene. **Insect Mol. Biol.**, v. 18, n. 5, p. 661–672, out. 2009.

FU, G. et al. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 3, p. 353–357, 2007.

FU, G. et al. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 107, n. 10, p. 4550–4554, 2010.

FURTH, P. A. et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 20, p. 9302–9306, 27 set. 1994.

GALBAN, S.; BRADY, G. F.; DUCKETT, C. S. Caspases and IAPs: a dance of death ensures cell survival. **Mol. Cell**, v. 32, n. 4, p. 462–463, 21 nov. 2008.

GONG, P. et al. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 4, p. 453–456, abr. 2005.

GOSSEN, M. et al. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 5, n. 5, p. 516–520, 1994.

GOSSEN, M.; BUJARD, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 89, n. 12, p. 5547–5551, 1992.

GROSS, L. A. et al. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 22, p. 11990–11995, 2000.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. in, n. 5, p. 319–330, 2004.

GURUGAMA, P. et al. Dengue viral infections. **Indian J. Dermatol.**, v. 55, n. 1, p. 68–78, jan. 2010.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S40–42, nov. 2010.

HANDLER, A. M. Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. **Genetica**, v. 116, n. 1, p. 137–149, 2002.

HANDLER, A. M. Understanding and improving transgene stability and expression in insects for SIT and conditional lethal release programs. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 34, n. 2, p. 121–130, fev. 2004.

HARRELL, R. **Embryo Microinjections: High Tech, Low Tech?** Disponível em: <<http://igtrcn.org/embryo-microinjections-high-tech-low-tech/>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

HARRIS, A. F. et al. Field performance of engineered male mosquitoes. **Nat. Biotechnol.**, v. 29, n. 11, p. 1034–1037, 2011.

HARRIS, A. F. et al. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nat. Biotechnol.**, v. 30, n. 9, p. 828–830, 10 set. 2012.

HAY, B. A. et al. Engineering the genomes of wild insect populations: challenges, and opportunities provided by synthetic Medea selfish genetic elements. **J. Insect Physiol.**, v. 56, n. 10, p. 1402–1413, out. 2010.

HEMINGWAY, J. et al. The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 7, p. 308–312, jul. 2006.

HORN, C.; WIMMER, E. A. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 1, p. 64–70, jan. 2003.

HOY, M. A. **Analysis of Risks of Transgenic Insects for Pest Management: Past and Future Guidelines** (I. S. for B. Research, P. University, C. N. C. for B. Development, Eds.) **The 7th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms** Beijing, China, 2002.

- IRVIN, N. et al. Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, n. 3, p. 891–896, 2004.
- IVICS, Z. et al. Sleeping Beauty transposon mutagenesis in rat spermatogonial stem cells. **Nat. Protoc.**, v. 6, n. 10, p. 1521–1535, 8 set. 2011.
- JASINSKIENE, N. et al. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, n. 7, p. 3743–3747, 31 mar. 1998.
- JASINSKIENE, N.; JUHN, J.; JAMES, A. A. Microinjection of *A. aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes. **J Vis Exp**, n. 5, p. 219, jan. 2007.
- JUNG, S.-K.; MCDONALD, K. Visual gene developer: a fully programmable bioinformatics software for synthetic gene optimization. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 340, 2011.
- KLEIN, T. A. et al. Infertility resulting from transgenic I-Ppol male *Anopheles gambiae* in large cage trials. **Pathog. Glob. Health**, v. 106, n. 1, p. 20–31, mar. 2012.
- KNIPLING, E. F. Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. **J Econ Entomol**, v. 48, n. 4, p. 459–462, 1955.
- KNIPLING, E. F. et al. Genetic control of insects of public health importance. **Bull. World Health Organ.**, v. 38, n. 3, p. 421–438, jan. 1968.
- LAWSON, D. et al. VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D503–505, 12 jan. 2007.
- LAWSON, D. et al. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D583–587, 1 jan. 2009.
- LUZ, P. M. et al. Dengue vector control strategies in an urban setting: an economic modelling assessment. **J. Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1673–1680, 2011.
- LYCETT, G. J.; KAFATOS, F. C.; LOUKERIS, T. G. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1781–1790, 2004.
- MACORIS, M. L. et al. [Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil]. **Rev. Saúde Públ.**, v. 33, n. 5, p. 521–522, out. 1999.
- MARDULYN, P. et al. Climate change and the spread of vector-borne diseases: using approximate Bayesian computation to compare invasion scenarios for the bluetongue virus vector *Culicoides imicola* in Italy. **Mol. Ecol.**, 15 mar. 2013.

MARRELLI, M. T. et al. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 5, p. 197–202, maio 2006.

MASSAD, E.; COUTINHO, F. A. B. The cost of dengue control. **J. Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1630–1631, 14 maio 2011.

MCGRANE, V. et al. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, n. 5, p. 502–510, dez. 1988.

MCWILLIAM, H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W597–600, 1 jul. 2013.

MEDLOCK, J. et al. The impact of transgenic mosquitoes on dengue virulence to humans and mosquitoes. **Am. Nat.**, v. 174, n. 4, p. 565–577, 2009.

MEGY, K. et al. VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D729–734, 1 jan. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Assunto : Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil - NOTA TÉCNICA CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. v. 22, p. 1–5, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. 2nd. ed. Brasília: [s.n.].

MOREIRA, L. A. et al. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 20, p. 10895–10898, 26 set. 2000.

MOREIRA, L. A. et al. Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 13, p. 1599–1605, 2002.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718–23, 22 jun. 2007.

NIELSEN, M. G.; GADAGKAR, S. R.; GUTZWILLER, L. Tubulin evolution in insects: gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. **BMC Evol. Biol.**, v. 10, p. 113, jan. 2010.

OLIVEIRA, S. L.; CARVALHO, D. O.; CAPURRO, M. L. Transgenic mosquito: from paper to reality. **Rev. Biolog.**, v. 6, n. b, p. 38–43, 2011.

PARIS, M. et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest Manag. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 122–8, jan. 2010.

PARIS, M.; DAVID, J.; DESPRES, L. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1184–94, ago. 2011.

PHUC, H. K. et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.**, v. 5, p. 11, jan. 2007.

PINDYURIN, A. V. et al. Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila*. **Nucleic Acids Research**, p. gkw176, 2016.

POTTER, C. J.; LUO, L. Splinkerette PCR for Mapping Transposable Elements in *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10168, 13 abr. 2010.

RIDLEY, E. **The impact of chlortetracycline on *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti***. [s.l.] University of York, 27 maio 2011.

ROMANO, C. M. et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11811, jan. 2010.

SANTEL, A. et al. The initiator element of the *Drosophila* beta2 tubulin gene core promoter contributes to gene expression in vivo but is not required for male germ-cell specific expression. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 6, p. 1439–1446, 15 mar. 2000.

SAYERS, E. W. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D5–15, jan. 2009.

SCHNEIDER, B. S.; HIGGS, S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 5, p. 400–408, 1 maio 2008.

SCOTT, T. W. et al. Fitness studies: developing a consensus methodology. In: KNOLS, B. G. J.; LOUIS, C. (Eds.). **Bridging Laboratory and Field Research for Genetic Control of Disease Vectors**. 11. ed. [s.l.] Springer, 2006. p. 171–181.

SMITH, C. N. Possible use of the sterile-male technique for control of *Aedes aegypti*. **Bull. World Health Organ.**, v. 36, n. 4, p. 633–635, jan. 1967.

SMITH, R. et al. Testis-specific expression of the beta2 tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. **Insect Mol. Biol.**, v. 16, n. 1, p. 61–71, fev. 2007.

STAJICH, J. E. et al. The Bioperl Toolkit: Perl Modules for the Life Sciences. **Genome Res.**, v. 12, p. 1611–1618, 2002.

SUAYA, J. A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 5, p. 846–855, 2009.

TAUIL, P. L. [Critical aspects of dengue control in Brazil]. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, jun. 2002.

TEMPORAO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, v. 17, n. 5, p. 938–940, maio 2011.

- THOMAS, J. L. et al. 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 3, p. 247–253, mar. 2002.
- TRAYER, B. E.; ANDERSON, M. A. E.; ADELMAN, Z. N. Homing endonucleases catalyze double-stranded DNA breaks and somatic transgene excision in *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 18, n. 5, p. 623–633, out. 2009.
- VAN ETEN, J. L.; DUNIGAN, D. D. Chloroviruses: not your everyday plant virus. **Trends Plant Sci.**, v. 17, n. 1, p. 1–8, jan. 2012.
- VÁZQUEZ-SALAT, N.; HOUEBINE, L. M. Will GM animals follow the GM plant fate? **Transgenic Res.**, v. 22, n. 1, p. 5–13, fev. 2013.
- WANG, H. et al. Effects of inducing or inhibiting apoptosis on Sindbis virus replication in mosquito cells. **J. Gen. Virol.**, v. 89, n. Pt 11, p. 2651–2661, nov. 2008.
- WANG, H.; CLEM, R. J. The role of IAP antagonist proteins in the core apoptosis pathway of the mosquito disease vector *Aedes aegypti*. **Apoptosis**, v. 16, n. 3, p. 235–248, mar. 2011.
- WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. [s.l.] World Health Organization - WHO, 2009.
- WHO. **Health topics – Dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>>.
- WINDBICHLER, N. et al. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 17, p. 5922–5933, jan. 2007.
- WINDBICHLER, N.; PAPATHANOS, P. A.; CRISANTI, A. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. **PLoS Genet.**, v. 4, n. 12, p. e1000291, 5 dez. 2008.
- ZHANG, Q. et al. Temporally and spatially controlled expression of transgenes in embryonic and adult tissues. **Transgenic Res.**, v. 19, n. 3, p. 499–509, jun. 2010.
- ZHANG, Y. et al. Characterization of Chlorella virus PBCV-1 C viAll restriction and modification system. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 20, p. 5351–5356, 25 out. 1992.
- ZHOU, J. et al. Copy-number variation: the balance between gene dosage and expression in *Drosophila melanogaster*. **Genome Biol Evol**, v. 3, p. 1014–1024, 1 jan. 2011.
- ZHOU, L. et al. Michelob_x is the missing inhibitor of apoptosis protein antagonist in mosquito genomes. **EMBO Rep.**, v. 6, n. 8, p. 769–774, ago. 2005.

ANEXO I

Alinhamento entre a sequência original enviada para síntese e daquela oriunda da empresa que realizou a síntese.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

Original	-----
Sintetizada	GGCGCGCCGGATCCAGGTTTCGACTTTCACCTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAA

Original	-----
Sintetizada	CTCGACTTTCACCTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAACTCGACTTTCACCTTTCT

Original	-----
Sintetizada	CTATCACTGATAGGGAGTGGTAACTCGACTTTCACCTTTCTCTATCACTGATAGGGAGT

Original	-----
Sintetizada	GGTAACTCGACTTTCACCTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAACTCGACTTTCAC

Original	-----
Sintetizada	TTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAACTCGACTTTCACCTTTCTCTATCACTGATA

Original	-----
Sintetizada	GGGAGTGGTAACTCGAAAACGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAG

Original	-----
Sintetizada	CGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAA

Original	-----
Sintetizada	ACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGGTACCCTGGCGGTAAGTTGATCAAAG

Original	-----
Sintetizada	GAAACGCAAAGTTTCAAGAAAAACAAACTAATTTGATTATAACACCTTTAGAAACC

Original	-----
Sintetizada	ACCATGGCAATCGCATTCTACATTCCCGCCATCGATGATGAAATCGAGAAGCAGTATCAG

Original	-----
Sintetizada	TTGCAAATGATGCAACAGCAGCAGCAGATTTAATGCAACAACAGCAAAATCAGAACC

Original	-----
Sintetizada	ATCAGTTCGCCACCACCGTCGCCAACAGTCCAACGGAGTCAATTCCACCAACTCCTCCA

Original	-----
Sintetizada	CTGACTCCGACGATGACGCAAGTCAGCCTTACCACAACCGCTACCATCTGGTGCAGGCC
Original	-----
Sintetizada	TTTCATGAGATTCTGTTCCGTCACGCTCAAGAAAATAACCCAACCCGTTCCCGATGTCTG
Original	-----
Sintetizada	CTGTGCAACAAGCTATACTACTTGCTGCGAAAGGTGTATTAAC TACCTGTTAAGTTCCC
Original	-----
Sintetizada	GCCAAAAGCAAAACAATTCAAAGTTCAGTTC AAAAGTTAACTACATAATGTGACTTTGC
Original	-----
Sintetizada	CCAGTAAGCAAACGTTGTTTCGAGCTGCTCCAGCGAAATGATGGGATATTCATTTGCGCGA
Original	-----
Sintetizada	ACATGCCAACGCTGGATGCGGCCTCAGTGGATGTTCTGAATCCAGACAACGCCCTGTAAT
Original	-----
Sintetizada	ATCCCTGTGTGGATTGGGTCTTCCGATCAAGGAAGTTTATGGTGAGTTTGATATAAGAAG
Original	-----
Sintetizada	TTTTCTTTAGAGGAGTGATTGTAATGTGTGCGTTTTTTCCCATTTATGTCATTACAGATT
Original	-----
Sintetizada	CTGACGTGTCCGTTGGAAGCAACGGTGATCTTCGGGAACGTCACTCGGAGAGCAACGCC
Original	-----
Sintetizada	CAGGTTGCAGTGTTGGTTTGACGCTTCTTGAAAAAGAAGATCTTGGTGAACTGAAGCA
Original	-----
Sintetizada	AATGTGTGATAATCGTTAGTGATAAATGTGAACAAGTGACACTCCAGACACTTTGCTGTC
Original	-----
Sintetizada	TTAAATAAATAGTAATTAAGTAAGTCGTGCATGGTGTTGTAGTTTGAAAGAAATTATC
Original	-----
Sintetizada	CCATGGAAGAATGGCCGGCCGATATCAGATTTTTTGTTTAAGTATTTGAAGCAAACTC
Original	-----
Sintetizada	CTAGCTTTGAAAATGATTACTACTTATCTAAAATGAAAAATTCATCAATAATTTGTGTAT
Original	-----
Sintetizada	GTTGTAACTTTCTTAAACCTGGATTTTTTCCAAGCCTGGAACCTAGAAATATCAGG

Original	-----
Sintetizada	GAATTTCAATTTCTGTAAATTAGTAGACACTCTGAACGTTAGAATTTTTAAACCCCTCAT
Original	-----
Sintetizada	ATAGTTTAAATCGCGTTAACTTTTTGTTTTAAGGTTCAAAAATCTATCATTCAATCTTC
Original	-----
Sintetizada	AATCATCAGCAATCAACAAAAATAAATGATGGTTTTTAACTCAGAAACATGCTCTGCC
Original	-----
Sintetizada	ACAAAGGAGACGTAATGCCGAAAAGAGGAAGAACTAATACCTAGTTGTAAGTGTATTAT
Original	-----
Sintetizada	TCATTTCAACACTATTATTTTCCGCCAAATTTTGATAGTTTATGCAAAGGACTTGCATGT
Original	-----
Sintetizada	TTCCCCTAATGTGGGGTGAATCACGCTATGTTCTTGTGGCTCATATATCGCTTTTGT
Original	-----
Sintetizada	CGTCCATAAACACGTTGGTCATTTTTTATGAATTTTCACGCTTCTCCTTATGATCTTCG
Original	-----
Sintetizada	TCCACACAAAAATTTTCAAATTTTGATGCACCGTGATGCTTAAGCAGTACCTTCTCCA
Original	-----
Sintetizada	CCCCATAACGACCACGTGGCATATGGACAGCCCCAACGTGACAACAGACTTCAAGCGA
Original	-----
Sintetizada	ATGCATCCAGTAGCACATGTTGAACGCGTCGCTCCCGTTTTGGGGGCCATACTGCCGCC
Original	-----
Sintetizada	ACAATGTAAATCAATCACAGTGTGTCATGGAAGGCCATCCTTCTTCTGACGACCCGGAG
Original	-----
Sintetizada	GACGACAGTTGGAAAAATTTTCACTTCGATTTTCACCACCGAGGAACGCGGACGTGATTT
Original	-----
Sintetizada	GGAACCATCTGCTTCCATCTTCAAGCATCGGAAGAAGCATATTTTGAAGCCCAATTTTG
Original	-----
Sintetizada	GAACCGCTAGAAGTGCTCCAGGATGTCGCGTCTGGATAAGTCGAAGGTGATCAACTCGGC

Original	-----
Sintetizada	CCTGGAAGTCTGAACGAAGTGGGAATCGAAGGACTGACCACCCGTAAGCTGGCCCAGAA
Original	-----
Sintetizada	GCTGGGAGTGGAACAGCCGACCCTGTACTGGCACGTGAAGAACAAGCGTGCCCTGCTGGA
Original	-----
Sintetizada	TGCCCTGGCCATCGAAATGCTGGATCGTCACCACACCCACTTCTGCCCCTGGAAGGAGA
Original	-----
Sintetizada	ATCGTGGCAGGATTTCTGCGTAACAACGCCAAGTCGTTCCGTTGCGCCCTGCTGTCGCA
Original	-----
Sintetizada	CCGTGATGGAGCCAAGGTGCACCTGGGAACCCGTCCGACCGAAAAGCAGTACGAAACCT
Original	-----
Sintetizada	GGAAAACAGCTGGCCTTCTGTGCCAGCAGGGATTCTCGCTGGAAAACGCCCTGTACGC
Original	-----
Sintetizada	CCTGTCGGCCGTGGGACACTTCACCTGGGATGCGTGCTGGAAGATCAGGAACACCAGGT
Original	-----
Sintetizada	GGCCAAGGAAGAAGCTGAAACCCCGACCACCGATTGATGCCGCCGCTGCTGCGTCAGGC
Original	-----
Sintetizada	CATCGAAGTGTTCGATCACCAGGGAGCCGAACCGGCCTTCTGTTGCGACTGGAAGTAT
Original	-----
Sintetizada	CATCTGCGGACTGGAAAAGCAGCTGAAGTGCGAATCGGGATCGGCCTACTCGCGTGCCCG
Original	-----
Sintetizada	TACCAAGAACAACCTACGGATCGACCATCGAAGGACTGCTGGATCTGCCGGATGATGATGC
Original	-----
Sintetizada	CCCGGAAGAAGCCGGACTGGCCGCCCCGCGTCTGTCGTTCTGCCGCCGGACACACCCG
Original	-----
Sintetizada	TCGTCTGTCGACCGCCCCGCCGACCGATGTGTCGCTGGGAGATGAACTGCACCTGGATGG
Original	-----
Sintetizada	AGAAGATGTGGCCATGGCCACGCCGATGCCCTGGATGATTTGATCTGGATATGCTGGG

Original	-----
Sintetizada	AGATGGAGATTCGCCGGGACCGGGATTACCCCGCACGATTCGGCCCCGTACGGAGCCCT
Original	-----
Sintetizada	GGATATGGCCGATTTCGAATTCGAACAGATGTTACCGATGCCCTGGGAATCGATGAATA
Original	-----
Sintetizada	CGGAGGATAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTT
Original	-----
Sintetizada	TACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAA
Original	-----
Sintetizada	TTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCA
Original	-----
Sintetizada	CAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCA
Original	-----
Sintetizada	TCAATGTATCTTAAAGCTTATCGAATACTCGAGGGCGCGCCTAGGCCGGCCGATCTCGTC
Original	-----
Sintetizada	GACGTCAAAATCACCACTTTTGAAGCGTTGAAACCACCGTTCACACGTTTTACAGTTGG
Original	-----
Sintetizada	TACTTGTCGCCAAAGGCTTCAACAAGCATTGCGTGCGATTCCGCAGCTGTTTTCTTCAA
Original	-----
Sintetizada	ATGAAAACAGAAAATTAATACTGTCCGCGTTTGCTCTTTATTCGGCACGAAACTCGACAT
Original	-----
Sintetizada	GTTGACTGCACTGAGAGTAAACAATTATGACGCTCAATTCGCGCCAAACTATGGTGGTTC
Original	-----
Sintetizada	GACAGTCAAGGTTGACACTTCACAAGGTCAAAGTTTTATGACAATCGATAAATATTTACG
Original	-----
Sintetizada	TTTGCGAGACATCTATATGTTCGAACCGACATTCCTACTTGTACACCTGGTAAAAAATT
Original	-----
Sintetizada	AAAACTAGGTCCCCGTTCTTACGCATATATACACAGGTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA
Original	-----
Sintetizada	TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTT

Original	-----
Sintetizada	CAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTG
Original	-----
Sintetizada	CCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT
Original	-----
Sintetizada	AACAAAATATTAACGTTTACAATTCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCG
Original	-----
Sintetizada	GTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
Original	-----
Sintetizada	GCCAGCCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGG
Original	-----
Sintetizada	CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTCAC
Original	-----GCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTA
Sintetizada	CGTCATCACCAGAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTA *****
Original	ATGTCATGATAATAATGgtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcg
Sintetizada	ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG *****
Original	gaaccctatttgtttatttttctaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaat
Sintetizada	GAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT *****
Original	aaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcc
Sintetizada	AACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC *****
Original	gtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcaccagaaa
Sintetizada	GTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTGCTCACCAGAAA *****
Original	cGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAC
Sintetizada	CGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAC *****
Original	TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA
Sintetizada	TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGA *****
Original	TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
Sintetizada	TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG *****

Original	AGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
Sintetizada	AGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA *****
Original	CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
Sintetizada	CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA *****
Original	TGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA
Sintetizada	TGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA *****
Original	CCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
Sintetizada	CCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC *****
Original	TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA
Sintetizada	TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA *****
Original	CGTTGCGCAAACATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
Sintetizada	CGTTGCGCAAACATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG *****
Original	ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
Sintetizada	ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT *****
Original	GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC
Sintetizada	GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC *****
Original	TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
Sintetizada	TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA *****
Original	CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
Sintetizada	CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT *****
Original	AACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAAT
Sintetizada	AACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAAT *****
Original	TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG
Sintetizada	TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG *****
Original	AGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACcccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatc
Sintetizada	AGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC *****
Original	ctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtagg
Sintetizada	CTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGG *****
Original	tttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggttaactggcttcagcagag
Sintetizada	TTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAG

Original	cgagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaact
Sintetizada	CGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCG TAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT
Original	ctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatacctgttaccagtggctgctgccagt
Sintetizada	CTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGTGCGCAGTG
Original	gcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgagc
Sintetizada	GCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
Original	ggtcGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCG
Sintetizada	GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCG
Original	AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGG
Sintetizada	AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGG
Original	CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
Sintetizada	CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
Original	GGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
Sintetizada	GGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
Original	GATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCT
Sintetizada	GATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCT
Original	TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC
Sintetizada	TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC
Original	CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACGCTCGCCGAGCC
Sintetizada	CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACGCTCGCCGAGCC
Original	GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAC
Sintetizada	GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAC
Original	CGCCTCTCCCCGCGCTTGCCGATTCAATATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
Sintetizada	CGCCTCTCCCCGCGCTTGCCGATTCAATATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACT
Original	GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC
Sintetizada	GGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC
Original	AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT
Sintetizada	AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT

Original	TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACCCTCACTAAA
Sintetizada	TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACCCTCACTAAA *****
Original	GGGAACAAAAGCTTTATGGTTTATGATTATCAATTCGTTCCCATGCTGGAATATCTTT
Sintetizada	GGGAACAAAAGCTTTATGGTTTATGATTATCAATTCGTTCCCATGCTGGAATATCTTT *****
Original	CGGGTTGTTTGTATGCCTCGCTTTTCACTGCGTGCTAGCAGTTCCTTTTCCTTAGGAA
Sintetizada	CGGGTTGTTTGTATGCCTCGCTTTTCACTGCGTGCTAGCAGTTCCTTTTCCTTAGGAA *****
Original	TGACCATGCGCACTTCCACTTTCGTGGGATAAAAATGGTAAATCCGGCTTTTCTTAAAG
Sintetizada	TGACCATGCGCACTTCCACTTTCGTGGGATAAAAATGGTAAATCCGGCTTTTCTTAAAG *****
Original	CTACCAATGATGTAGATAGGCATCCACAGTACGGGCTCCAGTCGGTGAATATAGAAAC
Sintetizada	CTACCAATGATGTAGATAGGCATCCACAGTACGGGCTCCAGTCGGTGAATATAGAAAC *****
Original	TATCAGGTGTACAAGTATGAAATGTCGTTTTTTTTAAATCAAAAAACACGTAAATTTTG
Sintetizada	TATCAGGTGTACAAGTATGAAATGTCGTTTTTTTTAAATCAAAAAACACGTAAATTTTG *****
Original	TGAAAAAGAAAAATCATTTATTCAAAGTATTTGCCGTCGCTAGCTACACATTTTCCC
Sintetizada	TGAAAAAGAAAAATCATTTATTCAAAGTATTTGCCGTCGCTAGCTACACATTTTCCC *****
Original	ATCTCTCGGGCAATTTGTGGATTCCACGCCAGTAGAACTCATCGTCTTTTGCGGCGAACC
Sintetizada	ATCTCTCGGGCAATTTGTGGATTCCACGCCAGTAGAACTCATCGTCTTTTGCGGCGAACC *****
Original	ATTCATCGAGCCATTTTTTACACTTTCGTAAGAATCGAAGCGCTGCTCAGCGAGTGCCT
Sintetizada	ATTCATCGAGCCATTTTTTACACTTTCGTAAGAATCGAAGCGCTGCTCAGCGAGTGCCT *****
Original	GTCCCATCGAAGCGAATAGGTGGTAATCGGATGGGGCCAGGTCTGGTGAGTAAGCCGCAT
Sintetizada	GTCCCATCGAAGCGAATAGGTGGTAATCGGATGGGGCCAGGTCTGGTGAGTAAGCCGCAT *****
Original	GCGGAAGCACTTCCAATTGAGTGTTCACACGTGTCGCGAACCGCTTTGCCGTATGTG
Sintetizada	GCGGAAGCACTTCCAATTGAGTGTTCACACGTGTCGCGAACCGCTTTGCCGTATGTG *****
Original	ATGGAGCGTTGTATGGAGAAAAATGACCTGTGTTGTCTTTTTTGATATTCCGGTCGTT
Sintetizada	ATGGAGCGTTGTATGGAGAAAAATGACCTGTGTTGTCTTTTTTGATATTCCGGTCGTT *****
Original	TTCTCTGAAGCGCACGGTTCAAATTGATCAATTGTTGTTGGTAGCGTGCCGTATTACCG
Sintetizada	TTCTCTGAAGCGCACGGTTCAAATTGATCAATTGTTGTTGGTAGCGTGCCGTATTACCG *****
Original	TTTCGCCGGGTTTCAAGAGCTCATAGTAAATGACACCGCTCTGATCCACCAACACAGA
Sintetizada	TTTCGCCGGGTTTCAAGAGCTCATAGTAAATGACACCGCTCTGATCCACCAACACAGA *****

Original	GCATCGTCTTCTTGCCAAAGCGATTGGTCGAGCAGTCGATGTGGCCGGTTGTCCAGGAT
Sintetizada	GCATCGTCTTCTTGCCAAAGCGATTGGTCGAGCAGTCGATGTGGCCGGTTGTCCAGGAT *****
Original	CAACGTATGACTTTTTACGTTTAGGATTAACAAAAAGATCCATTTTTCATCTCCAGTAA
Sintetizada	CAACGTATGACTTTTTACGTTTAGGATTAACAAAAAGATCCATTTTTCATCTCCAGTAA *****
Original	CGATACGATGCAAAAACGACTTCCTTTGTATCGTGAAAGCAAAATTCGCATGTGTTTT
Sintetizada	CGATACGATGCAAAAACGACTTCCTTTGTATCGTGAAAGCAAAATTCGCATGTGTTTT *****
Original	TGCGCCTCTCCATCTGCCTCTCGTTCAACTCATGTGGCACCCTACCGACCTTCTGAA
Sintetizada	TGCGCCTCTCCATCTGCCTCTCGTTCAACTCATGTGGCACCCTACCGACCTTCTGAA *****
Original	TCTTTCCATCTCTCGAAGCGATTGAAACTGCTTGTTGACTTACTTCCAAGTCTCTG
Sintetizada	TCTTTCCATCTCTCGAAGCGATTGAAACTGCTTGTTGACTTACTTCCAAGTCTCTG *****
Original	CGAGTTGTTTTGCGTTTGAGCATCGTCTTCATCCAATAATGCTTGCAAGTCGGCGTCTT
Sintetizada	CGAGTTGTTTTGCGTTTGAGCATCGTCTTCATCCAATAATGCTTGCAAGTCGGCGTCTT *****
Original	CGTACCTTTTTGGCGGTTTTCCGTGCTCTTTGTCGTCGAAATTCGAGCTCGCCCGGGGAT
Sintetizada	CGTACCTTTTTGGCGGTTTTCCGTGCTCTTTGTCGTCGAAATTCGAGCTCGCCCGGGGAT *****
Original	CTAATTCAATTAGAGACTAATTCAATTAGAGCTAATTCAATTAGGATCCAAGCTTATCGA
Sintetizada	CTAATTCAATTAGAGACTAATTCAATTAGAGCTAATTCAATTAGGATCCAAGCTTATCGA *****
Original	TTTCGAACCTCGACCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTC
Sintetizada	TTTCGAACCTCGACCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTC *****
Original	AATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCGCA
Sintetizada	AATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCGCA *****
Original	GCTGAACAAGCTAAACAATCGGGGTACCGCTAGAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC
Sintetizada	GCTGAACAAGCTAAACAATCGGGGTACCGCTAGAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC *****
Original	CACCGGTCGCCACCATGGTGCGCTCCTCCAAGAACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCA
Sintetizada	CACCGGTCGCCACCATGGTGCGCTCCTCCAAGAACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCA *****
Original	AGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGG
Sintetizada	AGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGG *****
Original	GCCGCCCTACGAGGGCCACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGC
Sintetizada	GCCGCCCTACGAGGGCCACAACACCGTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGC *****
Original	CCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGC
Sintetizada	CCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGC *****

Original	ACCCGCCGACATCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGC
Sintetizada	ACCCGCCGACATCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGC *****
Original	GCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGG
Sintetizada	GCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGG *****
Original	ACGGCTGCTTCATCTACAAGGTGAAGTTCATCGGCGTGAAC TTCCTCCGACGGCCCCG
Sintetizada	ACGGCTGCTTCATCTACAAGGTGAAGTTCATCGGCGTGAAC TTCCTCCGACGGCCCCG *****
Original	TAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCCGCGACG
Sintetizada	TAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCCGCGACG *****
Original	GCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGG
Sintetizada	GCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGG *****
Original	TGGAGTTCAAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACG
Sintetizada	TGGAGTTCAAGTCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACG *****
Original	TGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACG
Sintetizada	TGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACG *****
Original	AGCGCACCGAGGGCCGCCACACCTGTTCTGTAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCA
Sintetizada	AGCGCACCGAGGGCCGCCACACCTGTTCTGTAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCA *****
Original	GCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGA
Sintetizada	GCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGA *****
Original	ACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGCAGCTTATAATG
Sintetizada	ACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGCAGCTTATAATG *****
Original	GTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATT
Sintetizada	GTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATT *****
Original	CTAGTTGTGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAAGCTTATCGAATACGCGTACgg
Sintetizada	CTAGTTGTGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAAGCTTATCGATACGCGTAC--- *****
Original	CGCGCCg gatccAGGTTTCGACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACT
Sintetizada	-----
Original	CGACTTTCAC TTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTTCTCT
Sintetizada	-----

Original Sintetizada	ATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGG -----
Original Sintetizada	TAAACTCGACTTTCAC TTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC T T -----
Original Sintetizada	TTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTCGACTTTCAC TTTCTCTATCACTGATAGG -----
Original Sintetizada	GAGTGGTAAACTCGAAAACGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCG -----
Original Sintetizada	ACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAAC -----
Original Sintetizada	AAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGGTACCCTGGCGGTAAGTTGATCAAAGGA -----
Original Sintetizada	AACGCAAAGTTTTCAAGAAAAACAAACTAATTTGATTTATAACACCTTTAGAAACCAC -----
Original Sintetizada	CATGGCAATCGCATTCTACATTCCCGCCATCGATGATGAAATCGAGAAGCAGTATCAGTT -----
Original Sintetizada	GCAAATGATGCAACAGCAGCAGCAGATTTTAATGCAACAACAGCAAATCAGAACCAAAT -----
Original Sintetizada	CAGTTCGCCACCACCGTCGCCAACAAGTCCAACGGAGTCAATTCCACCAACTCCTCCACT -----
Original Sintetizada	GACTCCGACGATGACGCAAGTCAGCCTTCACCACAACCGCTACCATCTGGTGCAGGCCTT -----
Original Sintetizada	TCATGAGATTCTGTTCCGTACGCTCAAGAAAATAACCCAACCGTTCCTCGATGTCTGCT -----
Original Sintetizada	GTGCAACAAGCTATACTACTTGCTGCGAAAGGTGTATTAAC TACCCTGTTAAGTTCCCGC -----
Original Sintetizada	CAAAAGCAAAACAATTCAAAGTTCAGTTCCAAAAGTTAACTACATAATGTGACTTTGCC -----

Original	AGTAAGCAAACGTTGTTTCGAGCTGCTCCAGCGAAATGATGGGATATTCATTTGCGCGAAC
Sintetizada	-----
Original	ATGCCAACGCTGGATGCGGCCTCAGTGGATGTTCTGAATCCAGACAACGCCCTGTAATAT
Sintetizada	-----
Original	CCCTGTGTGGATTGGGTCTTCCGATCAAGGAAGTTTATGgtgagtttgatataagaagtt
Sintetizada	-----
Original	ttcttttagaggagtgattgtaatgtgtgcgttttttccccattatgtcattacagATTCT
Sintetizada	-----
Original	GACGTGTCCGTTGGAAGCAACGGTGATCTTCGGGAACGTCACTCGGAGAGCAACGCCCA
Sintetizada	-----
Original	GGTTGCAGTGTTTGGTTTGACGCTTCTTGAAAAAGAAGATCTTGGTGAACTGAAGCAAA
Sintetizada	-----
Original	TGTGTGATAATCGTTAGTGATAAATGTGAACAAGTGACACTCCAGACACTTTGCTGTCTT
Sintetizada	-----
Original	AAATAAATAGTAATTAAAGTaagtcgtgcatggtgttgtagtttgaaagaaattatccc
Sintetizada	-----
Original	atggaagaatggccggccgatatcAGATTTTTTGTTTAAGTATTTGAAAGCAAACTCCT
Sintetizada	-----
Original	AGCTTTGAAAATGATTACTACTTATCTAAAATGAAAAATTCATCAATAATTTGTGTATGT
Sintetizada	-----
Original	TGTAACTTTCTTAAACCTGGATTTTTTCCAAGCCTGGAAAACCTAGAAATATCAGGGA
Sintetizada	-----
Original	ATTTCAATTTCTGTAAATTAGTAGACACTCTGAACGTTAGAATTTTTAAACCCCTCATAAT
Sintetizada	-----
Original	AGTTTAAATCGCGTTAACTTTTTTGTTTTAAGGTTCAAAAATCTATCATTCAATCTTCAA
Sintetizada	-----
Original	TCATCAGCAATCAACAAAAATAAATGATGGTTTTTAAACTCAGAAACATGCTCTGCCAC
Sintetizada	-----
Original	AAAGGAGACGTAATGCCGAAAAGAGGAAGAACTAATACCTAGTTGTAAGTGTATTATTC
Sintetizada	-----

Original
Sintetizada

ATTTC AACACTATTATTTTCCGCCAAATTTTGATAGTTTATGCAAAGGACTTGCATGTTT

Original
Sintetizada

CCCCTAATGTGGGGGTGAATCACGCTATGTTCTTGTGGCTCATATATCGCTTTTGTTCG

Original
Sintetizada

TCCATAAACACGCTGGTCATTTTTTATGAATTTTACGCTTCTCCTTATGATCTTTCGTC

Original
Sintetizada

CACACAAAAATTTTCAAATTTTGTATGCACCGTGATGCTTRAGCAGTACCCTTCTCCACC

Original
Sintetizada

CCATAACGACCACGTGGCATATGGACAGCCCCAACGTGACAAACAGACTTCGAAGCGAAT

Original
Sintetizada

GCATCCAGTAGCACATGTTGAACGCGTCGCTCCCGTTTGGGGGCCATACTGCCGCCAC

Original
Sintetizada

AATGTAAATCAATCACAGTGTGTCATGGAAGGCCATCCTTCTTCTTGACGACCCGGAGGA

Original
Sintetizada

CGACAGTTGGAAAAATTTTCACTTCGATTTTACCACCGAGGAACGCGGACGTGATTTGG

Original
Sintetizada

AACCATCTGCTTCCATCTTCAAGCATCGGAAGAAGCATATTTGAAGCCCAATTTGGA

Original
Sintetizada

ACCGCTAGAAGTGCTCCAGGatgtcgcgtctggataagtcgaaggatgaactcggccc

Original
Sintetizada

tggaaactgctgaacgaagtgggaatcgaaggactgaccacccgtaagctggcccagaagc

Original
Sintetizada

tgggagtggaaacagccgacctgtactggcacgtgaagaacaagcgtgccctgctggatg

Original
Sintetizada

ccctggccatcgaaatgctggatcgtcaccacaccacttctgcccgtggaaggagaat

Original
Sintetizada

cgtggcaggatttctgcgtaacaacgccaagtcgttccgttgccctgctgtcgcacc

Original

gtgatggagccaaggtgcacctgggaacccgtccgaccgaaaagcagtagcgaacacctgg

Sintetizada	-----
Original	aaaaccagctggccttcctgtgccagcagggattctcgtggaaaacgccctgtacgcc
Sintetizada	-----
Original	tgtcggccgtgggacacttcaccctgggatgcgtgctggaagatcaggaacaccaggtgg
Sintetizada	-----
Original	ccaaggaagaacgtgaaacccgaccaccgattcgatgccgccgtgctgcgtcaggcca
Sintetizada	-----
Original	tcgaactgttcgatcaccagggagccgaaccggccttcctgttcggactggaactgatca
Sintetizada	-----
Original	tctgcggactggaaaagcagctgaagtgcgaatcgggatcggcctactcgcgtgcccgta
Sintetizada	-----
Original	ccaagaacaactacggatcgaccatcgaaggactgctggatctgccggatgatgatgcc
Sintetizada	-----
Original	cggagaagccggactggccgccccgcgtctgtcgttcctgccggccggacacaccgctc
Sintetizada	-----
Original	gtctgtcgaccgccccgccgaccgatgtgtcgtcgtgggatgaactgcacctggatggag
Sintetizada	-----
Original	aagatgtggccatggcccacgccgatgccctggatgatttcgatctggatatgctgggag
Sintetizada	-----
Original	atggagattcgccgggaccgggattcaccgcacgattcggccccgtacggagccctgg
Sintetizada	-----
Original	atatggccgatttcgaattcgaacagatgttcaccgatgccctgggaatcgatgaatacg
Sintetizada	-----
Original	gaggataaGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTA
Sintetizada	-----
Original	CTTGCTTTAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATT
Sintetizada	-----
Original	GTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA
Sintetizada	-----

Original	AATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCAAACTCATC
Sintetizada	-----
Original	AATGTATCTTAAAGCTTATCGAATActcgaggcgccTAGGCCGCCGATCTCGTCGA
Sintetizada	-----
Original	CGTCAAATCACCACTTTTGAAGCGTTGAAACCACCGTTCACACGTTTTACAGTTGGTA
Sintetizada	-----
Original	CTTGTCGCCAAAGGCTTCAACAAGCATTCGGTGCGATTCCGCAGCTGTTTTCTTCAAAT
Sintetizada	-----
Original	GAAACAGAAAATTAATACTGTCCGCGTTTGCTCTTTATTCGGCACGAAACTCGACATGT
Sintetizada	-----
Original	TGACTGCACTGAGAGTAAACAATTATGACGCTCAATTCGCGCCAAACTATGGTGGTTCGA
Sintetizada	-----
Original	CAGTCAAGGTTGACACTTCACAAGGTCAAAGTTTTATGACAATCGATAAATATTTACGTT
Sintetizada	-----
Original	TGCGAGACATCTATATGTTTGAACCGACATTCCTACTTGACACCTGGTAAAAAATTAA
Sintetizada	-----
Original	AACTAGGTCCCCGTTCTTACGCATATATACACAGGTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA
Sintetizada	-----
Original	GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
Sintetizada	-----
Original	AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCC
Sintetizada	-----
Original	GATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
Sintetizada	-----
Original	CAAAATATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
Sintetizada	-----
Original	ATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC
Sintetizada	-----

Original	CAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCA
Sintetizada	-----

Original	TCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCG
Sintetizada	-----

Original	TCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGG
Sintetizada	-----