Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

***Culex quinquefasciatus* (Diptera:
Culicidae): Aspectos da manipulação
genética e estudos populacionais
utilizando marcadores microssatélites**

André Barretto Bruno Wilke

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública para a
obtenção do título de Doutor
em Saúde Pública

Área de concentração:
Epidemiologia

ORIENTADOR: PROF DR.
MAURO TOLEDO
MARRELLI

São Paulo

-2013-

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

***Culex quinquefasciatus* (Diptera:
Culicidae): Aspectos da manipulação
genética e estudos populacionais
utilizando marcadores microssatélites**

André Barretto Bruno Wilke

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública para a
obtenção do título de Doutor
em Saúde Pública

Área de concentração:
Epidemiologia

ORIENTADOR: PROF DR.
MAURO TOLEDO
MARRELLI

São Paulo

-2013-

“Liberdade de pensamentos é promovida pela iluminação gradual da mente dos homens que decorre através do avanço da ciência”.

Charles Robert Darwin

Agradecimentos

Agradeço a meus pais Reynaldo e Regina, minha irmã Helena e minha namorada Betina pelo apoio durante o desenvolvimento de meu doutorado.

Agradeço ao Dr. Mauro Toledo Marrelli por me aceitar como seu aluno e se preocupar verdadeiramente com meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico. Sempre presente em horas difíceis e prazos apertados. Espero que nossa parceria dure por muitos anos.

A Dra. Margareth de Lara-Capurro eu agradeço por abrir as portas de seu laboratório. Agradeço também a Bianca Burini e André Luís da Costa da Silva que certamente possuem um papel importante no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Dr. Lincoln Suesdek e a Paloma Vidal pela colaboração no desenvolvimento de meu projeto sempre de forma solícita e profissional.

A Sirlei A. de Moraes que cedeu os mosquitos utilizados nesta tese.

A FAPESP pelo financiamento desse projeto (Bolsa de Doutorado 2008/57468-6).

Índice

1 Introdução	1
1.1.1 Mosquitos	1
1.1.2 <i>Culex quinquefasciatus</i>	2
1.1.3 Degradação do Ambiente e os Mosquitos <i>Culex</i>	5
1.1.4 Importância Médica dos Mosquitos do Gênero <i>Culex</i>	5
1.2.1 Controle de Mosquitos	5
1.2.2 A Técnica do Inseto Estéril (SIT – Sterile Insect Technique)	8
1.2.3 Incompatibilidade Citoplasmática	9
1.2.4 Controle Genético de Insetos:	10
1.2.5 Elementos de Transposição (Transposons)	11
1.2.6 Marcadores Moleculares de Transformação	12
1.2.7 Melhoramento da Técnica SIT	13
1.2.8 Sistema RIDL: potenciais melhorias para o SIT usando engenharia genética.	14
1.2.9 RIDL – Teste em Campo	16
1.3 Marcadores Moleculares:	20
1.3.1 Microssatélites:	21
2 Objetivos	26
3 Material e Métodos	27
3.1 Colônia de Mosquitos	27
3.2 Camundongos	27
3.3 Construções Genéticas Utilizadas	27
3.4 Estrutura e Função das Construções	28
3.5 Transformação e Clonagem	32
3.5.1 Meio de Cultura	32
3.5.2 Preparo das Células Eletro-Competentes	33
3.6 Purificação dos Plasmídeos	34
3.6.1 Extração de DNA de Plasmídeo por Lise Alcalina	34
3.6.2 Extração de DNA de Plasmídeo por Lise Alcalina em Larga Escala	34
3.7 Microinjeção: procedimentos	34
3.7.1 Solução de Injeção	34
3.7.2 Preparação dos Capilares	34
3.7.3 Microinjeções em embriões de <i>Culex quinquefasciatus</i>	35

3.7.4 Procedimentos Após as Microinjeções	36
3.8 Cruzamentos	37
3.8.1 Seleção dos transformados:	37
3.9 Microinjeções em Adultos:	37
3.10 Análise Populacional com Microsatélites	38
3.11 Extração de DNA	39
3.12 Oligonucleotídeos (<i>Primers</i>)	39
3.13 Amplificação dos Microsatélites	40
3.14 Sequenciamento ABI	40
3.15 Análise dos Fragmentos Obtidos e Análise Estatística	40
4 Resultados	44
4.1.1 Microinjeções	44
4.1.2 Cruzamentos	44
4.1.3 OX-513	44
4.1.4 OX-882	45
4.1.5 OX-3653	45
4.1.6 OX-3778	46
4.2.1 Microinjeção em Adultos	47
4.3 Microsatélites	49
4.3.1 Seleção dos <i>Primers</i>	49
4.3.2 Variabilidade Genética de Mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i>	51
4.3.3 Dendrograma	55
4.3.4 <i>Cluster Multi-Locus</i>	56
5 Discussão	57
5.1 Transgenia	57
5.2 Microsatélites	62
6 Conclusões	68
7 Referências Bibliográficas	70
8 Anexos	80
8.1 Anexo 1	81
8.2 Anexo 2	89

Lista de Abreviações

3XP3 – Promotor: olhos e nervos ópticos

AmCyan - Marcador Molecular (amarelo)

COI - Citocromo Oxidase 1

DDT - *Dicloro-Difenil-Tricloroetano*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DsRed2 – Marcador Molecular (vermelho)

DSS - Síndrome do Choque da Dengue

Fis - Coeficiente de Endogamia

Fst - Índice de Heterogeneidade Genética

GFP - Green Fluorescent Protein

Hr5IE1 – Promotor baculovirus: constitutivo

ITS2 - Segundo Espaçador Transcrito Interno

mtCytB - Citocromo B Mitocondrial

mtDNA - DNA Mitocondrial

mtlsurRNA - Subunidade Ribossômica RNA Gene Mitocondrial

ND4 - dehidrogenase subunidade 4

Pb – Pares de base de DNA

PET – Parque Ecológico do Tietê

piggyBac - Transposon

IE-2 – Promotor: constitutivo

rDNA – DNA Ribossômico

RIDL - Liberação de Insetos Carregando um Gene Letal Dominante

RNA - Ácido Ribonucleico

SIT - Técnica do Inseto Estéril

SMA – Secretaria do Meio Ambiente

SSR – Repetições de Sequência Simples

STR – Pequenas Repetições em Tandém

teTO - promotor mínimo de *Drosophila*

tTAV - Ativador Transcricional Tetraciclina Repressível

VP16 – Domínio de ativação

WBT - Whole Body Transfection

WHO – World Health Organization

RESUMO

Wilke AB *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Aspectos da manipulação genética e estudos populacionais utilizando microssatélites

São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

O avanço na distribuição geográfica de mosquitos vetores é seguido pela emergência de vírus e doenças em novas áreas para as quais não há disponibilidade de vacinas efetivas e drogas terapêuticas específicas são insuficientes. Métodos de controle de mosquitos tradicionais perderam efetividade, devido principalmente a grande capacidade reprodutiva e flexibilidade genômica dos mosquitos. Controle químico cada vez mais torna-se restrito, acarretando na urgente necessidade de novas formas de controle. A liberação de machos carregando um gene letal dominante (RIDL) oferece novas abordagens aplicáveis ao controle de mosquitos e ainda assim ecológicas e espécie específica. Mosquitos *Culex quinquefasciatus* foram transformados com sucesso apenas uma vez, apesar do esforço de diversos laboratórios em obter uma linhagem transgênica estável. Foi desenvolvido um método de expressão transiente em mosquitos *Culex*, que insere plasmídeos contendo genes efetores na hemolinfa e tecidos subjacentes do mosquito. Foi observada a expressão da proteína fluorescente *DsRed2*, em mosquitos *Culex quinquefasciatus* adultos mediada por plasmídeos. Esta expressão pode ser considerada um importante passo na transformação de mosquitos *Culex*, além de potencial uso em estratégias de controle genético e interações gênicas. Para que novas formas de controle sejam realmente efetivas é vital que se conheça a estrutura genética da população alvo. Marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados em estudos filogenéticos e taxonômicos de diversas espécies de insetos. Microssatélites são de grande utilidade para observar estruturas populacionais, tanto em âmbito geográfico, quanto na escala evolucionária. Foi possível observar a formação de *clusters* e de padrões genéticos distintos entre as populações analisadas, criando um panorama genético dos mosquitos *Culex quinquefasciatus* coletados no Brasil.

Descritores: Culex, Controle, RIDL, Microssatélite

Abstract

Wilke AB ***Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Aspects of genetic manipulation and population Characterization using microsatellites**

São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

The increase in the geographic distribution of vectors is accompanied by the emergence of viruses and diseases in new areas. There are insufficient specific therapeutic drugs available and there are no reliable vaccines to malaria or dengue. Most mosquito control measures have failed to achieve their goals, mostly because of the mosquito's great reproductive capacity and genomic flexibility. Chemical control is increasingly restricted therefore other strategies for mosquito control are desperately needed. Releasing of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene (RIDL) offers a new approach that can be applied to mosquitoes yet environmentally friendly and species-specific. *Culex quinquefasciatus* mosquitoes have been successfully genetically modified only once, despite the efforts of several laboratories to transform and establish a stable strain. We have adapted a transient gene expression method, in *Culex*, that delivers plasmid DNA directly to the mosquito hemolymph and additional tissues. We were able to express *DsRed2* fluorescent protein in adult *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by injecting plasmids directly into their thorax. The expression of *DsRed2* in adult *Culex quinquefasciatus* mosquitoes is an important stepping stone to genetic transformation and the potential use of new control strategies and genetic interactions. If new methods of control are to become really effective it is vital to know the genetic structure of the target population. Molecular markers have been widely used in phylogenetic and taxonomic studies of various groups of insects. Microsatellites are very useful for observing the population structure both geographically and evolutionarily. It has been possible to observe the formation of clusters and distinct genetic patterns among the analyzed populations creating a panorama of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes populations present in Brazil.

Key Words: *Culex*, Control, RIDL, Microsatellite

1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Mosquitos

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) têm sido intensamente estudados desde o final do século XIX quando foram, pela primeira vez, relacionados à transmissão de patógenos ao homem e outros vertebrados. Os três principais gêneros de mosquitos vetores de patógenos são: *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* que, respectivamente, transmitem os parasitas causadores de malária, filariose e dengue (Dorta et al. 1993; Gubler 2004; WHO 2006; Reiter 2007). No decorrer das duas últimas décadas, houve um aumento expressivo na mortalidade e morbidade em decorrência dessas doenças, além de diversos outros patógenos com importância epidemiológica (Nicholson 2007).

Casos de malária têm aumentado devido à deterioração nos sistemas de saúde, aumento da resistência dos mosquitos a inseticidas, resistência do parasita a drogas antimaláricas e à lentidão no desenvolvimento de vacinas efetivas. No ano de 2008, a malária foi endêmica em 109 países e aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas ao redor do mundo vivem em zonas de risco. Foram estimados 243 milhões de casos e 863 mil mortes em decorrência de malária nesse mesmo ano (WHO 2006; WHO 2009).

Dengue, incluindo dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue (DSS) está rapidamente emergindo globalmente como doença transmitida por mosquitos, ameaçando um terço da população mundial. Estima-se que ocorram 50 a 100 milhões de casos por ano (Dorta et al. 1993; Gubler 2004; WHO 2006; Reiter 2007; Mairiang 2013). *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus causador da dengue. É considerada uma espécie altamente invasiva e vem sendo dispersa inadvertidamente ao redor do mundo pelo homem. Atualmente esse mosquito encontra-se distribuído por regiões tropicais e subtropicais, principalmente no ambiente urbano, onde adaptou-se a criadouros artificiais. Telas são ineficazes, uma vez que *Aedes aegypti* tem seu pico de atividade durante o dia, tornando o manejo de

criadouros e a utilização de inseticidas as principais formas de controle. O aumento na distribuição geográfica de mosquitos vetores é seguido pela emergência de vírus e doenças em novas áreas. Atualmente não existem vacinas efetivas contra a dengue, filariose, ou malária e há tratamentos específicos apenas contra plasmódios e filárias. A única forma efetiva de prevenção para essas doenças é controlar a população de mosquitos (Knippling 1955; Besansky & Collins 1992; Mackenzie et al. 2004; Pates & Curtis 2005; Vreysen et al. 2007)

1.1.2 *Culex quinquefasciatus*

O gênero *Culex* foi criado por Linnaeus em 1758 e apresenta a maior diversidade de espécies entre os culicídeos, abrangendo uma grande variedade de nichos, utilizando tanto criadouros naturais como bromélias quanto artificiais como pneus e vasos de plantas (Forattini 2002). Possui mais de 300 espécies descritas, das quais algumas apresentam capacidade vetora, e consequentemente interesse epidemiológico. Entre as espécies de interesse médico encontra-se o mosquito *Culex quinquefasciatus*, representando grande desafio à Saúde Pública devido a sua capacidade vetora para diversos arbovírus e filárias e por apresentar grande dispersão por praticamente todo o território brasileiro (Taípe-Lagos & Natal 2003).

O desenvolvimento de mosquitos *Culex quinquefasciatus* é caracterizado como sendo de ciclo completo, o que implica quatro etapas distintas: ovo, larva, pupa e adulto. As três primeiras etapas ocorrem na água e a quarta etapa é caracterizada como fase aérea (Taípe-Lagos & Natal 2003). Os ovos são ovipostos aglutinados em forma de jangada e a oviposição ocorre diretamente na superfície da água (Cardoso et al. 2005). Uma única oviposição de *Culex* pode resultar em mais de 200 ovos. (Barata et al. 2007).

As larvas possuem quatro estádios de desenvolvimento, variando de 1,5mm para as de primeiro estágio até 10 mm para as de quarto estágio

(Figura 1). As larvas apresentam corpo dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome. A fase de pupa corresponde a um período de intensa atividade bioquímica onde ocorrerá a transição entre a larva de quarto estágio para mosquito adulto. Nessa fase, o mosquito sofre mudanças morfológicas e fisiológicas profundas ao utilizar a matéria e a energia acumulada durante a fase larvária (Forattini 2002).

Figura 1: Larvas de mosquitos do gênero *Culex*.

Fonte: http://phil.cdc.gov/phil_images/20030627/1/PHIL_4047_lores.jpg

Após a emergência, o mosquito adulto está pronto para o voo e irá copular; a fêmea armazena os espermatozóides recebidos do macho em uma estrutura chamada espermateca. Após o processo de cópula, a fêmea possuirá esperma suficiente para fertilizar todos os ovos que produzirá durante seu ciclo de vida (Forattini 2002). Após o acasalamento, as fêmeas irão buscar alimento e podem alimentar-se de sucos e néctares vegetais, além de buscar repasto sanguíneo essencial para desenvolvimento dos ovários e para maturação dos oócitos (Figura 2) (Gomes et al. 2003).

Figura 2: Mosquito *Culex quinquefasciatus* realizando hematofagia.
Fonte: http://phil.cdc.gov/phil_images/20030925/1/phil_4464_lores.jpg

Espécies do complexo *Culex pipiens* compartilham similaridades morfológicas e normalmente proliferam em áreas urbanas. Mosquitos *Culex quinquefasciatus* adaptaram-se a áreas tropicais e subtropicais e mosquitos *Culex pipiens* em regiões temperadas. No Brasil, mosquitos *Culex quinquefasciatus* possuem ampla distribuição e estão presentes em praticamente todas as grandes cidades (Morais et al. 2006). Mosquitos híbridos *quinquefasciatus/pipiens* são encontrados no Uruguai e na região central da Argentina, enquanto *Culex pipiens* são encontrados em regiões mais ao sul da Argentina (Morais et al. 2012).

Nos locais onde fronteiras climáticas se sobrepõem, ocorre introgressão gênica e hibridização entre essas duas espécies. O processo de hibridização pode ser definido como “Cópula de indivíduos selvagens de duas populações, ou grupos de populações distinguíveis por uma ou mais características hereditárias” (Harrison, 1990; Arnold 2004). Esse fenômeno pode propiciar condições favoráveis para rápida evolução e em alguns casos até mesmo especiação. A capacidade de hibridização em populações de mosquitos deve ser examinada com cautela devido à importância vetora de algumas espécies (Fonseca et al. 2009).

1.1.3 Degradação do Ambiente e os Mosquitos *Culex*

Países em desenvolvimento, como o Brasil, sofrem processos de urbanização sem serviços de saneamento básico e infraestrutura adequados. O aumento da demanda faz com que ocorra uma expansão na indústria a fim de atender as necessidades de consumo e como consequência, efluentes são liberados sem tratamento no meio ambiente.

Os rios tornam-se o destino final dos mais diversos poluentes e resíduos produzidos pela sociedade. O rio Pinheiros e o rio Tietê, localizados na cidade de São Paulo, fazem parte de um cenário que se repete por todo o território nacional e reúne condições favoráveis para que a população de mosquitos *Culex quinquefasciatus* chegue a níveis elevados. O rio Pinheiros recebe efluentes de 290 indústrias e dejetos de 400 mil famílias (SMA 2002).

Mosquitos *Culex quinquefasciatus* são capazes de sobreviver em águas altamente poluídas e deparam-se com condições propícias a seu desenvolvimento (Taípe-Lagos & Natal 2003). A capacidade desses mosquitos de sobreviver em coleções aquáticas altamente comprometidas com dejetos domésticos e industriais propicia a ausência de inimigos naturais que não sobrevivem à toxicidade da água tendo como consequência um desequilíbrio ecológico que leva a população de mosquitos a atingir altas densidades (Merritt et al. 1992).

1.1.4 Importância Médica dos Mosquitos do Gênero *Culex*

O Brasil fica localizado em grande parte na região tropical, e por este motivo enfrenta vários problemas de Saúde Pública associados a mosquitos, dentre esses cita-se: malária, dengue, filariose, arboviroses e febre amarela, doenças emergentes decorrentes de desmatamento, deslocamentos humanos e alteração climática, as quais exigem ações rápidas e eficientes de controle (Cardoso et al. 2005).

A filariose linfática é endêmica em várias regiões tropicais. Estima-se que 800 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas e por volta de 120 milhões de pessoas estão infectadas pela *Wuchereria bancrofti*. As microfilárias podem ser transmitidas por mosquitos do gênero *Culex* causando danos irreversíveis ao hospedeiro (Fontes et al. 1994 ; WHO 2009).

Além de filárias, diversos arbovírus podem ser transmitidos por mosquitos do gênero *Culex*, alguns de grande importância em saúde pública, como o vírus causador da encefalite do Nilo Ocidental (Huhn et al. 2003).

Humanos e cavalos geralmente são hospedeiros acidentais do vírus do Oeste do Nilo, pois não desenvolvem viremia suficiente para propagar o vírus após serem picados por mosquitos. Por esse motivo o vírus se mantém enzoótico em um ciclo silvestre (mosquitos-aves-mosquitos) que envolve primariamente mosquitos do gênero *Culex* (Luna & Pereira 2003; Huhn et al. 2003). Programas de controle de mosquitos são essenciais para a prevenção do vírus do Nilo Ocidental em áreas endêmicas, pois não há vacina disponível para prevenir a infecção pelo vírus do Nilo Ocidental em humanos (Shieh et al. 2000).

Essa arbovirose foi registrada pela primeira vez no continente americano, em Nova Iorque (EUA), no ano de 1999 (Shieh et al. 2000) e no período entre 10 de junho a 31 de dezembro de 2002, ocorreram milhares de casos de encefalite causados pelo vírus do Nilo Ocidental, resultando em 4.156 mortes (Huhn et al. 2003), tornando-se a maior epidemia de encefalites causada por arbovírus na história americana (Luna & Pereira 2003).

1.2.1 Controle de Mosquitos

Estratégias oficiais de controle de vetores no Brasil utilizadas no século passado eram baseadas em agentes químicos, que utilizavam

inseticidas, como DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano). Esta estratégia foi utilizada com sucesso no controle de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* (Dorta et al. 1993). Padrões atuais de ecologia e proteção ao meio ambiente não toleram este tipo de abordagem devido aos efeitos prejudiciais em espécies não alvo, incluindo os seres humanos, impacto ambiental e contaminação do solo e água, além do desenvolvimento de processos seletivos e posterior resistência dos mosquitos aos inseticidas (Dorta et al. 1993).

As bases conceituais do Manejo Integrado de Pragas foram desenvolvidas por Axtell & Arends (1990), no qual inseticidas devem ser utilizados apenas como último recurso e em cenários de epidemia. As prioridades do Manejo Integrado de Pragas baseiam-se no ordenamento ambiental, conscientização da população e controle biológico. O objetivo é controlar a população de mosquitos com maior eficiência e preservar o meio ambiente de contaminações.

O ressurgimento de parasitoses e viroses evidencia sérios problemas para a saúde pública e comprova que a resistência de mosquitos a inseticidas atingiu um patamar insustentável. Dessa forma é vital compreender as bases moleculares da flexibilidade genômica dos mosquitos e, por consequência, os mecanismos que levam à diversidade de suas populações. Mosquitos possuem grande capacidade de reprodução e alta flexibilidade genômica, fatores esses que frustram tentativas de controle. É possível demonstrar quão alta é a flexibilidade genômica de mosquitos observando populações resistentes a inseticidas químicos e biológicos além da capacidade de adaptarem-se a diversas condições ambientais e mudanças climáticas (Besansky & Collins 1992).

Estratégias tradicionais de controle perderam efetividade e não atingem mais o efeito desejado. Formas alternativas de controle realmente efetivas, que possam ser utilizadas em larga escala e que respeitem o meio ambiente são imprescindíveis (Taípe-Lagos & Natal 2003; Natal et al. 2004; Cardoso et al. 2005). Problemas associados ao custo econômico, impacto

ambiental, possíveis efeitos sobre a saúde humana e, principalmente, a resistência dos mosquitos vetores de patógenos aos inseticidas, impulsionaram novas abordagens para o controle de mosquitos. A Técnica do Inseto Estéril (SIT) tem sido utilizada desde a década de 1950, controlando com sucesso insetos de importância agrícola (Bushland et al. 1955).

1.2.2 A Técnica do Inseto Estéril (SIT – Sterile Insect Technique)

A Técnica do Inseto Estéril foi proposta por Knipling (1955) e consiste na liberação de insetos estéreis como forma de reduzir a população alvo. A SIT é baseada na criação em massa, esterilização mediante radiação ou tratamento químico e a liberação de um grande número de mosquitos em uma dada área alvo (Knipling 1955; Phuc et al. 2007; Reiter 2007). O cruzamento de machos estéreis com fêmeas selvagens não resultará em prole viável e uma vez que mosquitos irradiados forem liberados em números suficientes, a população alvo entrará em declínio (Knipling 1955; Wilke et al. 2009a). Uma das grandes vantagens da SIT em relação a inseticidas e remoção de criadouros baseia-se na característica de que machos são muito competentes na busca por fêmeas da mesma espécie, aumentando a efetividade conforme a população é reduzida (Alphey 2002; Alphey et al. 2007; Wilke et al. 2009b).

A Técnica do Inseto Estéril está entre as formas de controle mais inertes existentes. Diferente de outras formas de controle biológico, a SIT é espécie específica, não libera agentes exóticos no ambiente e nem mesmo insere novos genes na população alvo, uma vez que os indivíduos liberados são estéreis (Hendrichs et al. 2002). Esta técnica não agride o meio ambiente, no entanto a tolerância à radiação varia de inseto para inseto e pode levar à perda de *fitness*, inviabilizando sua utilização em insetos mais sensíveis à radiação (Robinson 2002).

Fitness pode ser definido como quão eficaz um genótipo é em transmitir seus genes para a próxima geração. Existem dois componentes principais, sobrevivência e reprodução, que podem ser avaliados utilizando-se diversos parâmetros como: fecundidade, fertilidade, produção de biomassa larval, taxa de desenvolvimento, emergência de adultos, proporção de machos e competitividade de cruzamento (Marrelli 2006).

Segundo Myers et al. (1998), a erradicação da *Cochliomyia hominivorax* utilizando a SIT é um exemplo de estudo clássico de controle de insetos envolvendo tanto a erradicação de uma espécie em uma área onde estava estabelecida, como a erradicação em ambientes previamente exóticos a esta espécie. Nos últimos anos, o interesse pela utilização do SIT em vetores da malária levou a estudos que revisaram todos os aspectos do programa SIT, incluindo produção em massa, esterilização e metodologias de soltura (Helinski et al. 2006).

Para que um programa de liberação de insetos estéreis funcione é necessário que apenas machos sejam liberados e quando há a necessidade de liberação de milhões de insetos por semana, esta tarefa torna-se impossível de ser perpetrada manualmente (Delprat et al. 2002). Levando-se em conta este empecilho, sistemas que causam a morte de fêmeas em algum ponto de sua vida foram desenvolvidos eliminando assim a necessidade de separação manual entre machos e fêmeas (Shearman 2002). Esses sistemas baseiam-se na aplicação de substâncias químicas ou alterações físicas do ambiente como, por exemplo, calor (Robinson 2002). Porém, sistemas de separação sexual baseados em translocação do cromossomo Y evidenciam alguns problemas, como: mutações e deleções que eventualmente levam ao detrimento da linhagem.

1.2.3 Incompatibilidade Citoplasmática

Os efeitos causados por infecções de *Wolbachia*, entre elas a linhagem *wMelPop-CLA*, que pode reduzir o tempo de vida e causar incompatibilidade citoplasmática em mosquitos *Aedes aegypti*, proporciona

formas inovadoras de controle que podem ser incorporadas a ferramentas já existentes. Essa redução de expectativa de vida em mosquitos apresenta potencial para reduzir a transmissão de dengue e ainda que a incompatibilidade citoplasmática proporcione uma força motriz para a disseminação de *Wolbachia*, uma intervenção bem sucedida dependerá da frequência inicial dessa bactéria, além do custo no *fitness* do mosquito. A indução de incompatibilidade citoplasmática possui baixo impacto no *fitness* e alta transmissão vertical entre mosquitos (Walker et al. 2011).

Estas características propiciam ótimos efeitos fenotípicos para liberação de insetos. A inibição de patógenos por meio de *Wolbachia* pode utilizar a incompatibilidade citoplasmática como mecanismo de disseminação gênica, provida por benefícios no *fitness* dos insetos portadores de *Wolbachia* (Walker et al. 2011). No entanto, espécies de mosquitos que não são portadoras de *Wolbachia* podem ser acidentalmente infectadas e a introdução desta bactéria em áreas alvo pode levar a sua propagação, potencialmente, ao redor do mundo de forma irreversível (WHO 2009).

1.2.4 Controle Genético de Insetos:

Com a evolução da genética, foi possível desenvolver técnicas que modificam geneticamente mosquitos de interesse epidemiológico a fim de torná-los resistentes a patógenos (Substituição Populacional) ou causar a morte em algum estágio específico do seu ciclo de vida (Supressão Populacional) (Handler 2002).

Sistemas genéticos de supressão populacional baseiam-se na técnica de insetos estéreis SIT. O sistema mais promissor é conhecido como Liberação de Insetos Carregando um Gene Letal Dominante (RIDL). Mosquitos transgênicos machos têm como base um gene efector letal, o qual inviabilizará a prole resultante da cópula com fêmeas selvagens (Alphay 2002).

O gene efetor, então, é transmitido à próxima geração impedindo que haja prole viável, levando ao declínio da população (Kokoza et al. 2001; Coleman & Alphey 2004; Jasinskiene et al. 2007). Estratégias de controle genético para substituição da população utilizam mosquitos portando algum gene que iniba o desenvolvimento de patógenos em algum ponto de seu ciclo de vida. Quando liberados no meio ambiente, o transgene é introduzido na população alvo, bloqueando a transmissão de doenças na área de interesse (Moreira et al. 2000). Atualmente esta técnica encontra-se em desenvolvimento e ainda não foi utilizada em larga escala.

1.2.5 Elementos de Transposição (Transposons)

Para que sistemas de expressão gênica em insetos sejam aplicados, a transformação dos embriões é mediada por elementos de transposição. Estes elementos são capazes de mover-se pelo genoma com o auxílio da transposase (Lander et al. 2001). Transposons possuem em sua constituição, repetições terminais invertidas (RTI) variando de 10 a 30 pb, além da unidade transcrricional para codificação da enzima transposase (Figura 3). Uma vez codificada a transposase faz um corte no sítio alvo produzindo uma saliência, que liga o transposon ao sítio alvo. A DNA polimerase promove a ligação dos nucleotídeos e a DNA ligase realiza a ligação açúcar-fosfato inserindo-o no genoma celular (Kokoza et al. 2001).

Figura 3: Estrutura de um elemento de transposição. RTI - repetições terminais invertidas (RTI) de 10 a 30 pb. Unidade transcrricional interna que codifica a enzima transposase.

Transformações embrionárias utilizando *piggyBac* como elemento de transposição foram alcançadas em diversos mosquitos de importância epidemiológica, demonstrando ser a forma mais promissora para obter-se inserções estáveis no genoma. Espécies de mosquitos transformados utilizando este transposon incluem: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes fluviatilis*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* (Miller et al. 1987, Jasinskiene et al. 1998, Catterucia et al. 2000, Rodrigues et al. 2006, Labbé et al. 2010).

1.2.6 Marcadores Moleculares de Transformação

É crucial para o sucesso de programas de liberação de mosquitos que seja possível separar indivíduos transgênicos de selvagens. Devido a essa necessidade, são utilizados genes que expressam marcadores fluorescentes concomitantes ao gene efetor, possibilitando assim, diferenciar mosquitos transgênicos de mosquitos selvagens. Outra função dos marcadores genéticos é a certeza da transformação de embriões microinjetados e sua subsequente linhagem (Alphey 2002).

O marcador genético GFP (Green Fluorescent Protein) foi utilizado com sucesso pela primeira vez em mosquitos *Aedes aegypti* (Pinkerton et al. 2000). Este sistema tem a vantagem de poder ser detectado em qualquer fase da vida do mosquito (Moreira et al. 2002). O GFP tem sido amplamente utilizado em transformações de mosquitos e foi utilizado com sucesso em: *Aedes aegypti* (Pinkerton et al. 2000; Kokoza et al. 2001), *Culex quinquefasciatus* (Allen et al. 2001), *Anopheles stephensi* e *Anopheles gambiae* (Catteruccia et al. 2000; Ito et al. 2002). Recentemente, um novo marcador foi desenvolvido, o *DsRed2*. Clonado do coral *Discosoma*, essa proteína fluorescente vermelha possui brilho mais intenso, maior estabilidade quanto a variações de pH, desnaturações e menor foto-sensibilidade do que a GFP (Gross et al. 2000).

Existem diversas opções de proteínas fluorescentes, e como cada proteína pode ser visualizada em comprimentos de onda diferentes e filtros específicos são necessários para sua observação, é possível utilizar mais de um marcador no mesmo indivíduo, atrelado a genes efetores distintos propiciando expressões em locais e situações específicas (Baird et al. 2000).

1.2.7 Melhoramento da Técnica SIT

Havia grande otimismo na década de 1970 com o uso de SIT como estratégia alternativa de controle de mosquitos vetores de doenças, porém existem alguns problemas intrínsecos ao sistema e, como consequência, restringem o uso dessa técnica a um número limitado de espécies. Os principais problemas são:

- Machos liberados devem competir por acasalamento com os machos selvagens.
- Esterilização por irradiação pode provocar perda drástica na capacidade de acasalamento desses insetos comparados aos machos selvagens.
- Diminuição na competitividade e redução na expectativa de vida de mosquitos irradiados (Alphey 2002).

A soma desses fatores leva a uma redução nos parâmetros de *fitness*, como quando o sistema SIT foi utilizado na esterilização de moscas da fruta, *Ceratitis capitata*, e levou a uma redução de quatro a dez vezes nos parâmetros de competitividade, prejudicando o programa de erradicação dessa espécie (Boake et al. 1996; Rendón et al. 2004). Outros problemas ligados à infraestrutura e logística são:

- Necessidade de instalações de irradiação leva a altos custos e potencial perigo.
- Existe a possibilidade de liberação de mosquitos irradiados, porém ainda férteis.

- Necessidade de liberação em estágios de vida pré-estabelecidos.
- Distância entre área alvo e instalações de irradiação podem inviabilizar o projeto (Alphey 2002).

É necessário que apenas machos sejam liberados, uma vez que apenas fêmeas fazem repasto sanguíneo. A liberação de porcentagens mínimas de fêmeas é inaceitável do ponto de vista ético e epidemiológico. Além disso, fêmeas estéreis acasalariam com machos estéreis causando um efeito neutralizador, diminuindo drasticamente a eficácia do sistema (McInnis et al. 2002). Para pragas agrícolas essa separação não é essencial, uma vez que fêmeas não são hematófagas e, portanto, não tem importância epidemiológica.

A necessidade de separação sexual pode ser baseada em dimorfismo sexual, porém inviabilizaria qualquer projeto em grande escala onde milhões de mosquitos são liberados por semana. Na Índia, centenas de milhares de machos de *Culex* e *Aedes* foram diariamente produzidos e separados baseando-se no tamanho das pupas. Porém 0,2% de fêmeas eram liberadas juntamente com os machos, inviabilizando o projeto (Sharma et al. 1972). Mosquitos geneticamente modificados superaram esse obstáculo utilizando mecanismos de sexismo genético.

1.2.8 Sistema RIDL: potenciais melhorias para o SIT usando engenharia genética.

O sistema RIDL (do inglês “**R**elease of **I**nsects carrying a **D**ominant **L**ethal gene”), pode ser considerado uma variação da SIT, em que insetos não são irradiados, mas geneticamente modificados (Thomas et al. 2000). Esse sistema foi proposto simultaneamente por Thomas et al. (2000) e Heinrich & Scott (2000) e baseia-se na integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico da fêmea.

Quando liberados na natureza, machos geneticamente modificados irão cruzar com fêmeas selvagens, resultando em uma prole de machos viáveis, porém, fêmeas inviáveis devido à letalidade sexo específica. A letalidade deve ser expressa apenas na ausência do repressor químico usado para silenciar o gene efetor (Coleman & Alphey 2004).

O sistema é baseado em uma fusão de proteínas: tTA, que possui uma sequência específica de DNA, tetraciclina repressível, adicionando propriedades da proteína Tn10 TetR com as propriedades de ativação transcricional eucariótica do Herpes vírus VP16. Esta proteína se ligará à sequência ttO na ausência de tetraciclina, ativando assim, a transcrição do promotor mínimo adjacente (Figura 4) (Grether et al. 1995).

Uma grande variedade de genes está disponível para ser colocada sob controle de ttO, sendo necessário apenas que cause a morte do mosquito quando expresso (Fortini et al. 1992). Quando um promotor específico de fêmeas é colocado sob o controle de tTA, essa é expressa apenas em fêmeas. Machos são apenas portadores e sobrevivem com ou sem tetraciclina. Fêmeas por outro lado, morrem em sua ausência.

Figura 4: tTA e o sistema de expressão repressível de tetraciclina. Fonte: Alphey 2002

Insetos geneticamente modificados recebem uma dieta suplementada com um repressor químico (tetraciclina), que mantém o gene letal desligado. Ao remover o repressor químico, as fêmeas morrem restando apenas machos prontos para serem liberados na natureza. Esse processo permite a

criação em massa de insetos geneticamente modificados e possibilita um grande avanço na logística da criação em massa e liberação de mosquitos sem a necessidade de separação sexual manual (Phuc et al. 2007).

Heinrich & Scott (2000) desenvolveram um sistema específico de fêmeas, tetraciclina-repressível em moscas *Drosophila melanogaster*. O sistema é composto por um promotor de corpo gorduroso específico de fêmeas, *yolk protein 1* e um gene pró-apoptótico *hid*, suprimível por tetraciclina. Machos e fêmeas sobrevivem com tetraciclina, porém fêmeas perecem em meio normal (Heinrich & Scott 2000).

O sistema RIDL possui vantagens em relação à SIT, entre elas:

- Insetos transgênicos são mais competitivos do que insetos irradiados.
- Não existe risco atrelado à radiação e à soltura de indivíduos não irradiados.
- Pode ser aplicado em insetos que não toleram radiação, como os mosquitos.
- Os insetos podem ser liberados em qualquer estágio de desenvolvimento.
- Baixos custos e logística mais simples em relação à SIT (Alphey 2002).

1.2.9 RIDL – Teste em Campo

Diversas abordagens genéticas para controle de mosquitos estão sendo desenvolvidas. Estas abordagens podem ser: Auto-limitantes – liberações repetidas são necessárias para manter a construção genética na população alvo. Para alcançar um efeito epidemiológico significativo, normalmente é necessária a liberação de quantidades relativamente grandes de mosquitos transgênicos (liberações inundativas). Liberações auto-sustentáveis – apenas uma, ou poucas liberações são necessárias para que

a construção genética aumente sua frequência e mantenha-se por conta própria na população alvo (liberações inoculativas) (WHO 2009).

À medida que estratégias de supressão baseadas em modificação genética (auto-limitantes) começam a ser utilizadas em campo, a falta de regulamentação para utilização de mosquitos geneticamente modificados em campo é um desafio significativo. Esse empecilho não está restrito a países em desenvolvimento, ou a estratégias baseadas na utilização de DNA recombinante. Uma vez que regulamentações e leis forem instituídas, análises de risco e opinião pública forem consultadas, ainda assim restará um árduo processo devido à falta de experiência das agências reguladoras. A melhor forma de se implementar programas de controle baseados em transgenia não se apresenta simples nem óbvia (WHO 2009).

Alguns problemas devem ser resolvidos para que seja possível liberar mosquitos transgênicos como forma de controle:

- Mosquitos machos devem copular com sucesso com fêmeas selvagens na área alvo. Experimentos de *fitness* e competitividade de machos não garantem cruzamentos com fêmeas selvagens.
- Separação sexual aumenta a eficiência dos programas de liberação, e é obrigatória para mosquitos vetores.
- Métodos de liberação devem ser adequados para todas as condições climáticas e devem ser testados antes do programa de liberação ter início.
- Apesar da esterilidade de fêmeas selvagens ser um bom indicador da frequência de cópula com machos transgênicos, densidade populacional é um indicador mais relevante sobre os efeitos do controle na transmissão de doenças.
- Níveis de criação em massa do mosquito a ser liberado devem estar bem estabelecidos e estáveis antes da liberação.
- A liberação de mosquitos transgênicos deve ser programada para atingir o efeito máximo de supressão na população alvo.

- Áreas de controle com monitoramento similar devem estar disponíveis para comparação no decorrer do desenvolvimento de estratégias de supressão populacional.
- Características de dispersão e cópula são fatores essenciais para controle de qualidade e análise de *fitness* de mosquitos liberados.
- Experimentos devem ser conduzidos em áreas isoladas e comprovar sua eficiência em todas as condições climáticas razoavelmente esperadas.
- Monitoramento independente é essencial para demonstrar a efetividade do sistema antes de iniciar o programa de liberação.
- Estabilidade política, bom relacionamento com a comunidade, imprensa e governo são essenciais para estratégias de controle sustentáveis (WHO 2009).

A natureza auto-limitante de insetos estéreis (seja por radiação, incompatibilidade citoplasmática ou RIDL) tende a simplificar o uso em campo, uma vez que o transgene não se fixa na população selvagem (WHO 2009).

Sob a ótica de programas de liberação de insetos transgênicos, como o RIDL, é de extrema importância detectar qualquer resistência na população alvo que seja capaz de acarretar detrimientos significativos na efetividade do programa a tempo de tomar medidas capazes de remediar o fracasso da operação. Estratégias de monitoramento adequadamente desenvolvidas alertariam para esses problemas a tempo de serem remediados (WHO 2009).

Houve avanços significativos na técnica para supressão de população utilizando mosquitos transgênicos e linhagens de *Aedes aegypti* homozigotos para um gene letal dominante estão sendo testadas em campo no Brasil, Malásia, México e Ilhas Cayman (WHO 2009).

Controle genético de mosquitos vetores está cada vez mais próximo de ser utilizado. Esse método tem o potencial de adicionar tecnologias

promissoras no combate a dengue e malária, porém diversas decisões terão de ser tomadas em âmbito regional, nacional e internacional levando-se em conta biossegurança, aspectos sociais, culturais e étnicos, além de aspectos éticos do desenvolvimento e uso de controle genético de vetores.

Existem pontos chave na liberação de insetos geneticamente modificados que demandam atenção quando há intenção de liberá-los na natureza. Um dos aspectos mais desafiadores de avaliação de risco quanto ao uso de mosquitos geneticamente modificados é a identificação de potenciais problemas. Uma vez identificados, os efeitos adversos são conhecidos: podem afetar a diversidade biológica, causar consequências adversas ao fluxo gênico e alterações ambientais (WHO 2009).

Essa particularidade é mais controversa em relação a estratégias que tem como objetivo substituir populações selvagens por mosquitos refratários a patógenos. Uma grande vantagem para estratégias genéticas baseadas em SIT é de que os mosquitos transgênicos liberados são programados para morrer e, portanto o gene efetor deve desaparecer uma vez que a liberação seja interrompida. Essa característica baseia-se em que o gene efetor deve causar problemas no *fitness* dos mosquitos transformados, ainda que perca sua efetividade criando uma forte pressão seletiva (Wilke & Marrelli 2012).

Análises de custo-benefício econômico necessárias para corroborar o uso de novas formas de intervenção são escassas devido à falta de dados confiáveis em relação ao impacto monetário de doenças tropicais negligenciadas, como dengue, pela incerteza do desenvolvimento e custos de implementação. Idealmente seria possível analisar não somente a relação custo-efetividade de novas estratégias, mas também compará-las a alternativas disponíveis e modelar sua incorporação aos programas de manejo integrado de vetores incluindo drogas e vacinas, quando disponíveis (WHO 2009).

1.3 Marcadores Moleculares:

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos filogenéticos, na resolução de questões taxonômicas e estudos de genética de população de vários grupos de insetos (Monteiro et al. 2000; Vesgueiro et al. 2011; Volkman et al. 2012; Wang et al. 2012).

Em dada população, existem inúmeros indivíduos, cada qual contendo uma variedade de alelos distribuídos pelo genoma. Esta diversidade refere-se à quantidade da variação presente nestes alelos em um único indivíduo ou população, considerando que divergências representam a variação alélica entre diferentes populações. Essas podem ser utilizadas como parâmetro de diferenciação a fim de mensurar aspectos filogenéticos e estruturais em populações de interesse. A distribuição baseada tanto em diferenças intra-populacionais quanto em diferenças entre populações pode ser mensurada com a utilização do índice de heterogeneidade genética F_{st} (Volkman et al. 2012).

- $F_{st} > 0.25$ indica grande diferenciação genética.
- $0.25 > F_{st} > 0.15$ indica diferenciação genética moderada.
- $0.15 > F_{st} > 0.05$ indica pequena diferenciação genética
- $F_{st} < 0.05$ indica variação genética desprezível (Wright 1978).

O sequenciamento de DNA mitocondrial (mtDNA), citocromo B (mtCytB) e da subunidade ribossomal (mt16S rRNA) é amplamente utilizado em estudos de genética populacional e filogenia (Lyman et al. 1999). Diversas espécies de importância médica foram submetidas a estudos utilizando estes marcadores, como por exemplo, diversos triatomíneos e culicídeos com importância epidemiológica (Lyman et al. 1999; Fitzpatrick et al. 2008).

Sequências de DNA ribossomal possuem, devido ao mecanismo evolutivo, cópias múltiplas de rDNA que tendem a ser homogêneas, mantendo níveis baixos de variação. A utilização de rDNA provou ser de muita utilidade para resolver problemas ligados a relações evolutivas em diferentes níveis taxonômicos (Vesgueiro et al. 2011).

Esses marcadores estão localizados em regiões do genoma responsáveis por funções metabólicas e, portanto, acredita-se que não estejam sujeitos a pressões seletivas externas. A comparação entre os fragmentos destes genes pode ser muito útil para classificações taxonômicas, identificação de espécies crípticas e análises populacionais (Monteiro et al. 2000).

Diversos estudos demonstraram a capacidade de marcadores moleculares como o Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e o Segundo Espaçador Transcrito Interno (ITS2) como ferramenta de identificação de espécies de mosquitos, particularmente espécies crípticas. A utilização desses marcadores para identificar espécies de mosquito mostrou-se mais simples, rápida e precisa do que sua identificação por métodos morfológicos tradicionais (Wang et al. 2012).

1.3.1 Microssatélites:

Microssatélites, também conhecidos como repetições de sequência simples (SSR) ou pequenas repetições em tandem (STR), são regiões repetitivas não codificante de DNA compostas por pequenos motivos de 1 a 6 repetições de nucleotídeos repetidas em tandem, distribuídas nos genomas tanto de eucariotos quanto procariotos (Field & Wills, 1996; Tóth et al. 2000). Microssatélites são intrinsicamente instáveis e existem dois modelos para explicar sua formação: o deslizamento da DNA polimerase e a recombinação desigual (Tóth et al. 2000). Esses marcadores são muito úteis para se observar a estrutura populacional em âmbito geográfico e na escala evolucionária (Zane et al. 2002; Oliveira et al. 2006).

Os microssatélites foram detectados em uma grande variedade de eucariotos com grande variação de complexidade e tamanho do genoma (Tóth et al. 2000). Ainda que determinados estudos sugiram que alguns microssatélites tenham funções importantes, geralmente estão associados a marcadores neutros de alta variabilidade (Megléczy et al. 2007). Microssatélites têm como particularidade possuir alta taxa de mutação comparado com o resto do genoma, podendo variar de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por *locus* por geração (Jarne & Lagoda 1996; Sia et al. 2000; Oliveira et al. 2006).

Apesar de relatos iniciais sobre a abundância de microssatélites, seu isolamento em alguns *taxa* se mostrou mais difícil do que em outros. Existem pelo menos duas possíveis explicações não excludentes para esta heterogeneidade: variação na abundância de microssatélites presentes no genoma ou diferenças significativas de localização e função no genoma entre espécies de *taxa* mais elevada (Megléczy et al. 2007).

Microssatélites são extensamente utilizados para estudos populacionais de espécies Dípteras como mosquitos do gênero *Culex*. O conhecimento da estrutura genética de insetos é requerido para o desenvolvimento de estratégias de controle de vetores efetivas. Marcadores moleculares tradicionais têm, em sua maioria, provido insuficiente poder aos dados estatísticos e imprecisão para estimar diferenças genéticas, mas a descoberta de *loci* altamente variáveis como microssatélites significa ter à disposição, o poder estatístico para determinar diferenciações entre grupos de espécies, impossíveis alguns anos atrás (Hedrick, 2001; Oliveira et al. 2006).

Para que marcadores microssatélites possibilitem análises da estrutura genética de populações selvagens e possam ser utilizados de forma extensiva, estes marcadores devem possuir certas características:

- Devem ser herdados de forma Mendeliana codominante.
- Devem ser Polimórficos.

- Não devem estar sujeitos a pressões seletivas.
- Devem estar associados de forma aleatória.
- Não devem possuir alelos nulos.
- Devem poder ser aplicados em vastas regiões (Edillo et al. 2007)

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é membro do complexo *Cx. pipiens*. A única característica morfológica usada para distinguir *Cx. quinquefasciatus* de *Cx. pipiens* é baseada em diferenças quantitativas em estruturas da genitália dos mosquitos machos. Estes dois *taxa* são considerados espécies distintas e validadas (Sirivanakarn & White 1978; Harbach et al. 1985).

Algumas espécies de mosquitos vetores de doenças associadas a humanos expandiram radicalmente seu território, ocasionando a introdução de espécies de mosquitos em novas áreas acarretando, em alguns casos, epidemias (Fonseca et al. 2006).

Marcadores microssatélites, têm sido usados extensamente em estudos populacionais em uma grande variedade de eucariotos, como por exemplo: répteis como *Alligator mississippiensis* e *Caiman latirostris* (Zucoloto et al. 2006), mamíferos, humanos e moscas do gênero *Drosophila* além de mosquitos de importância médica como dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Ross et al. 2003; Tóth et al. 2000).

Microssatélites foram utilizados com sucesso em populações silvestres de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius ecuadoriensis* e *Rhodnius prolixus* (Harry et al. 1998). Anderson et al. (2002), identificaram e caracterizaram através da utilização de bibliotecas de plasmídeos contendo DNA genômico *loci* microssatélite para *Triatoma dimidiata* e García et al. (2004), caracterizaram com sucesso *loci* microssatélites para *Triatoma infestans*.

Marcadores microssatélites foram utilizados em populações de *Plasmodium falciparum* e demonstraram que *loci* microssatélites estão presentes de forma abundante neste protozoário ocorrendo a cada 2-3 kb no

decorrer do genoma (Anderson et al. 2000). Estes dados revelaram com clareza a estrutura populacional encontrada nesta espécie: baixa diversidade e grande diferenciação populacional podem ser encontradas em regiões com baixos níveis de transmissão, enquanto desequilíbrio de ligação, alta diversidade e pouca diferenciação populacional podem ser encontrados em populações presentes em regiões com altos níveis de transmissão (Su & Willems 1996; Su et al. 1999; Anderson et al. 2000).

Análises prévias de genética populacional utilizando microsatélites tiveram em foco variações em dois níveis – entre espécies (variação alélica e entre *loci*) e entre *taxa* superiores. O alto nível de variação alélica entre uma espécie de interesse foi responsável pela popularização desses marcadores em estudos sobre evolução e dinâmica populacional (Goldstein and Schloetterer 1999; Katti et al. 2001; Neff and Gross 2001).

Marcadores microsatélites possuem duas características que devem ser observadas com atenção:

Diferentes motivos microsatélites (bases repetidas em tandem) não são igualmente distribuídos em espécies de diferentes grupos (Katti et al. 2001). Por exemplo: o motivo mais abundante na maioria dos insetos é AC, mas em abelhas e vespas o motivo mais abundante é AG (Estoup et al. 1993; Thoren et al. 1995; Zucoloto et al. 2006). Esta disparidade encontrada em *taxa* superiores não pode ser explicada somente pela diferença de composição entre genomas (Field & Wills 1996; Bachtrog et al. 2000; Kruglyak et al. 1998; Katti et al. 2001).

A segunda característica que deve ser levada em consideração é que as *taxa* possuem grande variação em relação ao tamanho do microsatélite e quantidade de bases repetidas. Moscas do gênero *Drosophila*, por exemplo, possuem alelos microsatélites menores do que a maioria dos organismos, como mamíferos, peixes e outros insetos (Schug et al. 1998; Toth et al. 2000; Neff & Gross 2001). Ao assumirmos que padrões de variação de microsatélites refletem processos de mutação em uma espécie,

não é surpreendente que tais processos sejam distintos entre populações que foram separadas por milhões de anos (Zucoloto et al. 2006). *Loci* microssatélites foram encontrados no genoma de todos os organismos em que foram procurados (Goldstein and Schloetterer 1999; Katti, et al. 2001; Neff & Gross 2001; Zucoloto et al. 2006).

2 OBJETIVOS

Manipulação genética e estudos populacionais de mosquitos *Culex quinquefasciatus*.

2.1 Objetivos Específicos

Objetivo 1 - Obter transgenia em *Culex quinquefasciatus* utilizando plasmídeos com letalidade sexo específica para fêmeas.

Objetivo 2 - Análise da estrutura populacional de mosquitos *Culex quinquefasciatus* provenientes de todas as regiões do Brasil e uma da Argentina utilizando microssatélites.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colônia de Mosquitos

Neste estudo foram utilizados mosquitos *Culex quinquefasciatus* de uma colônia mantida no insetário do Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados do Instituto de Ciências Biológicas 2 (ICB-II), Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo. Os mosquitos que formaram a colônia foram originalmente capturados nas margens do rio Pinheiros próximo a Cidade Universitária na década de 1980 (USP).

Nesta colônia os mosquitos são mantidos sob temperatura ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e período luminoso (fotoperíodo) com a duração de 14h. Estes insetos são alimentados com sacarose 10% e semanalmente com camundongos da linhagem Balb-C anestesiados com 100 μl de uma solução de 50% de Acepram a 0,2% e 50% de Calmium por via muscular.

Quatro dias após a alimentação sanguínea, realizada no período noturno, é colocado um recipiente com água autoclavada no interior das gaiolas para que as fêmeas realizem a postura dos ovos.

Após 24 horas os recipientes contendo os ovos são retirados das gaiolas e acompanhados até a eclosão das larvas. As larvas eclodidas são então coletadas e concentradas em um recipiente, para que sejam distribuídas em bacias plásticas contendo aproximadamente 1L de água.

A alimentação das larvas é realizada diariamente com ração para peixes (Goldfish Colour). As pupas obtidas são separadas em machos e fêmeas e após a emergência os adultos são colocados em gaiolas.

3.2 Camundongos

Camundongos adultos da linhagem Balb-C, produzidos pelo biotério do ICB-II da USP, foram utilizados na alimentação sanguínea dos mosquitos. Todos os animais utilizados neste trabalho foram mantidos e tratados sob

condições estritas de ética de acordo com as recomendações internacionais de bem-estar do animal (National Research Council, 1996).

3.3 Construções Genéticas Utilizadas

Foram utilizadas quatro construções denominadas OX513, OX882, OX3653 e OX3778, doadas pela empresa Oxitec, descritas a seguir.

3.4 Estrutura e Função das Construções

Os transgênicos obtidos a partir dessas construções podem ser facilmente identificados devido a expressão do *DsRed2*. Nestas construções, o tTAV (tetracycline repressible transcription activator) é um ativador transcricional tetraciclina repressível que se encontra sobre o controle de seu próprio sítio de ligação, teTO, um promotor mínimo de *Drosophila hsp70*, e uma sequência 3' UTR de *Drosophila fs(1)K10*.

Na ausência de tetraciclina, tTAV se liga ao teTO o que leva a expressão de mais tTAV, em um possível feedback positivo. Na presença de tetraciclina, tTAV não se liga ao teTO, ligando-se a tetraciclina. A tetraciclina não se liga ao teTO e portanto não leva a expressão de mais tTAV.

Consequentemente, estas construções geram altos níveis de expressão de tTAV na ausência de tetraciclina, mas apenas uma expressão basal em sua presença. Altos níveis de expressão de tTAV é tóxico, possivelmente por causa da interação do domínio VP16 com fatores de transcrição chaves, então esta construção proporciona um sistema letal tetraciclina-repressível.

Figura 5: Estrutura e Função dos Transposons OX513. Fonte: Phuc et al. 2007

A construção OX-882 (Figura 6) é muito semelhante à OX-513 (Figura 5), a principal diferença é no uso do promotor *IE-2* derivado do baculovirus *OpNPV* para comandar a expressão do marcador *DsRed2*, no lugar do *Act5C*, apresentando menor toxicidade (Phuc et al. 2007).

Figura 6: Estrutura e Função dos Transposons OX882. Fonte: Phuc et al. 2007

A construção OX-3653 (Figura 7) apresenta dois promotores, um específico de olho 3XP3 e o constitutivo *Hr5IE1*, e dois marcadores diferentes, o *DsRed2* e o *AmCyan*.

Figura 7: Estrutura da Construção OX-3653

Este plasmídeo não possui integrado em sua construção um gene letal, não possui a expressão da proteína tetraciclina-repressível tTAV e, portanto não necessita do repressor químico tetraciclina, por isso apresenta maior eficiência, por volta de 5 a 15% de sobrevivência.

Figura 8: Estrutura da Construção OX3778

O plasmídeo OX-3778 (Figura 8) possui um gene efetor que atrofia o músculo dorsal de fêmeas, as impedindo de voar, além de possuir sistemas de integração ao genoma melhorados em relação aos plasmídeos previamente utilizados. O promotor utilizado nesta construção é o 3XP3, específico de olho e o marcador genético escolhido foi o *DsRed2*.

3.5 Transformação e Retransformação de Plasmídeos

3.5.1 Meio de Cultura

Foram feitas placas de meio LB-Agar para o cultivo de bactérias competentes a fim de inserir os plasmídeos. Foi utilizado 500ml de LB-Agar (para 20 placas) com 100 µg/ml de ampicilina, adicionando 4,5g de Bacto Agar, 3g de Triptona, 1,5g de extrato de levedura e 3g de NaCl. Essa mistura foi autoclavada. Após autoclavagem o meio foi distribuído nas

placas. Foi adicionado 100mM de IPTG (23,8 mg/ml de água), solução de XGAL a 2% (0,02g/1ml) e as placas foram mantidas a 4°C.

3.5.2 Preparo das Células Eletro-Competentes

Células eletro competentes *Escherichia coli* DH10B foram preparadas para a transfecção dos plasmídeos. Foram plaqueadas células DH10B e mantidas a 37°C durante a noite (*overnight*). Utilizando um palito autoclavado uma colônia isolada foi retirada e colocada em um tubo com 5ml de meio LB com 100µg/ml de ampicilina pré-aquecido em banho-maria a 37°C e o deixamos em agitação *overnight*, também a 37°C.

Foi retirado 5ml de meio com células competentes e colocado em um recipiente com 500ml de meio de cultura LB com 100 µg/ml de ampicilina, que foi mantido novamente sob agitação até alcançar densidade óptica de 0,650nM. A cultura foi então retirada e colocada no gelo por 30 minutos.

Foram feitas alíquotas em tubos tipo Falcon 50ml e centrifugadas à 7000xG durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 500ml de água gelada e centrifugadas novamente a 7000xG durante 5 minutos, a 4°C. Repetindo o procedimento, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 250 ml de água gelada, e centrifugadas novamente a 7000xG durante 5 minutos, a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10ml de glicerol gelado a 10%, centrifugando novamente a 7000xG durante 5 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1,5ml de glicerol a 10%, estando assim prontas para uso.

Para a retransformação dos plasmídeos foi adicionado 5µl de cada Plasmídeo a 100µl de células competentes.

3.6 Purificação dos Plasmídeos

3.6.1 Extração de DNA de Plasmídeo por Lise Alcalina

A extração de DNA de plasmídeo por lise alcalina foi realizada nos plasmídeos obtidos através das transformações das bactérias utilizando o Kit Mini Prep Qiagen.

3.6.2 Extração de DNA de Plasmídeo por Lise Alcalina em Larga Escala

A partir de amostras purificadas pela extração de DNA de plasmídeo por lise alcalina, as amostras dos 4 plasmídeos - OX513, OX882, OX3653 e OX3778 (*flightless*) além do plasmídeo *Helper* foram novamente transformados em bactérias competentes e purificadas com o Kit Maxi Prep Qiagen.

3.7 Microinjeção: procedimentos

3.7.1 Solução de Injeção

A cada procedimento de micro-injeção foi feita uma solução de cada um dos plasmídeos em tampão KCl 0,1nM, NaH₂PO₄, no volume final de 40µl. Este processo foi repetido em todos os lotes de injeção, utilizando sempre a concentração de 0,5µg/µl para os plasmídeos e 0,3µg/µl para o *Helper piggyBac*.

3.7.2 Preparação dos Capilares

Os capilares de borosilicato, utilizados na microinjeção, foram confeccionados por estiramento no equipamento Sutter (Figura 9) nas seguintes condições:

Ciclo 1: Heat 421, Pull 150, Velocidade 150 e Time 200.

Ciclo 2: Heat 421, Pull 200, Velocidade 200 e Time 200.

A mistura de plasmídeos, por volta de 2µl, foi inserida nos capilares com o auxílio de uma microponteira Eppendorf (microloader).

Figura 9: Capilar de quartzo após ser confeccionado por estiramento no equipamento Sutter.

3.7.3 Microinjeções em embriões de *Culex quinquefasciatus*

Machos e fêmeas de *Culex quinquefasciatus* adultos foram colocados na mesma gaiola para realização da cópula. Após três dias foi oferecido repasto sanguíneo em camundongos.

Quatro dias após o repasto sanguíneo, foram colocados recipientes contendo água autoclavada nas gaiolas, no foto período noturno. Após 30 minutos os recipientes foram removidos e as jangadas de ovos retiradas e colocadas em papel filtro sob uma lupa estereoscópica.

Os ovos então foram alinhados na mesma orientação, pois a agulha deve penetrar sempre no pólo posterior. Os ovos depois de alinhados foram fixados em uma lamínula com uma fita dupla-face, cobertos com óleo halocarbono (SIGMA) e levados ao microscópio óptico para a microinjeção realizada no aparelho FemtoJet Eppendorf.

3.7.4 Procedimentos após as Microinjeções: tentativa de obtenção de linhagem transgênica

Depois de realizadas as microinjeções, as lamínulas contendo os ovos injetados foram coladas em uma lâmina com a parte posterior dos ovos voltadas para baixo. Um papel filtro foi colado de forma a encostar-se à parte posterior dos ovos. A lâmina então foi colocada em um tubo Falcon de 50ml contendo 30ml de água com Tetraciclina na concentração de 30µg/ml e deixados por dois dias em uma sala com temperatura e umidade controladas. Após esse período, a maioria dos ovos eclodiram, porém algumas larvas ficaram presas na fita dupla-face e foram removidas com água destilada. As larvas foram transferidas para uma caixa de plástico com 1L de água com Tetraciclina na concentração de 30µg/ml e alimentadas com ração para peixe (Goldfish Colour).

Os embriões injetados com a construção OX3653 não necessitam do repressor químico (tetraciclina) em seu meio, uma vez que o plasmídeo não possui gene letal efetor. Todos os outros procedimentos foram similares.

As pupas foram colocadas individualmente em copos, e após a emergência dos adultos, para cada macho eram colocadas dez fêmeas selvagens (agrupamento dos machos) e para cada fêmea eram colocados três machos (agrupamento das fêmeas). Após três dias foi oferecido o repasto sanguíneo, e novamente três dias depois eram colocados pequenos béqueres contendo água com tetraciclina para a oviposição. Após alguns dias as posturas eram retiradas e os ovos colocados em recipientes com água e tetraciclina na concentração de 30µg/ml para a eclosão.

As larvas eclodidas foram mantidas até aproximadamente o estágio de L4 e então foram analisadas quanto à presença de *DsRed2* sob luz UV.

3.8 Cruzamentos

Os cruzamentos foram feitos como padronizados anteriormente (Wilke 2008), que consiste no cruzamento de 01 macho injetado com 10 fêmeas selvagens, e 10 fêmeas injetadas com 10 machos selvagens. Após um período preestabelecido de cruzamentos em lotes individuais, todos os mosquitos foram unidos em uma gaiola. No caso da obtenção de larvas transgênicas, cada indivíduo será tratado como uma linhagem separada.

3.8.1 Seleção dos transformados:

As larvas foram analisadas seguindo o mesmo protocolo desenvolvido por Wilke (2008).

3.9 Microinjeções em Adultos:

Mosquitos *Culex quinquefasciatus* foram microinjetados no tórax com uma solução de plasmídeos contendo o marcador molecular *DsRed2* sob o controle de promotores específicos.

Fêmeas selvagens recém-emergidas foram divididas em 5 grupos de 50 indivíduos e injetadas no tórax com solução de plasmídeo com 1µg/ml. O grupo utilizado como controle foi injetado com PBS (tampão fosfato-salino - NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM e pH de 7.4). Após a microinjeção, foi oferecida solução de sacarose a 10% e após 3-5 dias, analisadas para a presença de expressão *DsRed2* (vermelho), sob luz UV.

Para amplificação do fragmento com 675 pares de bases responsável por codificar a proteína *DsRed2* foi realizada reação de PCR utilizando os seguintes oligonucleotídeos (*primers*): *DsRed2*-for: 5'-atggcctcctccgagaacgt-

3'; *DsRed2*-rev: 5'-caggaacaggtggtggcggc-3'. Posteriormente, reações da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram também realizadas utilizando o kit QIAGEN One-Step RT-PCR como especificado no manual, com o objetivo de observar a presença de cDNA.

A reação de amplificação foi feita utilizando-se 1,0 µl de DNA da amostra, 2 µL de 10X PCR buffer, 0.2 µL de 10 mM dNTP, 0.25µl de *Taq* DNA polymerase 5 U/µL e 1,0 µL de MgCl, com volume final de 20µl.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador My Cycler (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 40 seg, 55°C por 40 seg, 72°C por 30 seg, com um ciclo de extensão final de 72°C por 15 min. Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e as mesmas foram fotografadas com câmera digital.

3.10 Análise Populacional com Microssatélites

Para esta análise foram utilizadas amostras de mosquitos *Culex quinquefasciatus* capturadas em diversas regiões do Brasil e Argentina, além de mosquitos provenientes de nossa colônia (300 indivíduos) (Figura 10; Tabela 1).

Os exemplares da espécie de *Culex quinquefasciatus* foram selecionados para realização das análises moleculares, em áreas no extremo Sul do Brasil onde podem ser encontrados híbridos de *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens*, sendo que diferenças genéticas entre estas e outras populações do Brasil são esperadas.

Foram utilizadas populações provenientes dos extremos do território nacional como, por exemplo, Rio Branco – AC, no extremo oeste do país e

Belém – PA no extremo leste. As populações foram coletadas e doadas por Sirlei Antunes de Moraes.

Foram utilizados trinta exemplares adultos de fêmeas de cada população para a extração do DNA.

3.11 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi feita com o Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante.

3.13 Oligonucleotídeos (*Primers*)

Selecionamos por meio de pesquisas bibliográficas 6 pares de *primers* microssatélites previamente utilizados em *Culex pipiens* (Tabela 2).

3.13 Amplificação dos Microssatélites

A reação de amplificação foi preparada a partir do DNA extraído de cada mosquito, com volume final de 20µL utilizando-se 1,0µl de DNA da amostra, 2µL de 10X PCR buffer, 0,5µL de 10mM dNTP, 0,25µl de *Taq* DNA polimerase 5U/µL e 1,0µL de MgCl. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador My Cycler (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 40 seg, 55°C por 40 seg, 72°C por 30 seg, com um ciclo de extensão final de 72°C por 15 min. Após a amplificação os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e as mesmas foram fotografadas com câmera digital.

3.14 Sequenciamento ABI

Foram selecionados seis pares de *primers* - CA-115, GT-14, GT-108, GA-12, CA-118, e ATG-09 (Tabela 2), os quais foram marcados no sentido 5' com fluorescência (FAM, HEX ou NED) apropriada para o sequenciador ABI 3730.

Após a amplificação, foram realizadas diluições dos produtos de PCR, adicionando 3µL de cada um dos produtos de PCR aos respectivos *primers* GT-108, ATG-09 e CA-118 e adicionando 21 µL de água ultrapura para um volume final de 30µL. Uma nova diluição foi realizada, 2µL de PCR foram ressuspensos em 7,5µL de Formamida HI-DI (Applied Biosystems). Em seguida adicionamos 0,5µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) para um volume final de 10µL. As amostras então, foram encaminhadas em micro tubos de 0,2mL para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo onde foi realizada a eletroforese das amostras no sequenciador automático ABI 3730.

3.15 Análise dos Fragmentos Obtidos e Análise Estatística

Analizamos os resultados e obtivemos o tamanho dos fragmentos amplificados utilizando o programa GeneMarker. Utilizamos o site Genepop (<http://genepop.curtin.edu.au/>) e os programas, Structure (versão 2.3.3), Arlequin (versão 3.5.1.2) e DNAsp (versão 5.10) para realizarmos os testes estatísticos.

Tabela 1: Populações utilizadas segundo local de coleta e coordenadas.

População	Local de Coleta	Coordenada
Rio Branco	Rio Branco - AC	10°1'17.47"S / 67°46'36.43"W
Belém	Belém - PA	1°34'30.83"S / 48°27'58.97"W
Colônia	São Paulo - SP	23°34'0.44"S / 46°43'57.61"W
La Plata	La Plata - Argentina	34°55'2.86"S / 57°56'57.13"W
Teresina	Teresina - PI	5°6'22.28"S / 42°46'28.18"W
Pontes e Lacerda	Pontes e Lacerda - MT	15°15'42.29"S / 59°17'59.74"W
Santa Vitória	Santa Vitória - RS	33°30'33.51"S / 53°19'16.71"W
Chapecó	Chapecó - SC	27°3'23.01"S / 52°35'9.32"W
PET - Parque ecológico do Tietê	São Paulo - SP	23°29'1.07"S / 46°30'14.41"W
Rio Pinheiros	São Paulo - SP	23°38'48.31"S / 46°43'37.07"W

Tabela 2. *Primers* selecionados de trabalhos com *Culex pipiens*, variação do tamanho de cada alelo, número de alelos encontrados e motivos de repetição.

Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do Alelo <i>Culex pipiens</i> (bp)	Número de Alelos	Motivos de Repetição	Referências
CA115	F: GTCGTCAAAGTCCCAATAA R: GCGGAAATAGAACAAACG	157-289	17	CA	Edillo et. al. 2007
GT14	F: TGTTAGCCTAGTGGGAAGGTG R: AATCCACCATGCACGGATAC	162-288	14	GT	Smith et. al. 2005
GT108	F: CGTGTTTTATAGGCTTCTTTC R: TCTTCCTTAACCTTACCCACTC	100-214	11	GT	Edillo et. al. 2007
GA12	F: ACCCGTTCTGGCAACACTG R: TGGTGCGGATGGACGTT	113-139	9	CT	Smith et. al. 2005
CA118	F: ACCCGAGCCACCTTAT R: CCCCCATTTACACCTGT	114-282	9	CA	Edillo et. al. 2007
ATG9	F: CCACTCAAAGTAAACACCACA R: AATGCCATAACCATCGTCAT	184-262	9	ATG	Edillo et. al. 2007

Figura 10: Populações utilizadas e suas respectivas localizações geográficas. Fonte: Google Earth.

- Rio Branco: Mosquitos vivem em região equatorial com temperaturas variando entre 25-40 C°. Região amazônica, extremo oeste do Brasil.
- Belém: Região equatorial às margens do rio Amazonas, apenas 6,5% da descarga domiciliar está conectada à rede coletora acarretando a abundância de criadouros.
- Colônia: Monomórfica e com altos níveis de endogamia por estar isolada em laboratório há mais de 20 anos.
- La Plata: Zona de hibridização entre mosquitos *Culex quinquefasciatus/pipiens*.
- Pontes e Lacerda: Área de transição entre a Floresta Amazônica e o Cerrado. Clima tropical úmido.
- Santa Vitória: Localizada no extremo meridional do Brasil, clima temperado. Cidade de apenas 30 mil habitantes.
- Chapecó: Localizada na bacia hidrográfica do Rio Uruguai, temperatura média anual de 19,60°C.
- PET: Mosquitos coletados em parque com 12,5 milhões de m² localizado dentro da cidade de São Paulo.
- Teresina: Área tropical semiúmida, localizada em zona de transição entre o Nordeste e Amazônia.

- Rio Pinheiros: mosquitos urbanos, sujeitos a pressões seletivas causadas pelo homem, elevada antropofilia.

4 RESULTADOS

4.1.1 Microinjeções

Foram microinjetados 16 mil embriões de mosquitos *Culex quinquefasciatus*, sendo que: 2 mil utilizando o plasmídeo OX-513, 1 mil utilizando o plasmídeo OX-882, 3 mil utilizando o plasmídeo OX-3653 e 10 mil utilizando o plasmídeo OX-3778 resultando em 1443 adultos dos quais 896 eram machos e 547 eram fêmeas. Foram analisadas 327.620 larvas, nenhuma positiva para expressão de *DsRed2*.

4.1.2 Cruzamentos

Após o procedimento de microinjeção, os mosquitos machos que chegaram à fase adulta foram separados individualmente em lotes com 10 fêmeas selvagens virgens. Fêmeas microinjetadas foram dispostas em lotes de 10 fêmeas microinjetadas e 10 machos selvagens.

4.1.3 OX-513

Após a microinjeção de 2 mil embriões utilizando o plasmídeos OX-513, obtivemos 192 mosquitos adultos, dos quais 98 eram machos e 94 fêmeas. Cada macho microinjetado foi separado individualmente com 10 fêmeas selvagens formando 98 lotes. Fêmeas microinjetadas formaram 9 lotes, dos quais 4 eram compostos por 11 fêmeas microinjetadas e 11 machos selvagens e 5 lotes compostos por 10 fêmeas microinjetadas e 10 machos selvagens (Tabela 3). Resultando em aproximadamente 23.700 larvas. Nenhuma larva positiva foi encontrada.

Tabela 3: Resultados dos cruzamentos de machos e fêmeas microinjetados utilizando o plasmídeo OX-513.

Cruzamentos	Larvas analisadas
Machos Injetados X Fêmeas Selvagens	15.500
Fêmeas Injetadas X Machos Selvagens	8.200
Total	23.700

4.1.4 OX-882

Após a microinjeção de mil embriões utilizando o plasmídeo OX-882 obtivemos 66 mosquitos adultos, dos quais 42 eram machos e 24 fêmeas. Cada macho microinjetado foi separado individualmente com 10 fêmeas selvagens formando 42 lotes. Fêmeas microinjetadas formaram 2 lotes compostos por 12 fêmeas microinjetadas e 12 machos selvagens (tabela 4). Resultando em aproximadamente 6.100 larvas. Nenhuma larva positiva foi encontrada.

Tabela 4: Resultados dos cruzamentos de machos e fêmeas microinjetados utilizando o plasmídeo OX-882.

Cruzamentos	Larvas analisadas
Machos Injetados X Fêmeas Selvagens	4.200
Fêmeas Injetadas X Machos Selvagens	1.900
Total	6.100

4.1.5 OX-3653

Após a microinjeção de 3 mil embriões utilizando o plasmídeos OX-3653, obtivemos 263 mosquitos adultos, dos quais 165 eram machos e 98 fêmeas. Cada macho microinjetado foi separado individualmente com 10 fêmeas selvagens formando 165 lotes. Fêmeas microinjetadas formaram 10 lotes, dos quais 9 compostos por 10 fêmeas microinjetadas e 10 machos selvagens e 1 lote composto por 8 fêmeas microinjetadas e 10 machos

selvagens (tabela 5). Resultando em aproximadamente 57.820 larvas. Nenhuma larva positiva foi encontrada.

Tabela 5: Resultados dos cruzamentos de machos e fêmeas microinjetados utilizando o plasmídeo OX-3653.

Cruzamentos	Larvas analisadas
Machos Injetados X Fêmeas Selvagens	47.250
Fêmeas Injetadas X Machos Selvagens	10.570
Total	57.820

4.1.6 OX-3778

Após a microinjeção de 10 mil embriões utilizando o plasmídeos OX-3778, obtivemos 922 mosquitos adultos, dos quais 591 eram machos e 331 fêmeas. Cada macho microinjetado foi separado individualmente com 10 fêmeas selvagens formando 591 lotes. Fêmeas microinjetadas formaram 33 lotes, dos quais 32 compostos por 10 fêmeas microinjetadas e 10 machos selvagens e 1 lote composto por 9 fêmeas microinjetadas e 10 machos selvagens (tabela 6). Resultando em aproximadamente 240.000 larvas. Nenhuma larva positiva foi encontrada.

Tabela 6: Resultados dos cruzamentos de machos e fêmeas microinjetados utilizando o plasmídeo OX-3778.

Cruzamentos	Larvas analisadas
Machos Injetados X Fêmeas Selvagens	215.000
Fêmeas Injetadas X Machos Selvagens	25.000
Total	240.000

4.2.1 Microinjeção em Adultos

Mosquitos adultos foram divididos em 5 lotes de 50 indivíduos sendo um lote de controle (injetados com PBS) e quatro lotes com os plasmídeos OX-513, OX-882, OX-3653 e OX-3778 respectivamente (Wilke et al. *em publicação*, ANEXO 1).

Após 3-5 dias analisamos os mosquitos sobreviventes (60-80%) procurando por expressão de *DsRed2* e obtivemos 4 indivíduos expressando *DsRed2*, representando uma taxa de transformação de 2% dos indivíduos microinjetados. Foi então, selecionado um indivíduo do Lote 4 (OX3778) que apresentava expressão de *DsRed2* de forma transiente para as análises subsequentes (Figura 11).

Figura 11. Mosquito *Culex quinquefasciatus* injetado expressando *DsRed2* na região do Tórax ao lado de mosquito selvagem sem expressão.

Foram realizadas reações de PCR para amplificação de um fragmento de 675 pares de bases (pb) da proteína *DsRed2*, de todos indivíduos em pools de 10. Apenas indivíduos que apresentaram expressão de *DsRed2* foram processados individualmente (Amostra 9). Como controle positivo

foram utilizados os plasmídeos OX3653 e OX3778 e como controle negativo foi utilizado água (H₂O) (Figura 12).

A amplificação do fragmento de *DsRed2* na amostra 9, indica a presença de DNA do plasmídeo no mosquito de forma estável. O fato de nenhum outro indivíduo ter sido positivo para a presença de *DsRed2* indica que o plasmídeo foi degradado e não está presente no mosquito, e portanto não haverá produção de RNA referente a molécula de *DsRed2*.

Figura 12. PCR de mosquitos *Culex quinquefasciatus* adultos injetados mostrando amostra 09 positiva para *DsRed2* (675 pb). Peso molecular New England Biolabs (100 bp), controle negativo: H₂O e controles positivos: plasmídeos OX3653 e OX3778 (675 pb). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Após as amplificações de fragmentos da proteína fluorescente *DsRed2* indicando a presença de DNA do plasmídeo no indivíduo 9, reações de RT-PCR foram realizadas como forma de comprovar a produção de RNA pelo mosquito através do plasmídeo (Figura 13). A obtenção de cDNA a partir de mRNA comprova a capacidade do mosquito em expressar moléculas a partir DNA contido em plasmídeos.

Figura 13. RT-PCR de mosquito *Culex quinquefasciatus* onde é possível observar o fragmento amplificado de cDNA utilizando *primers* específico de *DsRed2*. Peso molecular New England Biolabs (100 bp). Controle negativo: H₂O. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.3 Microssatélites

4.3.1 Seleção dos *Primers*

Oligonucleotídeos foram selecionados através de pesquisas bibliográficas de artigos referentes à amplificação de microssatélites em mosquitos do gênero *Culex*. Foram selecionados 6 pares de *primers* para serem testados e utilizados em mosquitos *Culex quinquefasciatus*.

Com o intuito de testar o funcionamento e adaptabilidade destes *primers* microssatélites, uma vez que estes nunca haviam sido testados neste mosquito, foi realizada uma reação de PCR utilizando mosquitos selecionados aleatoriamente das 10 populações posteriormente analisadas. Todos os *primers* amplificaram fragmentos de DNA (Figura 14).

Figura 14. Reação de PCR utilizando os 6 pares de *primers* selecionados. Peso molecular New England Biolabs (100 pb). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Os *primers* foram então utilizados nas populações de *Culex quinquefasciatus*, resultando no polimorfismo mostrado na Tabela 7.

Tabela 7. *Primers* microssatélites utilizados em *Culex quinquefasciatus*, variação no tamanho de alelo, número de alelos encontrados e motivos de repetição.

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Tamanho do Alelo <i>Culex quinquefasciatus</i> (bp)	Numero de Alelos	Motivos de Repetição
CA115	F: GTCGTCAAACCTGCCAATAA R: GCGGAAATAGAACAAACG	86-296	30	CA
GT14	F: TGTTAGCCTAGTGGGAAGGTG R: AATCCACCATGCACGGATAC	106-200	18	GT
GT108	F: CGTGTTTTATAGGCTTCTTTC R: TCTTCCTTAACCTTACCCACTC	106-316	27	GT
GA12	F: ACCCGTTCTGGCAACACTG R: TGGTGCGGATGGACGTT	110-188	17	CT
CA118	F: ACCCGAGCCAACCTTAT R: CCCCCATTTACACCTGT	112-254	26	CA
ATG9	F: CCACTCAAACCTAAAACACCACA R: AATGCCATAACCATCGTCAT	108-300	26	ATG

4.3.2 Variabilidade Genética de Mosquitos *Culex quinquefasciatus*

Análise de variabilidade genética das 10 populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus* utilizando seis *primers* microssatélites (GT-108, ATG-09, CA-118, GT-14, GA-12, CA-115), para número de alelos, coeficiente de endogamia (Fis) e equilíbrio de Hardy–Weinberg (Tabela 8).

Tabela 8: Variabilidade genética para os seis *loci* microssatélites de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Coeficiente de endogamia (F_{is}). Em negrito, valor de P significativo ($\alpha = 0.05$) após correção de Bonferroni rejeita o equilíbrio de Hardy–Weinberg. $p < 0.00083$. Correção de Bonferroni 0.05/60.

<i>Locus</i>	População	Número de Alelos	Heterozigosidade Observada (%)	Heterozigosidade Esperada (%)	F_{is}	P
GT-108	Rio Branco	11	50.0	78.1	0.3636	0.0000
	Belém	13	63.3	87.1	0.2764	0.0000
	Colônia	3	36.7	39.6	0.0754	0.0208
	La Plata	11	66.7	88.7	0.2521	0.0000
	Teresina	12	56.7	83.7	0.3270	0.0015
	Pontes e	11	56.7	88.2	0.3614	0.0000
	Santa Vitória	9	63.3	80.6	0.2173	0.0652
	Chapécó	10	50.0	84.7	0.4141	0.0000
	PET	10	70.0	82.0	0.1488	0.0866
	Rio Pinheiros	11	50.0	83.4	0.4049	0.0004
ATG-09	Rio Branco	7	60.0	69.3	0.1358	0.0264
	Belém	9	36.7	67.2	0.4584	0.0000
	Colônia	3	0	12.8	1,000	0.0003
	La Plata	11	60.0	84.2	0.2912	0.0000
	Teresina	6	46.7	64.8	0.3357	0.0062
	Pontes e	8	76.7	73.4	0.0016	0.0307
	Santa Vitória	8	76.7	84.2	0.0907	0.1528
	Chapécó	13	50.0	80.7	0.3847	0.0000
	PET	7	86.7	76.8	-0.0870	0.0025
	Rio Pinheiros	10	66.7	79.9	0.1679	0.0135
CA-118	Rio Branco	6	36.7	52.9	0.3110	0.0246
	Belém	13	53.3	88.1	0.3990	0.0000
	Colônia	3	0	12.9	1,000	0.0002
	La Plata	7	40.0	60.3	0.3409	0.0000
	Teresina	6	20.0	64.2	0.6920	0.0000
	Pontes e	11	40.0	82.2	0.5177	0.0000
	Santa Vitória	9	46.7	82.0	0.4349	0.0000
	Chapécó	11	46.7	77.3	0.4007	0.0000
	PET	7	26.7	38.4	0.3085	0.0028
	Rio Pinheiros	9	56.7	75.6	0.2536	0.0000
GT-14	Rio Branco	10	26.7	71.2	0.6297	0.0000
	Belém	13	43.3	73.9	0.4178	0.0000
	Colônia	/	/	/	/	/
	La Plata	5	5.9	48.7	0.8824	0.0000
	Teresina	5	34.5	66.2	0.4834	0.0004
	Pontes e	5	36.7	70.8	0.4863	0.0006
	Santa Vitória	5	17.8	63.0	0.7202	0.0000
	Chapécó	5	28.0	70.6	0.6084	0.0000
	PET	5	35.7	62.5	0.4334	0.0001
	Rio Pinheiros	5	34.5	71.9	0.5246	0.0000

Tabela 8: Continuação

GA-12	Rio Branco	6	70.0	73.5	0.0492	0.5001
	Belém	10	70.0	74.6	0.0624	0.0147
	Colônia	2	46.7	50.6	0.0794	0.7247
	La Plata	4	75.9	61.2	-0.2457	0.0002
	Teresina	5	53.3	72.9	0.2716	0.0001
	Pontes e	7	56.7	75.1	0.2485	0.0000
	Santa Vitória	6	56.7	58.3	0.0286	0.1251
	Chapécó	7	43.3	67.8	0.3653	0.0007
	PET	8	66.7	71.6	0.0698	0.2943
	Rio Pinheiros	5	50.0	68.5	0.2738	0.0073
CA-115	Rio Branco	12	57.7	82.2	0.3023	0.0000
	Belém	13	76.7	83.8	0.0863	0.1448
	Colônia	3	0	61.5	1,000	0.0000
	La Plata	12	53.3	82.4	0.3564	0.0000
	Teresina	5	28.6	66.7	0.5765	0.0002
	Pontes e	5	56.7	75.4	0.2519	0.0576
	Santa Vitória	6	30.0	64.1	0.5364	0.0000
	Chapécó	9	40.0	64.1	0.3797	0.0034
	PET	5	50.0	58.4	0.1454	0.0010
	Rio Pinheiros	6	36.7	57.4	0.3652	0.0239

A análise de variabilidade genética das 10 populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus* utilizando seis *primers* microssatélites (GT-108, ATG-09, CA-118, GT-14, GA-12, CA-115), utilizando índice Fst (índice de heterogeneidade genética) com o intuito de quantificar níveis de estruturação genética entre populações (Tabela 9).

Tabela 9: Média da variação genética entre todas as populações utilizadas. Valores estatisticamente significativos em todas as populações analisadas. Valor de $p < 0,05$.

População	Média dos valores Fst
Rio Branco	0.11
Belém	0.1
Colônia	0.26
La Plata	0.14
Teresina	0.1
Pontes e Lacerda	0.07
Santa Vitória	0.1
Chapecó	0.09
PET	0.09
Rio Pinheiros	0.08

4.3.3 Dendrograma

Um dendrograma foi construído a partir dos dados obtidos após a utilização dos seis *primers* microssatélites (GT-108, ATG-09, CA-118, GT-14, GA-12, CA-115) em 10 populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Pode ser observado a formação de *clusters* agrupando populações das regiões Norte e Centro-Oeste e Sudeste e Sul. As populações La Plata e Colônia não se agruparam com nenhuma outra população, sendo que a população Colônia mostrou-se a mais distinta em relação às outras populações (Figura 15).

Figura 15: Dendrograma de Distância Genética entre Populações de *Culex quinquefasciatus*.

4.3.4 Cluster Multi-Locus

A Figura 16 mostra os resultados da análise Bayesiana de *cluster multi-locus* para todas as 10 populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada população composta por 30 indivíduos.

Figura 16: Análise Bayesiana de *cluster multi-locus* de genótipos microssatélites. Cada um dos 300 indivíduos incluídos na análise é representado por uma linha vertical, fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade de cada indivíduo em pertencer a algum dos *clusters* genéticos. 1- Rio Branco, 2-Belém, 3-Colônia, 4-La Plata, 5-Teresina, 6-Pontes e Lacerda, 7-Santa Vitória, 8- Chapecó, 9-PET e 10-Rio Pinheiros.

5 DISCUSSÃO

5.1 Transgenia

Diversas espécies de mosquito foram transformadas com sucesso e mantidas como linhagens transgênicas estáveis, como por exemplo: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes fluviatilis*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* (Miller et al. 1987, Jasinskiene et al. 1998, Catterucia et al. 2000, Rodrigues et al. 2006, Labbé et al. 2010). No entanto, mosquitos de gênero *Culex* são especialmente difíceis de transformar por métodos convencionais, de microinjeção em embriões, pois fêmeas deste gênero de mosquito ovipõem seus ovos aglutinados em forma de “jangada”. Para o processo de microinjeção é necessário que os ovos sejam dispostos individualmente e uma vez separados, não é possível uni-los novamente.

Esse problema não existe em mosquitos *Aedes* ou *Anopheles*, uma vez que fêmeas desses mosquitos ovipõem seus ovos individualmente, e em alguns casos, ovos de *Aedes* podem resistir à dessecação por vários meses em estado de diapausa, tornando possível para o indivíduo recuperar-se do trauma causado pela microinjeção e inserção do transgene em seu genoma antes de começar a desenvolver-se (Jasinskiene et al. 1998). Existem diversas linhagens transgênicas de *Aedes aegypti*, e sua transformação pode ser obtida com relativa facilidade (Moreira et al. 2000; Lobo et al. 2002; Phuc et al. 2007).

Embriões de mosquitos *Culex* não podem postergar a embriogênese, e a necessidade de ampla manipulação dos ovos representam grandes limitações que resultam em drástica redução na taxa de sobrevivência e no sucesso na transformação desses mosquitos.

A tentativa de transformação de mosquitos *Culex quinquefasciatus* foi iniciada utilizando os plasmídeos OX-513 e OX-882. Essas construções foram utilizadas com sucesso na transgenia de mosquitos *Aedes aegypti* e possuem marcadores fluorescentes *DsRed2* ligados a um promotor de actina e sistema repressível feedback positivo utilizando fusões de proteínas

tTA e teTO, tóxicas ao mosquito quando expressas (Alphey 2002). Estes plasmídeos apresentam alta toxicidade ao mosquito e como consequência, reduzem a taxa de sobrevivência de mosquitos injetados. Existem problemas com a funcionalidade do repressor químico que inibe a letalidade do construto, porém inibe o marcador molecular fluorescente *DsRed2* de forma indesejada, dificultando sua visualização. Esse sistema não é sexo específico, sendo necessária separação entre machos e fêmeas, uma vez que seja estabelecida uma linhagem transgênica. Com a obtenção de plasmídeos de melhor funcionalidade, os plasmídeos OX-513 e OX-882 não foram mais utilizados em tentativas posteriores de obtenção de linhagens transgênicas.

O plasmídeo OX-3653 não necessita de repressores químicos, pois não possui gene letal, apenas marcadores fluorescentes (L. Alphey, comunicação pessoal). Esse plasmídeo é significativamente menos tóxico para os embriões e de mais fácil integração ao genoma. Assim como os demais plasmídeos, o OX-3653 possui marcador *DsRed2* ligado a um promotor de actina, existe porém, um segundo promotor: o 3XP3, também ligado ao marcador *DsRed2* expresso nos olhos e nervos ópticos.

Esse plasmídeo é muito útil por ter uma logística menos complexa e menor toxicidade devido à falta de gene efetor, o que pode reduzir a dificuldade de obtenção de uma linhagem transgênica. Este plasmídeo foi utilizado em função da dificuldade de transformação de mosquitos do gênero *Culex*, e das limitações dos plasmídeos OX-513 e OX-882. Foi utilizado o plasmídeo OX-3653 até o recebimento do plasmídeo OX-3778, que possui as características de baixa toxicidade e melhoria nos sítios de ligação com a transposase, facilitando sua inserção no genoma, além de possuir gene efetor.

O plasmídeo OX-3778, também conhecido como *flightless*, atrofia o músculo dorsal em fêmeas, impedindo-as de voar e, consequentemente de se alimentarem e copularem, acarretando morte. O sistema é repressível com a utilização de tetraciclina (Labbé et al. 2012). Mosquitos *Aedes aegypti*

e *Aedes albopictus* foram transformados com sucesso com o plasmídeo OX-3778, demonstrando a possibilidade de se produzir um sistema de efetividade tardia, repressível, tecido específico e com expressão apenas em fêmeas causando o fenótipo *flightless* (Fu et al. 2010; Labbé et al. 2012).

A incapacitação causada às fêmeas pode ser considerada como equivalente à letalidade de um sistema RIDL tradicional, uma vez que fêmeas transformadas com o plasmídeo OX-3778 são incapazes de atrair machos na natureza e, portanto, incapazes de procriar (Fu et al. 2010).

O fenótipo *flightless* em fêmeas permite a liberação de ovos diretamente nos criadouros, uma vez que machos e fêmeas transgênicos competirão por alimento com mosquitos selvagens até o estágio de pupa. Após a emergência dos mosquitos transgênicos, as fêmeas seriam incapazes de voar, assim, machos homozigotos para o gene *flightless*, copulariam com fêmeas selvagens acarretando a diminuição da população alvo (Labbé et al. 2012).

Uma linhagem transgênica de mosquitos *Aedes aegypti* portadora do gene efector *flightless* foi testada em Chiapas, México com o intuito de comprovar a eficácia dessa abordagem. Machos transgênicos foram introduzidos em grandes gaiolas contendo milhares de mosquitos selvagens machos e fêmeas, na proporção de 10:1 machos transgênicos em relação a machos selvagens. A população selvagem foi eliminada repetidamente entre 10-20 semanas. Estes resultados corroboram a utilização desta técnica em testes de liberação em campo de mosquitos transgênicos, visando sua utilização como componente das estratégias de manejo integrado de insetos (Wise de Valdez et al. 2011).

Assim que o plasmídeo OX-3778 tornou-se disponível para microinjeção em mosquitos *Culex quinquefasciatus*, sua utilização foi priorizada em virtude de uma série de motivos:

- O plasmídeo OX-3778 possui melhores chances de integração ao genoma por possuir sítios de ligação para transposase otimizados.

- Marcador fluorescente *DsRed2* utilizando o promotor *3XP3* de mais fácil visualização, além do promotor de actina.
- Sistema de expressão específico em fêmeas tornando a separação sexual automática.
- Morte apenas na fase adulta aumentando a efetividade do controle.
- Alternativa de liberação de ovos diretamente nos criadouros.

A fase de cruzamentos é crítica para o bom funcionamento e confiabilidade do experimento. Esta fase dita o número de embriões que podem ser microinjetados, uma vez que o espaço disponível e a capacidade do insetário e biotério influem diretamente no número de microinjeções a serem feitas. Cada embrião microinjetado necessita de indivíduos selvagens do sexo oposto para a realização dos cruzamentos, além de repasto sanguíneo. Esta necessidade exige grande infraestrutura e certamente é fator limitante na obtenção de linhagens transgênicas (Wilke 2008).

A criação de linhagens transgênicas de mosquitos é um processo laborioso e demorado e pode ser considerado rotineiro em poucas espécies de mosquitos (Wilke & Marrelli 2012). Mosquitos do gênero *Culex* foram transformados apenas uma vez pelo mesmo grupo de pesquisadores (Allen et al. 2001; Allen & Christensen 2004), apesar dos esforços de diversos laboratórios em alcançar sua transformação. Ainda que a transformação de embriões com o intuito de obter linhagens transgênicas seja essencial para diversos propósitos, seria de grande valia a implementação de novos métodos que possibilitem testar de forma ágil, novas moléculas efetoras e funcionalidades de plasmídeos.

Tomando como base o sucesso de microinjeções de RNAi em mosquitos *Aedes* e *Anopheles* adultos (Blandin et al. 2002, Hansen et al 2004), podendo ser utilizado, por exemplo, como ferramenta para avaliar funções antivirais em infecções de flavivirus em *Aedes aegypti* visando o melhor entendimento da relação entre mosquito e agente infeccioso (Cheng et al. 2011). Estudos da biologia molecular e regulação gênica de *Aedes*

aegypti através de microinjeção em adultos utilizando DNA transcricional *whole body transfection* (WBT), pôde ser utilizado rotineiramente para expressar genes no corpo gorduroso e intestino (Isoe et al. 2007).

Observando que o DNA contido em plasmídeos é transcrito por diversos tecidos de animais (Zhang et al. 2003, Danialou et al. 2005), foi adaptado um método de expressão gênica transiente introduzindo plasmídeos contendo moléculas efetoras diretamente na hemolinfa e tecidos de mosquitos adultos (Wilke et al, em publicação, ANEXO 1). O desenvolvimento de um sistema confiável de microinjeção em mosquitos *Culex quinquefasciatus* é crucial para a implementação de novas tecnologias como: paratransgênese e interações bactéria-mosquito (Kambris et al., 2010), bem como o estudo de promotores e genes refratários e efetores (Ren et al. 2008, Coutinho-Abreu IV et al. 2010, Fang et. al. 2011, Rasgon 2011).

Os resultados mostraram a capacidade de expressão transiente do marcador molecular fluorescente *DsRed2* em mosquitos *Culex quinquefasciatus* adultos, microinjetados diretamente no tórax (Wilke et al. 2012, Anexo 1). A expressão transiente de *DsRed2* demonstra a capacidade de mosquitos *Culex quinquefasciatus* de expressar genes efetores ativados pelo promotor *Hr5IE1*. RNA foi transcrito através do plasmídeo, pelo mosquito, demonstrando sua capacidade de expressar genes efetores e marcadores moleculares exóticos a sua fisiologia, fato até então obscuro.

Transformação baseada em transposons como *piggyBac* resulta em inserções aleatórias no genoma (com o reconhecimento do sítio TTAA) que pode influenciar DNA adjacente, resultando em grandes variações fenotípicas (Nolan et al. 2002). Métodos de transformação sítio-específicos foram desenvolvidos por Nimmo et al. (2006), porém ainda se baseiam inicialmente em transposons. Novos métodos de inserção gênica estão em desenvolvimento e, em particular, um método apresenta grande potencial ao utilizar vias metabólicas de esteróis para inserir transgenes no genoma de mosquitos adultos criando linhagens estáveis e hereditárias (Peng et al.

2011). Esta técnica é especialmente interessante para ser utilizada em mosquitos *Culex quinquefasciatus* nos quais outras abordagens mostram-se difíceis.

Um sistema de expressão transiente para o teste rápido de moléculas efetoras é de importância para o desenvolvimento de linhagens transgênicas com o objetivo de controlar populações de mosquitos vetores, principalmente em espécies de difícil transformação.

5.2 Microssatélites

A melhor compreensão da estrutura genética de populações de mosquitos pode ajudar a antecipar a distribuição de doenças transmitidas por mosquitos vetores e ter papel decisivo em intervenções epidemiológicas. Marcadores microssatélites podem ser utilizados para analisar a estrutura genética de populações selvagens (Edillo et al. 2007). O complexo de espécies *Culex pipiens* foi recentemente analisado utilizando marcadores microssatélites em populações provenientes da América do Norte e Europa. Concluiu-se que estes mosquitos diferem epidemiologicamente e, portanto, devem ser utilizadas formas de controle distintas (Fonseca et al. 2004).

Morais et al. (2010) confirmaram que *Culex quinquefasciatus* estão presentes nas zonas equatoriais, tropicais e subtropicais do território brasileiro. A presença de mosquitos híbridos resultantes do cruzamento de *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens* foi observada em La Plata entre as latitudes 34-35°S.

Resultados utilizando genes mitocondriais (citocromo oxidase 1 (COI) e dehidrogenase subunidade 4 (ND4)), análise morfométrica de asas e de genitálias masculinas, têm mostrado localidades no extremo Sul do Brasil onde *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens* estão em simpatria e há formação de híbridos entre estas espécies. Além disso, mosquitos *Culex quinquefasciatus* do Norte do Brasil diferem geneticamente dos encontrados no Sul (Morais et al. 2010, 2012).

Diversas técnicas têm sido utilizadas tanto na distinção de espécies crípticas como no estudo de variáveis interpopulacionais em insetos vetores de doenças, principalmente mosquitos. Considerando a obtenção de linhagens transgênicas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* carregando gene letal dominante, além da busca de um melhor entendimento e consequente melhoria para ferramentas de controle, estudos de variação genética dessa espécie se tornam cruciais para definir suas variações intraespecíficas e métodos para distinção de espécies pertencentes a esse complexo.

Neste presente estudo, foram selecionados seis pares de *primers* previamente utilizados com sucesso em *Culex pipiens* com potencial hipotético de amplificação em mosquitos *Culex quinquefasciatus*, já que não foram encontrados nas bases de pesquisa disponíveis *primers* específicos para este mosquito. De acordo com Edillo et. al. (2007) e Smith et al. (2005) todos os *primers* utilizados neste experimento foram testados quanto ao desequilíbrio de ligação e posterior correção de Bonferroni, indicando que os *primers* selecionados estão associados aleatoriamente de forma significativa ($P < 0.01$). Estes *primers* foram utilizados em mosquitos *Culex quinquefasciatus* com sucesso, obtendo resultados altamente polimórficos, com uma média de 24 alelos por *locus*.

Foram utilizadas neste estudo 10 populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. O objetivo foi obter amostras de pontos relevantes por todo o território nacional de forma a possibilitar análises amplas e significativas. A escolha das populações foi baseada em sua relevância para o cenário epidemiológico nacional.

Estes mosquitos ocupam habitats urbanos onde existe grande amplitude térmica, diversas pressões seletivas causadas pelo homem e variação nos criadouros disponíveis, o que pode levar a variações temporais de subdivisão e diferenciação populacional (da Costa Ribeiro et al. 2006).

Todas as 10 populações de *Culex quinquefasciatus* foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os 6 *loci* microssatélites. Foi observado em todos os *loci* microssatélites, em todas as populações, a presença de desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. A heterozigosidade observada foi menor do que a esperada em todos os 60 *locus* analisados e em 36 foi estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O déficit de heterozigotos pode ser explicado por uma série de fatores não excludentes, levando-se em conta que o déficit de heterozigosidade foi encontrado em todos os *loci*:

- Subestruturas populacionais (efeito Wahlund).
- Endogamia.
- Pressões seletivas.
- Deriva genética (da Costa Ribeiro et al. 2007).

A população Colônia apresentou o menor polimorfismo entre todas as populações analisadas com uma média de apenas 2,8 alelos por *locus*, sendo que a população Belém apresentou uma média de 11,8 alelos por *locus*, enquanto a média de todas as outras populações foi de 7,1 alelos por *locus*. A média do índice de Fis (coeficiente de endogamia) foi de 0,34, indicando grande endogamia entre as populações. A população Colônia apresentou a maior média de Fis, no valor de 0,52 corroborando informações prévias sobre processos de endogamia e deriva genética. A população PET apresentou o menor valor médio de Fis, 0,16.

Foi utilizado o índice de Fst (heterogeneidade genética) com o intuito de mensurar diferenças entre as populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus* analisadas, a média do índice Fst foi de 0,11 indicando pequena variação genética entre as populações. A população Colônia apresentou o maior valor de diferença genética em relação às outras populações (Fst=0,26) (Tabela 9).

O Dendrograma de distância genética entre todas as populações de *Culex quinquefasciatus* (Figura 15) mostra o agrupamento das populações

em *clusters*: Rio Branco, Belém, Teresina e Pontes e Lacerda, localizadas nas regiões Norte e Centro-Oeste, formaram um *cluster*. É possível observar que, embora estejam distantes geograficamente, as populações Teresina e Pontes e Lacerda apresentam grande proximidade genética, provavelmente devido a mecanismos de deriva genética causados por condições ambientais encontradas por estas populações como, por exemplo, estações distintas de chuva e seca. A população Rio Branco, encontra-se geneticamente mais próxima à população Belém e embora distantes geograficamente, ambas estão localizadas em longitudes similares e inseridas na Amazônia Legal. A população Rio Branco encontra-se mais distante em relação às outras populações do *cluster*.

Um segundo *cluster* se formou com as seguintes populações: Santa Vitória, Chapecó, Rio Pinheiros e PET. A população Santa Vitória encontra-se no extremo sul do Brasil e era esperado que diferenças geográficas e climáticas refletissem em diferenciações gênicas que provavelmente levaram a seu isolamento dentro do *cluster*. As populações Rio Pinheiros e PET, embora geograficamente próximas (dezenas de quilômetros de distância), não foram às populações geneticamente mais semelhantes como esperado. Rio Pinheiros mostrou-se geneticamente mais próximo à população Chapecó localizada na bacia do rio Uruguai, e assim como a população Rio Pinheiros possui abundância de criadouros durante todo o ano. O habitat ocupado pela população PET, um grande parque com diversos animais silvestres, pôde propiciar pressões seletivas e hábitos alimentares distintos explicando este fenômeno.

A população La Plata, ainda que não esteja agrupada com as outras populações, apresenta grande polimorfismo com uma média de 8,3 alelos por *locus*, valor médio de F_{is} de 0,31 e valor médio de F_{st} 0,14 ($p < 0,05$), indicando que diferentemente da população Colônia, apresenta níveis compatíveis de diferenciação genética em comparação com as outras populações analisadas, porém padrões genéticos distintos, devido,

provavelmente, à hibridização entre mosquitos *Culex quinquefasciatus/pipiens*.

A população Colônia possui baixa heterozigosidade por estar há mais de 20 anos sendo mantida em laboratório e, ao longo dos anos, ocorreram reduções populacionais devido a problemas recorrentes de infraestrutura. Reduções e expansões podem levar a processos de deriva genética como gargalo de garrafa e consequente aumento da endogamia (da Costa Ribeiro et al. 2007). O resultado desses eventos pôde ser observado com clareza no dendrograma de distância genética, no qual essa população se encontra isolada.

Após análise Bayesiana de *cluster multi-locus* dos genótipos microssatélites (Figura 16), foi obtido um gráfico representando as 10 populações com 30 indivíduos cada (300 indivíduos), no qual cada mosquito é representado por uma linha vertical indicando por meio de cores a probabilidade de cada indivíduo em pertencer a *clusters* genéticos distintos.

Foi possível observar que as populações Colônia, La Plata e Teresina apresentaram diferenças genéticas significativas em relação às outras populações. A população Teresina, diferentemente da população Colônia mantida em laboratório de forma altamente monomórfica devido à alta endogamia e a população La Plata, composta por mosquitos híbridos, foi a população que apresentou maiores diferenças genéticas e formação clara de *cluster* em relação às outras populações selvagens capturadas em território brasileiro.

Os mosquitos capturados da população Teresina fazem parte de um habitat onde existe seca por diversos meses do ano (inverno), o que talvez explique o fato de um *cluster* ter se formado de forma tão significativa nessa população. A população Rio Pinheiros é a que apresenta maior polimorfismo e não possui nenhum padrão populacional distinto, uma explicação plausível seria a falta de pressão seletiva na busca por criadouros, uma vez que estes mosquitos são capazes de ovipor e sobreviver no rio Pinheiros durante todo

o ano e a abundância de animais onde é possível realizar repasto sanguíneo.

Pôde-se observar a formação moderada de *cluster* nas populações Rio Branco, Santa Vitória, Chapecó e PET, provavelmente devido ao isolamento geográfico dessas populações. A população Rio Branco encontra-se no extremo oeste do país e o trânsito de pessoas é dificultado pela falta de estradas, sendo feito em sua maioria com a utilização de aviões. A formação moderada de *cluster* observada na população PET ocorreu, provavelmente devido a sua condição urbana, porém em um grande parque com diversas opções de repasto sanguíneo e predadores naturais.

A população Santa Vitória foi coletada no extremo sul do país, onde as condições climáticas diferem drasticamente das regiões onde foram capturadas as outras populações, além de se tratar de uma zona urbana reduzida com apenas 30 mil habitantes, fatores que podem ser traduzidos em pressões seletivas e provavelmente contribuir para a formação do *cluster* dessa população. As populações Belém e Pontes e Lacerda não possuem formação de *clusters*, indicando que existe grande polimorfismo e variabilidade entre essas populações.

Foi observada a formação de *Clusters* e padrões genéticos distintos entre as populações analisadas criando um panorama genético de mosquitos *Culex quinquefasciatus* presentes no Brasil. O melhor entendimento populacional desta espécie de mosquito, bem como a variação de seus territórios e características genéticas, pode ajudar a prever sua introdução em novas áreas e fomentar novas estratégias de controle.

6 Conclusões

- Foi desenvolvido um sistema para o teste rápido de moléculas efetoras e funcionalidades de plasmídeos em mosquitos *Culex quinquefasciatus*.
- Foi comprovada a efetividade funcional do plasmídeo OX-3778, além da capacidade da maquinaria celular de mosquitos *Culex quinquefasciatus* em transcrever RNA a partir deste plasmídeo.
- Foi obtida a expressão de *DsRed2* em mosquitos *Culex quinquefasciatus* a partir do plasmídeo OX-3778.
- Todos os *loci* microssatélites foram polimórficos para as populações de *Culex quinquefasciatus* analisadas.
- Mosquitos *Culex quinquefasciatus* apresentaram maior número de alelos em relação à *Culex pipiens* quando analisados com os mesmos *loci* microssatélites.
- Dos 60 *locus* analisados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos apresentaram número inferior de heterozigosidade do que o esperado, sendo que em 36, foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).
- Foram observados grandes níveis de endogamia ($F_{is} = 0,34$) e moderada heterogeneidade genética ($F_{st} = 0,11$) entre as populações de *Culex quinquefasciatus* analisadas - $p < 0,05$.
- O dendrograma de distância genética evidencia o agrupamento das populações em *clusters* definidos para as regiões Norte e Centro-Oeste e Sudeste e Sul, além da segregação das populações La Plata e Colônia.
- A população La Plata, apresenta moderado polimorfismo com uma média de 8,3 alelos por *locus*, valor médio de $F_{is} = 0,31$ e de $F_{st} = 0,11$ ($p < 0,05$), porém não se agrupou com nenhuma população, revelando diferenças genéticas relevantes entre esta população e as coletadas em território nacional.

- A análise Bayesiana de *cluster* multi-*locus*, apresenta a clara formação de *clusters* e diferenças genéticas significativas entre as populações.
- Foi possível vislumbrar um panorama genético de mosquitos *Culex quinquefasciatus* presentes no Brasil.

7 Referências Bibliográficas

- Allen ML, Christensen BM. Flight muscle-specific expression of *act88f*: GFP in transgenic *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera; Culicidae). **Parasitol Int.** 2004; 53:307-14.
- Allen ML, O'Brochta DA, Atkinson PW, Levesque CS. Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** 2001; 38:701-710.
- Alphey L, Nimmo D, O'Connell S, Alphey N. Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease. In: S Aksoy ed. Landes Bioscience, Austin, TX. 2007; 93-103.
- Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochem Mol Biol.** 2002; 32:1243-7.
- Anderson JM, Lai JE, Dotson EM, Córdón-Rosales C, Ponce C, Norris DE, Beard CB. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. **Infect Genet Evol.** 2002; 1:243–248.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Day KP. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol Biol Evol.** 2000; 17:1467-82.
- Arnold ML. Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. **Mol Ecol.** 2004; 13:997–1007.
- Axtell RC, Arends JJ. Ecology and Management of Arthropod Pests of Poultry. **Annu Rev Entomol.** 1990; 35:101-126.
- Bachtrog D, Agis M, Imhof M, Schloetterer C. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs: evidence from *Drosophila melanogaster*. **Mol Biol Evol.** 2000; 17:1277–1285.
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of *DsRed*, a red fluorescent protein from coral. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2000; 97: 11984–11989.
- Barata EAMF, Chiaravalloti Neto F, Dibo MR, Macoris MLG, Barbosa AAC, Natal D, Barata JMS, Andriguetti MTM. Captura de culicídeos em área urbana: avaliação do método das caixas de repouso. **Rev Saude Publica.** 2007; 41:375-82.
- Besansky NJ, Collins FH. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol Today.** 1992; 8:186-192.

- Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the *Defensin* gene. **EMBO Rep.** 2002; 3:852-6.
- Boake CR, Shelly TE, Kaneshiro KY. Sexual selection in relation to pest-management strategies. **Annu Rev Entomol.** 1996; 41:211-29.
- Bushland RC, Lindquist AW, Knipling EF. Eradication of Screw-Worms through Release of Sterilized Males. **Science.** 1955; 122:287-288.
- Cardoso JC, Corseuil E, Barata JMS. Culicinae (Diptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras Entomol.** 2005; 49:275-287.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. **Nature.** 2000; 405:959-62.
- Cheng G, Liu L, Wang P, Zhang Y, Zhao YO, Colpitts TM, Feitosa F, Anderson JF, Fikrig E. An in vivo transfection approach elucidates a role for *Aedes aegypti* thioester-containing proteins in flaviviral infection. **PLoS One.** 2011; 6:e22786.
- Coleman PG, Alphey L. Genetic control of vector populations: an imminent prospect. **Trop Med Int Health.** 2004; 9:433–437.
- Coutinho-Abreu IV, Zhu KY, Ramalho-Ortigao M. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. **Parasitol Int.** 2010; 59:1-8.
- da Costa-Ribeiro MC, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** 2007; 77:303-9.
- da Costa-Ribeiro, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2006;101:917-21.
- Danialou G, Comtois AS, Matecki S, Nalbantoglu J, Karpati G, Gilbert R, Geoffroy P, Gilligan S, Tanguay JF, Petrof BJ. Optimization of regional intraarterial naked DNA-mediated transgene delivery to skeletal muscles in a large animal model. **Mol Ther.** 2005; 11:257–266.
- Delprat MA, Stolar CE, Manso FC, Cladera JL. Genetic stability of sexing strains based on the locus *sw* of *Ceratitis capitata*. **Genetica.** 2002; 116:85–95.
- Dorta DM, Vasuki V, Rajavel A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. **Rev Saude Publica.** 1993; 27:391-397.

- Edillo FE, Tripet F, McAbee RD, Foppa IM, Lanzaro GC, Cornel AJ, Spielman A. A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. **J Med Entomol.** 2007; 44:145-9.
- Estoup, A., M. Solignac, M. Harry, J. M. Cornuet. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Res.** 1993; 21:1427–1431.
- Fang W, Vega-Rodríguez J, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Kang A, St Leger RJ 2011. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. **Science** 331:1074-1077.
- Field D, Wills C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proc Biol Sci.** 1996; 263: 209–215.
- Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. **PLoS Negl Trop Dis.** 2008; 2:210.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi FM, Fleischer RC, Wilkerson RC. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. **Science.** 2004; 303:1535-1538.
- Fonseca DM, Smith JL, Kim HC, Mogi M. Population genetics of the mosquito *Culex pipiens pallens* reveals sex-linked asymmetric introgression by *Culex quinquefasciatus*. **Infect Genet Evol.** 2009; 9:1197-203.
- Fonseca DM, Smith JL, Wilkerson RC, Fleischer RC. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. **Am J Trop Med Hyg.** 2006; 74:284-9.
- Fontes G, Brito AC, Calheiros CML, Antunes CMF, Rocha EMM. Situação Atual da Filariose Bancroftiana na Cidade de Maceió, Estado de Alagoas, Brasil. **Cad. Saúde Públ.** 1994; 10:293-300.
- Forattini OP. Espécies de *Culex* (*Culex*). **Culicidologia Médica.** 2002; 2:693–722.
- Fortini M, Simon M, Rubin G.. Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation. **Nature** 1992; 355:559–561.
- Fu G, Lees RS, Nimmo D, Aw D, Jin L, Gray P, Berendonk TU, White-Cooper H, Scaife S, Kim Phuc H, Marinotti O, Jasinskiene N, James AA, Alphey L. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010; 107:4550-4.
- García BA, Zheng LB, De Rosas ARP, Segura EL. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Mol Ecol Notes** 2004; 4:568–571.

- Goldstein D, Schloetterer C. Microsatellites: evolution and applications. **Oxford University Press**. 1999.
- Gomes AC, Silva NN, Marques GRAM, Brito M. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of São Paulo, Brazil. **J Vector Ecol**. 2003; 28:74-78.
- Grether M, Abrams J, Agapite J, White K, Steller H,. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. **Gene Dev**. 1995; 9:1694–1708.
- Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY. The structure of the chromophore within *DsRed*, a red fluorescent protein from coral. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97:11990–11995.
- Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: Full circle? **Comp Immunol Microb Infect Dis**. 2004; 27:319–30.
- Handler AM. Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. **Genetica**. 2002; 116:137–149.
- Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:10626–10631.
- Harbach RE, Dahl C, White GB *Culex (Culex) pipens* Lin. (Diptera, Culicidae): concepts, type, designation and description. **Entomol. Soc**. 1985; 87:1-24
- Harrison RG. Hybrid zones: windows on evolutionary process. **Oxford Surveys Evolut. Biol**. 1990; 7:69–128.
- Harry M, Poyet G, Romaña CA, Solignac M. Identification and characterization of microsatellite markers in the bloodsucking bug *Rhodnius pallescens* (Heteroptera, Reduviidae). **Mol Ecol** 1998; 7:1784–1786.
- Hedrick W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends Ecol Evol**. 2001; 16:629-636.
- Heinrich JC, Scott MJ. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect suitable for a sterile-relapse program. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97:8229-8232.
- Helinski MEH, Parker AG, Knols BGJ. Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. **Malar J**. 2006; 15:5-41.
- Hendrichs J, Robinson AS, Cayol JP, Enkerlin W. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. **Fla Entomol**. 2002; 85:1-13.

- Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. west Nile Virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. **Am Fam Physician.** 2003; 68:653-660.
- Isoe J, Kunz S, Manhart C, Wells MA, Miesfeld RL. Regulated expression of microinjected DNA in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Mol Biol.** 2007; 16:83-92.
- Ito, J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. **Nature.** 2002; 417:452-455
- Jarne P, Lagoda PJ. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends Ecol Evol.** 1996;11:424-9.
- Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998; 95:3743-7.
- Jasinskiene N, Coleman J, Ashikyan A, Salampessy M, Marinotti O, James AA. Genetic control of malaria parasite transmission: threshold levels for infection in an avian model system. **Am J Trop Med Hyg.** 2007; 76:1072–1078.
- Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MS, Godfray HC, Sinden RE, Sinkins SP 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. **PLoS Patho** 6:e1001143.
- Katti, MV, Ranjekar PK, VS, Gupta VS.. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Mol. Biol. Evol.** 2001; 18:1161–1167.
- Knipling E. Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. **J Econ Entomol.** 1955; 48:459–62.
- Kokoza V, Ahmed A, Wimmer EA, Raikhel AS. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac[3XP3-EGFP afm]. **Insect Biochem Mol Biol.** 2001; 31:1137–1143.
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1998; 95:10774–10778
- Labbé GM, Nimmo DD, Alphey L. *PiggyBac* and PhiC31 mediated genetic transformation of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). **PLoS Negl Trop Dis.** 2010; 4:e788.
- Labbé GM, Scaife S, Morgan SA, Curtis ZH, Alphey L. Female-specific flightless (fsRIDL) phenotype for control of *Aedes albopictus*. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012; 6:e1724.

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. 2001; 409:860-921
- Lobo NF, Hua-Van A, Li X, Nolen BM, Fraser MJ Jr. Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a *piggyBac* vector. **Insect Mol Biol**. 2002; 11:133-9.
- Luna EJA, Pereira LE, Souza RP. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia?. **Epidemiol Serv Saúde**. 2003; 12:7-19.
- Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**. 1999; 60:377-86.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue virus. **Nat Med**. 2004; 10:98–109.
- Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, Malasit P, Limjindaporn T, Finley RL Jr. Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito. **PLoS One**. 2013; 8:e53535.
- Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? **Trends Parasitol**. 2006; 22:197-202.
- McInnis DO, Shelly TE, Komatsu J. Improving male mating competitiveness and survival in the field for medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) SIT programs. **Genetica**. 2002; 116:117-124.
- Meglécz E, Anderson SJ, Bourguet D, Butcher R, Caldas A, Cassel-Lundhagen A, d'Acier AC, Dawson DA, Faure N, Fauvelot C, Franck P, Harper G, Keyghobadi N, Kluetsch C, Muthulakshmi M, Nagaraju J, Patt A, Péténian F, Silvain JF, Wilcock HR. Microsatellite flanking region similarities among different *loci* within insect species. **Insect Mol Biol**. 2007; 16:175-85.
- Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annu Rev Entomol**. 1992; 37:349–76.
- Miller LH, Sakai RK, Romans P, Gwadz RW, Kantoff P, Coon HG. , Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**. 1987; 237:779-81.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am J Trop Med Hyg**. 2000; 62:460-5.

- Morais SA, Almeida Fd, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in *Wolbachia*-Infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2012; 54:325-9.
- Morais SA, Marrelli MT, Natal D. Aspectos da distribuição de *Culex* (*Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. **Rev Bras Entomol**. 2006; 50:413-8.
- Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2010; 105:672-6.
- Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97:10895-8.
- Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Abraham EG, Crisanti A, Nolan T, Catteruccia F, Jacobs-Lorena M. Bee venom phospholipase Inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J Biol Chem**. 2002; 277:40839-40843.
- Myers JH, Savoi A, Randen E. Eradication and pest management. **Annu. Rev. Entomol**. 1998; 43:471–491.
- Natal D, Araújo FAA, Vianna RST, Pereira LE, Ueno HM. O mosquito das águas poluídas. **Saneas**. 2004; 26-31
- Neff, BD, Gross MR. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. **Evolution**. 2001; 55:1717–1733.
- Nicholson GM. Fighting the global pest problem: preface to the special toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. **Toxicon**. 2007; 49:413–22.
- Nimmo D, Alpey L, Meredith J, Eggleston P. High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. **Insect Mol Biol** 2006; 15:129-136.
- Nolan T, Bower TM, Brown AE, Crisanti A, Catteruccia F. *PiggyBac*-mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein *DsRed* as a selectable marker. **J Biol Chem**. 2002; 277:8759-62.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genet Mol Biol**. 2006; 29:294-307
- Pates H, Curtis CF. Mosquito behavior and vector control. **Annu Rev Entomol**. 2005; 50:53–70.
- Peng R, Makloкова VI, Chandrashekhara JH, Lan Q. In vivo functional genomic studies of sterol carrier protein-2 gene in the yellow fever mosquito. **PLoS One**. 2011; 6:e18030

- Phuc HK, Andreassen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, Fu G, Condon KC, Scaife S, Donnelly CA, Coleman PG, White-Cooper H, Alphey L. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.** 2007; 20:5-11.
- Pinkerton AC, Michael K, O'Brochta DA, Atkinson PW. Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. **Insect Mol Biol.** 2000; 9:1-10
- Rasgon, JL. Using infections to fight infections: paratransgenic fungi can block malaria transmission in mosquitoes. **Future Microbiol.** 2011; 6: 851-853.
- Reiter P. Oviposition, dispersal and survival *in Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne Zoonot.** 2007; 7:261–74.
- Ren X, Hoiczyk E, Rasgon JL. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **PloS Pathog.** 2008; 22:4-8.
- Rendón P, McInnis D, Lance D, Stewart J. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. **J Econ Entomol.** 2004; 97:1547-1553.
- Robinson AS. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. **Genetica.** 2002; 116:5–13.
- Rodrigues FG, Oliveira SB, Rocha BC, Moreira LA. Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae) with the *piggyBac* transposable element. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2006; 101:755-7.
- Ross CL, Dyer KA, Erez T, Mille SJ, Jaenike J, Markow TA Rapid Divergence of Microsatellite Abundance Among Species of *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 2003; 20:1143–1157.
- Schug MD, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Lim RH, Hutter CM, Gaudette MS, Aquadro CF. The distribution and frequency of microsatellite *loci* in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Ecol.** 1998; 7:57–70.
- Sharma VP, Patterson RS, Ford HR. A device for the rapid separation of male and female mosquito pupae. **Bull World Health Organ.** 1972; 47:429-432.
- Shearman DC. The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. **Genetica.** 2002; 116:25-43.
- Shieh WJ, Guarner J, Layton M, Fine A, Miller J, Nash D, Campbell GL, Roehrig JT, Gubler DJ, Zaki SR. The role of pathology in an investigation of an outbreak of West Nile encephalitis in New York, 1999. **Emerg Infect Dis.** 2000; 6: 370-372.

- Sia EA, Butler CA, Dominska M, Greenwell P, Fox TD, Petes TD. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97:250-5.
- Sirivanakarn S, White GB. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae). **Proc Entomol Soc Washington**. 1978; 80:360-372.
- SMA - São Paulo. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. Coordenadoria de Planejamento Ambiental. Informações básicas para o planejamento ambiental. **SMA**. 2002.
- Smith JL, Keyghobadi N, Matrone MA, Escher RL, Fonseca DM. Cross-species comparison of microsatellite *loci* in the *Culex pipiens* complex and beyond. **Molecular Ecology Notes**. 2005; 5:697–700
- Su X, Ferdig MT, Huang Y, Huynh CQ, Liu A, You J, Wootton JC, Wellems TE. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Science** 1999; 286:1351–1353.
- Su XZ, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. **Genomics**. 1996; 33:430–444.
- Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana Preservada e suas Implicações Epidemiológicas. **Rev Saude Publica**. 2003; 37:275-9.
- Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey L. Insect Population Control Using a Dominant, Repressible, Lethal genetic Sistem. **Science**. 2000; 287:2474-2476.
- Thoren PA, Paxton RJ, Estoup A. Unusually high frequency of (CT)*n* and (GT)*n* microsatellite *loci* in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). **Insect Mol Biol**. 1995; 4:141–148.
- Tóth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Res**. 2000; 10:967–981.
- Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Malafronte RS, Sallum MA, Marrelli MT. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2011; 106:1-8.
- Volkman SK, Neafsey DE, Schaffner SF, Park DJ, Wirth DF. Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. **Nat Rev Genet**. 2012; 13:315-28.
- Vreysen M, Robinson AS, Hendrichs J. Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. **Springer**. 2007; 325–61.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd

- AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**. 2011; 476:450-3
- Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z, Zhang Y, Liu M, Zheng Z, Zhang H, Zhu X, Wu Z, Zhao T. Identifying the main mosquito species in china based on DNA barcoding. **PLoS One**. 2012; 7:47051.
- WHO-TDR. Planning meetings on Progress and Prospects for the Use of Genetically Modified Mosquitoes to Prevent Disease Transmission: Meeting 1. **Technical Consultations on the Current Status and Planning for Future Development**. 2009.
- WHO-TDR. Scientific Working Group Report on Dengue. 2006.
- Wilke AB, Gomes A de C, Natal D, Marrelli MT. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. **Rev Saude Publica**. 2009a; 43:869-74.
- Wilke AB, Marrelli MT. Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2012; 54:287-92.
- Wilke AB, Nimmo DD, St John O, Kojin BB, Capurro ML, Marrelli MT. Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. **As Pac J Mol Biol Biotechnol**. 2009b; 17:65-74
- Wilke AB. Controle genético de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia para a obtenção do grau de Mestre. São Paulo; s.n, 2008; 110 p
- Wise de Valdez MR, Nimmo D, Betz J, Gong HF, James AA, Alphey L, Black WC 4th. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011; 108:4772-5.
- Wright S. Evolution and genetics of populations. **Chicago: University of Chicago Press**. 1978; 511 p.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol Eco**. 2002; 11:1-16.
- Zhang Y, Schlachetzki F, Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Organ-specific gene expression in the rhesus monkey eye following intravenous non-viral gene transfer. **Mol Vis**. 2003; 9:465–472.
- Zucoloto RB, Villela PMS, Verdade LM, Coutinho LL Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman* spp and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**. 2006; 29:75-78.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1

DsRed Transient expression in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes

André Barretto Bruno Wilke¹, Sarah Scaife², Luke Alphey^{2,3}, Mauro Toledo Marrelli¹

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil ²Oxitec Ltd, Oxford, Oxford, United Kingdom

³Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, Oxford, United Kingdom

Summary

Culex quinquefasciatus mosquitoes have been successfully genetically modified only once, despite the efforts of several laboratories to transform and establish a stable strain. We have developed a transient gene expression method, in *Culex*, that delivers plasmid DNA directly to the mosquito hemolymph and additional tissues. We were able to express *DsRed2* fluorescent protein in adult *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by injecting plasmids directly into their thorax. The expression of *DsRed2* in adult *Culex quinquefasciatus* mosquitoes is an important stepping stone to genetic transformation and the potential use of new control strategies and genetic interactions.

Key Words: *Culex quinquefasciatus*, Transient Expression, *DsRed2*

Financial support: FAPESP 2005/50225-2 and 2008/57468-6

Mosquitoes are responsible for the transmission of major human disease agents (Moreira et al. 2000, Cheng et al. 2011). *Anopheles*, *Culex*, and *Aedes* genera include vectors for the three major groups of human pathogens: parasites of the *Plasmodium* genus, which cause malaria, filarids of the *Wuchereria* and *Brugia* genera, which cause filariasis and a variety of arboviruses, including dengue, yellow fever and West Nile (Atkinson & Michel 2002, Wilke et al. 2009a).

Given the failure of current methods to control the spread of many of these diseases, alternative methods of control are desperately needed, so considerable effort has gone into novel genetic mosquito control strategies (Atkinson et al. 2007). Substantial progress has been made over the last decade towards generating transgenic mosquitoes (Wilke et al. 2009b).

Two broad classes of genetic control strategies have been proposed. ‘Population suppression’ strategies aim to reduce the number of vector mosquitoes in the target area. ‘Population replacement’ strategies aim to make the vector population less effective at transmitting relevant pathogens, without necessarily reducing the number of mosquitoes. Population suppression strategies require the expression of effector molecules that reduce the fitness (e.g. viability, fertility) of affected mosquitoes. Population replacement requires the expression of effector molecules that affect the ability of the mosquito to transmit the pathogen (‘refractoriness genes’); additionally ‘gene drive’ systems may be required to spread such genes through the target population. In each case, there is a need to identify specific DNA sequences which will impart the necessary phenotype when present in the mosquito genome. The traditional way to test candidate effector sequences is by constructing stable transgenic lines in which the candidate sequence is inserted into the mosquito genome. However, germline transformation is a time-consuming process, and routine in only a few mosquito species. In particular, there has been only two reports of transformation of *Culex* mosquito by a same group (Allen et al. 2001, Allen & Christensen 2004), despite the efforts of several laboratories.

While germline transformation is likely to remain essential for many purposes, it would be highly desirable to have a faster method for initial screening of candidate effector molecules and plasmid functionalities. Based on the success of

adult RNAi microinjection in *Aedes* and *Anopheles* mosquito species (Blandin et al. 2002, Hansen et al 2004), and the observation that plasmid DNA is transcribed in various mammalian tissues following injection of purified DNA (Zhang et al. 2003, Danialou et al. 2005), we have developed a mosquito transient gene expression method, based on the delivery of plasmid DNA directly to the mosquito hemolymph and additional tissues.

The development of a well-established adult microinjection system in *Culex* mosquitoes is crucial to the implementation of new technologies such as: paratransgenesis and interactions between bacteria and mosquito (Kambris et al., 2010); as well as the study of gene promoters and refractory genes (Ren et al. 2008, Coutinho-Abreu IV et al. 2010, Fang et al. 2011, Rasgon 2011). We were able to express *DsRed2* fluorescent molecular marker in adult *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by micro-injecting plasmids directly into the thorax.

To be able to test if the target mosquito is capable of expressing the gene of interest, in such a way, is highly advantageous since it is a very arduous process to transform and maintain transgenic mosquito strains. *Culex quinquefasciatus* mosquitoes were injected in the thorax with a *DsRed2* marker comprising *DsRed2* coding sequence under the control of a baculovirus promoter (Hr5IE1) which has previously been shown to give visible ubiquitous red fluorescence in transgenic *Aedes aegypti* (Dafa'alla et al. 2006). This marker gene was flanked by the ends of a *piggyBac* element potentially suitable for germline transformation. Newly born female mosquitoes were divided into groups of fifty mosquitoes each and injected in the thorax with plasmid injection mix (N=200) or PBS (Phosphate buffered saline) for the control group (N=50). After injection mosquitoes were fed on sugar and after 3 to 5 days screened for red fluorescence under a microscope. Mosquitoes that survived after the thorax injection (60-80%) were screened by fluorescence microscopy and fluorescence was observed in 2% of the injected mosquitoes (Figure 1-A). To test that this fluorescence did correspond to *DsRed2* and not autofluorescence, oligonucleotides were designed to amplify a 675 bp *DsRed2* fragment (*DsRed2*-for: 5'atggcctctccgagaacgt 3'; *DsRed2*-rev: 5'caggaacaggtggcggc 3'). The PCR amplification showed a product of the

expected size indicating the presence of *DsRed2* sequences (Figure 1-B). To confirm that *DsRed2* mRNA was being expressed, we performed RT-PCR using the same primers (Figure 1-C).

Several mosquito species have been successfully transformed and maintained as transgenic strains, such as: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes fluviatilis*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* (Miller et al. 1987, Jasinskiene et al. 1998, Catterucia et al. 2000, Rodrigues et al. 2006, Labbé et al. 2010). However, *Culex* mosquitoes are especially difficult to transform by the conventional method of injecting eggs and manipulating embryos because females lay their eggs in “rafts” so one is required to split the raft into individual eggs to perform microinjection and it is not possible to re-assemble them afterwards. This is not a problem for *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes, which have been more easily genetically modified, as these mosquitoes lay their eggs individually and in some cases *Aedes* eggs can resist desiccation for several months in a state of diapause, so it is possible for the egg to heal before embryogenesis starts. *Culex* mosquitoes’ embryogenesis cannot be delayed, so these two factors represent major limitations in *Culex* survival rate and transformation success.

The transient expression of *Dsred2* in *Culex quinquefasciatus* described here, demonstrates the mosquito’s capability of expressing an effector gene driven by Hr5IE1 baculovirus promoter. The fact that RNA was transcribed from this plasmid, by the mosquito, demonstrates its capacity to express foreign effector genes and molecular markers. *PiggyBac* transformation results in fairly random insertion of the transgene into the genome (with a recognition sequence of TTAA), so that expression can be heavily influenced by the surrounding DNA, resulting in a range of phenotypes (Nolan et al. 2002). Site-specific integration methods have recently been developed (Nimmo et al. 2006), but they still require an initial transposon based transformation. An innovative gene insertion method involving insertion of transgenes into the genome of adult mosquitoes via sterol carriers offers new prospects for transformation (Peng et al. 2011). This technique is especially interesting for mosquitoes such as *Culex quinquefasciatus*, where other approaches have proved difficult. A transient expression system for rapid testing of candidate

effector molecules would facilitate the development of genetic control strains in vector species, especially those where germline transformation is difficult.

Figure 1: (A) Fluorescence micrograph showing transient expression of *DsRed2* molecular marker in a *Culex quinquefasciatus* mosquito injected with a *DsRed2* plasmid (I) and a control group mosquito (C); (B) Ethidium bromide stained 1% agarose gel, showing the amplification of the *DsRed2* gene by polymerase chain reaction. DNA marker New England Biolabs (100 bp) (M), no template control (N), gDNA from *DsRed2* expressing individual (I) *piggyBac Hr5IE1-DsRed2* plasmid (675 bp) (P); (C) RT-PCR of *Culex quinquefasciatus* injected mosquito (I) utilizing specific *DsRed2* primers confirming the presence of cDNA M, marker as above, N no template control.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Meg Allen by suggestion on *Culex quinquefasciatus* embryo microinjections, and André Luís da Costa da Silva for helping us during the adult microinjections. ABBW is fellow of FAPESP.

REFERENCES

- Allen ML, O'Brochta DA, Atkinson PW, Levesque CS 2001. Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 38: 701-710.
- Allen ML, Christensen BM 2004. Flight muscle-specific expression of act88F: GFP in transgenic *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol Int* 53: 307-314.
- Atkinson PW, Michel K 2002. What's buzzing? Mosquito genomics and transgenic mosquitoes. *Genesis* 32: 42-48.

- Atkinson MP, Su Z, Alphey N, Alphey LS, Coleman PG, Wein LM 2007. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. *Proc Natl Acad Sci* 104: 9540–9545.
- Blandin S, Moita LF, Kocher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA 2002. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* 3: 852–856.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405: 959–962.
- Cheng G, Liu L, Wang P, Zhang Y, Zhao YO, Colpitts TM, Feitosa F, Anderson JF, Fikrig E 2011. An in vivo transfection approach elucidates a role for *Aedes aegypti* thioester-containing proteins in flaviviral infection. *PLoS One* 6:22786.
- Coutinho-Abreu IV, Zhu KY, Ramalho-Ortigao M 2010. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. *Parasitol Int* 59: 1–8.
- Dafa'alla TH, Condon GC, Condon KC, Phillips CE, Morrison NI, Jin L, Epton MJ, Fu G, Alphey L 2006 Transposon-free insertions for insect genetic engineering. *Nat Biotechnol* 24:820–821
- Danialou G, Comtois AS, Matecki S, Nalbantoglu J, Karpati G, Gilbert R, Geoffroy P, Gilligan S, Tanguay JF, Petrof BJ 2005. Optimization of regional intraarterial naked DNA-mediated transgene delivery to skeletal muscles in a large animal model. *Mol Ther* 11: 257–266.
- Fang W, Vega-Rodríguez J, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Kang A, St Leger RJ 2011. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science* 331: 1074–1077.
- Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10626–10631.
- Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH. 1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 3743–3747.
- Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MS, Godfray HC, Sinden RE, Sinkins SP 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Patho* 7: 6–10.
- Labbé GM, Nimmo DD, Alphey L 2010. PiggyBac and PhiC31 mediated genetic transformation of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *PLoS Negl Trop Dis* 17: 4–8.
- Miller LH, Sakai RK, Romans P, Gwadz RW, Kantoff P, Coon HG 1987. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 237: 779–781.

- Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M 2000. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10895-10898.
- Nimmo D, Alphey L, Meredith J, Eggleston P 2006. High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. *Insect Mol Biol* 15: 129-136.
- Nolan T, Bower TM, Brown AE, Crisanti A, Catteruccia F 2002. *PiggyBac*-mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein *DsRed2* as a selectable marker. *J Biol Chem* 277:8759-62.
- Peng R, Makloкова VI, Chandrashekhara JH, Lan Q 2011. In vivo functional genomic studies of sterol carrier protein-2 gene in the yellow fever mosquito. *PLoS One* 6: 18030.
- Rasgon, JL 2011. Using infections to fight infections: paratransgenic fungi can block malaria transmission in mosquitoes. *Future Microbiol* 6: 851-853.
- Ren X, Hoiczky E, Rasgon JL 2008. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PloS Pathog* 22: 4-8.
- Rodrigues FG, Oliveira SB, Rocha BC, Moreira LA 2006. Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae) with the *piggyBac* transposable element. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 755-757.
- Wilke ABB, Nimmo DD, St John O, Kojin BB, Capurro ML, Marrelli MT 2009a. Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 17: 65-74.
- Wilke ABB, Gomes AC, Natal D, Marrelli MT 2009b. Control of Vector Populations Using Genetically Modified Mosquitoes. *Rev Saude Publica* 43: 869-874.
- Zhang Y, Schlachetzki F, Li JY, Boado RJ, Pardridge WM 2003. Organ-specific gene expression in the rhesus monkey eye following intravenous non-viral gene transfer. *Mol Vis* 9: 465-472.

8.2 Anexo 2