Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Controle Genético de mosquitos

Culex quinquefasciatus

André Barretto Bruno Wilke

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública para a
obtenção do título de Mestre
em Saúde Pública

Área de concentração:
Epidemiologia

ORIENTADOR: PROF
MAURO TOLEDO MARRELLI

São Paulo

-2008-

Controle Genético de mosquitos

Culex quinquefasciatus

André Barretto Bruno Wilke

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública para a
obtenção do título de Mestre
em Saúde Pública

Área de concentração:
Epidemiologia

ORIENTADOR: PROF
MAURO TOLEDO MARRELLI

São Paulo

-2008-

Esta estrutura [dupla hélice] tem características que são de considerável interesse biológico. Não pudemos deixar de perceber que o emparelhamento específico que postulamos imediatamente sugere um possível mecanismo para a cópia do material genético.

Molecular Structure of Nucleic Acids, in nature [April 25, 1953]
James Dewey Watson & Francis Harry Compton Crick

Agradecimentos

Agradeço a meus pais Reynaldo e Regina e minha irmã Helena, por todo o apoio e compreensão durante o período do desenvolvimento de meu mestrado.

A minha namorada Betina por seu apoio e por muitas tardes de sábado e domingo em que me acompanhou até a USP.

A toda minha família e amigos que sempre me motivaram.

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.

Ao Dr. Almério de Castro Gomes e ao Dr. Delsio Natal eu agradeço pela pronta disposição em ajudar nas horas difíceis demonstrando profundo companheirismo e amizade.

A Dra. Margareth de Lara-Capurro eu agradeço por abrir as portas de seu laboratório e agir sempre com profundo profissionalismo. Agradeço também a Bianca Burini que em todos os momentos difíceis me ajudou sem nunca pedir nada em troca e certamente possui um papel importante no desenvolvimento desta dissertação. A todos os outros estudantes do laboratório, André, Céres, Talita, entre tantos outros com que não tive muito tempo de convívio, demonstro minha sincera gratidão e os considero amigos.

A todos os amigos e pessoas que me ajudaram, mas que não foram citadas porém, tiveram uma participação vital no desenvolvimento do projeto.

A FAPESP pelo financiamento desse projeto (Bolsa de Mestrado 06/52738-0, Projeto Jovem Pesquisador 05/50225-2).

Índice

1 Introdução	3
1.1 Degradação do Ambiente e os Mosquitos <i>Culex</i>	5
1.2 Histórico das Intervenções nos rios Tietê e Pinheiros	7
1.3 O mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	8
1.4 Importância Médica dos Mosquitos do Gênero <i>Culex</i>	13
1.5 Controle de Mosquitos	16
1.5.1 Controle Químico	17
1.5.2 Controle Biológico	19
1.6 Resistência	20
1.7 A Técnica do Inseto Estéril (SIT)	21
1.7.1 Sexismo Genético para uso na SIT	24
1.8 Controle Genético de Insetos: supressão e substituição da população	27
1.8.1 Patógenos	28
1.8.2 Elementos de Transposição (transposons)	29
1.8.3 Marcadores para a Seleção de Transformação	32
1.9 O melhoramento da Técnica SIT – O Sistema RIDL	35
1.10 O Sistema RIDL: potenciais melhorias para o SIT usando engenharia genética	37
 2 Objetivos	 42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
 3 Material e Método	 43
3.1 Colônia de Mosquitos	43
3.2 Animais	43
3.3 Construções Utilizadas	44
3.4 Transformação e Clonagem	48
3.4.1 Meio de Cultura	48

3.4.2 Preparo de Células Eletro-Competentes	48
3.4.3 Purificação dos Plasmídeos	59
3.5 Microinjeção: procedimentos	51
3.5.1 Solução de Injeção	51
3.5.2 Preparação dos Capilares	52
3.5.3 Padronização da disposição dos ovos	53
3.5.4 Microinjeções em Embriões de <i>Culex quinquefasciatus</i>	53
3.6 Procedimentos após as Microinjeções: tentativa de se obter uma linhagem transgênica	54
3.7 Amplificação do gene Marcador DsRed2	55
4 Resultados e Discussão	57
4.1 Padronização da Manipulação dos Ovos	62
4.2 Microinjeções	66
4.2.1 Microinjeções com a Construção LA882	66
4.2.2 Microinjeções com a Construção LA513	68
4.2.3 Microinjeções com a Construção LA3653	69
4.3 Reação de Amplificação do Marcador DsRed2	71
4.4 Conclusões	72
4.5 Considerações Finais	73
5 Referências Bibliográficas	76

Anexos

Resumo

Wilke ABB **Controle Genético de mosquitos *Culex quinquefasciatus***. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

O mosquito *Culex quinquefasciatus* é considerado praga urbana e tem a capacidade de se desenvolver em águas altamente poluídas atingindo elevada densidade. Mosquitos desta espécie possuem importância vetorial na transmissão de parasitas e arboviroses. Medidas de controle químico têm se mostrado ineficazes, além de serem altamente prejudiciais ao meio ambiente. Desse modo, novas tecnologias de controle foram desenvolvidas, entre elas o SIT (Sterile Insect Technique) que utiliza radiação para esterilizar machos e liberá-los no ambiente para copular com fêmeas selvagens. Posteriormente métodos genéticos baseados nessa técnica têm sido propostos. O sistema RIDL (Liberação de Insetos Carregando Gene Letal Dominante), consiste na integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico de fêmea, dispensando a etapa de esterilização por radiação. Nesse processo os insetos recebem dieta suplementada com um repressor químico. A expressão do gene letal dominante é mantida desligada enquanto este repressor é adicionado ao meio das larvas. Para as amostras que estariam sendo preparadas para liberação, o repressor é retirado, e o gene letal dominante é ativado, causando a morte de todas as fêmeas, restando apenas machos para liberação. Os machos homozigotos para o gene letal seriam liberados para copular com fêmeas selvagens. A progênie seria heterozigota para o gene letal, porém somente os machos sobreviveriam. Parte crucial para o sucesso deste projeto foi a adaptação do método de microinjeção de embriões para a espécie *Culex quinquefasciatus* tornando possível a injeção dos transgenes LA513, LA882 e LA3653 com o objetivo de obtermos linhagens transgênicas. A obtenção de linhagens transgênicas com estas construções se mostraram mais laboriosa do que o previsto, dificultando a transgenia. Porém, as aplicações práticas em controle de vetores utilizando a técnica do RIDL são imensas e pode se tornar uma importante ferramenta do Manejo Integrado de vetores.

Descritores: Transgênicos, *Culex quinquefasciatus*, RIDL, Controle

Abstract

Wilke ABB **Genetic control of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes.** São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP]

The *Culex quinquefasciatus* mosquitoes are considered urban plague and are able to grown in polluted water achieving high density. This specie are important vectors in the transmission of parasites and arbovirus. Chemical control methods shown to be ineffective and highly hazards to the environment. In this way, new technologies of control have been developed, among them there is SIT (Sterile Insect Technique) that utilizes radiation to sterilize males and then release in the environment to mate with wild females. New genetic methods are been proposed based on the SIT technique, they relies on the integration of a dominant lethal gene associated to a specific promoter of female avoiding the need for radiation (RIDL). In this process the insects receive diet supplemented with a chemical repressor (tetracycline). The expression of the dominant lethal gene is kept off while this repressor is added to the larvae. For the samples that would be being prepared for release, the repressor is removed, and the dominant lethal gene is activated, causing the death of all the females, and consequently only leaving male for release. The homozygous males for the lethal gene would be set free to mate with the wild females. The lineages would be heterozygous for the lethal gene and only males would survive. Since that, the capacity of mating of the transgenic males produced by method RDIL is an important prerequisite for the success of the program. It was crucial to achieve the objectives of this project adapt the microinjection method to *Culex quinquefasciatus*, so it became possible inject the LA513, LA882 and LA3653 plasmids seeking for the transgenic transformation. The obtaining of the transgenic mosquito *Culex quinquefasciatus* seems to be more difficult then expected and its development was harmed. The practical applications using RIDL in vector control is huge and can become a useful tool in the Integrated Management of vectors.

Keywords: Transgenics, *Culex quinquefasciatus*, RIDL, Control

1 Introdução

Os insetos são animais com alta diversidade, apresentando vários grupos com valor comercial e de importância médica. A classe Insecta apresenta mais de um milhão de espécies descritas e organizadas em aproximadamente 800 famílias que compreendem 32 ordens (Behura 2006). Dentre estes, alguns grupos, denominados hematófagos, são adaptados para se alimentarem de sangue de vertebrados. Este fato causa danos ao hospedeiro vertebrado, como feridas e baixa na resistência imunológica. Entretanto, o principal problema advindo da hematofagia dos insetos é a sua capacidade de transmitir patógenos para o homem e outros vertebrados.

Estes organismos são transmissores de uma variedade de patógenos, entre eles vírus, bactérias, protozoários e vermes. O papel dos insetos, e outros invertebrados, como transmissores de agentes causadores de doenças para os vertebrados foi comprovado cientificamente no final do século XIX. A descoberta foi feita pelo médico escocês, Patrick Manson, em 1877 (reportada em 1878), que descobriu que vermes causadores da filariose (*Wuchereria bancrofti*) se desenvolviam no interior de mosquitos (*Culex pipiens quinquefasciatus*). Deste momento em diante, o papel de outros invertebrados como transmissores de patógenos causadores de doenças foi comprovado, como a malária transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* (1887); a febre do gado “texana” transmitida por carrapatos (1893); a “nagana” transmitida por moscas tsetse (1895); a peste bubônica transmitida por pulgas de ratos (1898), a febre amarela transmitida por mosquitos (1901), a doença do sono transmitida por moscas tsetse (1903) e a doença de Chagas transmitida por triatomíneos (1909) (Sanjad 2003).

No começo do século XX, medidas de controle de vetores com o intuito de diminuir a transmissão de patógenos foram iniciadas. No Brasil, a partir de janeiro de 1901, as comissões sanitárias que atuavam no Estado de São Paulo, já incorporaram em sua rotina a supressão das águas estagnadas com larvas de mosquitos. Em Sorocaba (1901) e São

Simão (1902) (Estado de São Paulo), o combate aos mosquitos integrou o repertório híbrido de ações destinadas a anular tanto o contágio como a infecção da febre amarela (Benchimol 2003).

No Rio de Janeiro, início do século XX, o sanitarista Dr. Oswaldo Cruz estruturou a primeira grande campanha no combate a um vetor. A campanha contra a febre amarela, que foi realizada em moldes militares, dividiu a cidade em 10 distritos sanitários, cada qual chefiado por um delegado de Saúde. Seu primeiro passo foi extinguir a dualidade na direção dos serviços de Higiene (Sanjad 2003).

Naquela época, a polícia sanitária estabelecia medidas rigorosas para o combate ao mal amarílico, inclusive multando e intimando proprietários de imóveis insalubres a demoli-los ou reformá-los. As chamadas brigadas “mata-mosquitos” percorriam a cidade, limpando calhas e telhados, exigindo providências para proteção de caixas d’água, colocando petróleo em ralos e bueiros e acabando com depósitos de larvas e mosquitos (Benchimol 2003). Nas áreas de foco, expurgavam as casas, pela queima de enxofre e piretróides e providenciavam o isolamento domiciliar dos doentes ou sua remoção para o Hospital São Sebastião.

O Dr. Oswaldo Cruz baseou o combate à febre amarela no êxito da campanha realizada pelos americanos em Havana e em algumas experiências realizadas no Brasil, que comprovavam o acerto da teoria do médico cubano Dr. Carlos Finlay de que o transmissor da doença era um mosquito: o *Aedes aegypti*, na época denominado *Stegomyia fasciata* ou *Culex aegypti* (Ministério da Saúde 2003).

Desde então as estratégias de combate a vetores sofreram grandes avanços com a introdução de inseticidas e posteriormente com o desenvolvimento da técnica de liberação de insetos estéreis (Handler 2002).

No final do século XX e início do XXI, com o desenvolvimento da genética, foram desenvolvidas técnicas que passaram a modificar o vetor geneticamente, divididas em estratégias de substituição ou

supressão de uma população alvo. A possível liberação de insetos geneticamente modificados para supressão de populações de mosquitos (RIDL) apresenta grande potencial e se mostrou, até agora, como a mais promissora das técnicas baseadas em transgenia para controle de vetores (Alphey 2002).

Diante do exposto acima, justificam-se as preocupações com os insetos, principalmente com os mosquitos de interesse médico e epidemiológico. Desse modo, será revisado o que é conhecido sobre a técnica de modificação genética para controle de insetos por supressão de população, denominada por Thomas et al. (2000) e Heinrich & Scott (2000) de RIDL (Releasing of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene), ou seja, liberação de insetos carregando um gene letal dominante.

Também será abordado aqui aspectos relacionados aos mosquitos do gênero *Culex*, com destaque ao *Culex quinquefasciatus*, a espécie mais importante do gênero no Brasil, sua importância epidemiológica e as modificações no ambiente que levam à alta infestação desses mosquitos. Tentativas de obtenção de linhagens transgênicas dessa espécie de mosquito baseadas no RIDL está em andamento. Os avanços na padronização das micro-injeções e os tipos de construções transgênicas utilizadas também são discutidos nessa dissertação.

1.1 Degradação do Ambiente e os Mosquitos *Culex*

O Brasil, semelhantemente a numerosos países em desenvolvimento, vem sofrendo acentuado processo de urbanização, porém, sem o respectivo progresso dos serviços de saneamento básico. Dessa maneira, observa-se aumento da liberação de efluentes no meio ambiente sem tratamento adequado. Ao mesmo tempo em que as indústrias se expandem para atender às necessidades crescentes de consumo, aumentam-se as cargas dos mais variados contaminantes lançados no ambiente. Neste contexto, são os rios os receptores dos mais

diversos detritos produzidos pela sociedade. Nessas condições, o mosquito *Culex quinquefasciatus*, cujos estádios imaturos são dependentes de águas poluídas, encontra condições adequadas ao pleno desenvolvimento (Taípe-Lagos & Natal 2003).

Na cidade de São Paulo, o rio Pinheiros e o rio Tietê compõem cenários típicos onde se somam condições favoráveis para a explosão populacional desse culicídeo. Esse problema vem afetando o bem-estar dos indivíduos que habitam ou trabalham nas proximidades do rio. Se até o presente as reclamações concentravam-se no incômodo provocado pela picada do mosquito, para o futuro, prevê-se a elevação do risco de introdução de vírus exóticos, com potencial de gerar processo epidêmico, como no caso do vírus da encefalite do Nilo Ocidental. Alerta-se para a reprodutividade desse quadro epidemiológico na maioria das cidades brasileiras (Morais et al. 2006).

Nas dimensões da infestação em que o rio Pinheiros se encontra, as estratégias químicas, biológicas e de manejo ambiental não têm sido eficazes no combate a esse culicídeo. Estima-se uma população de dois milhões de habitantes que são incomodados pelas picadas desse hematófago, nas proximidades do Rio Pinheiros, na extensão de seus 25 km, que corta a cidade de São Paulo. A contínua manutenção de densidades elevadas desse mosquito é condição potencial para o risco de introdução do vírus da febre do Nilo Ocidental, podendo resultar em epidemia de elevada proporção (Natal et al. 2004).

Atualmente, o rio Pinheiros recebe efluentes de 290 indústrias e dejetos de 400 mil famílias. Obras governamentais continuam a prometer a despoluição do rio e a volta de alguns tipos de peixes e plantas em suas águas (São Paulo 450 anos). Segundo o Boletim Técnico da Secretaria do Meio Ambiente, do Estado de São Paulo (SMA 2002), as águas do rio Pinheiros possuem níveis elevados de temperatura e sais minerais, como resultado da decomposição da matéria orgânica e industrial, constantemente despejada no seu leito.

Como consequência, os dados de qualidade da água do rio apontam ausência de oxigênio Dissolvido, o que as caracterizam como sendo anóxicas. A estagnação das águas do rio Pinheiros o torna ainda mais poluído e seu leito mais raso.

O soterramento contínuo do lixo e a disposição permanente dos esgotos resultam no despojamento do solo e de seus elementos nutritivos, que acompanhado da fertilização excessiva causada pela decomposição de matéria orgânica, resultam na eutrofização e posteriormente no envenenamento do solo do ar e da água (Murgel & Branco 1990).

1.2 Histórico das Intervenções nos rios Tietê e Pinheiros

A cidade de São Paulo foi fundada na elevação existente entre os rios Tietê e Tamanduateí e expandiu-se inicialmente por terrenos mais altos e secos, pois as várzeas, sujeitas a constantes inundações, eram então consideradas áreas de segunda categoria. Estas áreas serviam como acessos aos importantes cursos d'água que eram vias de transporte na época e foram palco de intensa atividade minerária (SMA 2002).

Segundo a Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (2002), a demanda por eletricidade acarretou as primeiras intervenções importantes nos rios. Em 1901 foi construída a primeira usina hidrelétrica no rio Tietê, em Santana do Parnaíba. As características originais dos rios Tietê e Pinheiros passaram, então, a ser profundamente alteradas, restando hoje em dia poucos resquícios da situação original.

As intervenções na bacia do rio Pinheiros começaram no início do século passado com a construção da Represa do Guarapiranga, visando aumentar a capacidade de geração de energia (SMA 2002). A retificação e a canalização do rio Pinheiros foram iniciadas em 1928 e estenderam-se até os anos 50. Entre as várias intervenções no rio e em suas várzeas, além da construção do canal e eliminação dos seus meandros, vale destacar a reversão de suas águas, direcionadas rio

acima pelas estações elevatórias de Traição e Pedreira, indo desaguar no reservatório Billings, dando impulso à geração de energia na Usina Henry Borden e à expansão industrial em Cubatão (SMA 2002).

As intervenções no rio Tietê objetivaram solucionar questões sanitárias e o problema das inundações, quando as várzeas foram sendo tomadas por moradias. Sua retificação foi um importante estímulo para o estabelecimento de novos bairros e o que se verificou, simultaneamente, foi o agravamento dos problemas que se pretendia resolver (SMA 2002).

1.3 O Mosquito *Culex quinquefasciatus*

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) têm sido intensamente estudados desde o final do século XIX quando foram pela primeira vez relacionados com a transmissão de patógenos ao homem e outros vertebrados. Os gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* incluem os vetores dos três grupos principais de patógenos humanos: os parasitas causadores das malárias do gênero *Plasmodium*, filárias dos gêneros *Wuchereria* e *Brugia* e numerosos arbovírus (Taípe-Lagos & Natal 2003).

O gênero *Culex* foi criado por Linnaeus em 1758, vulgarmente chamado de mosquitos, apresenta a maior variedade de espécies entre os culicídeos, abrangendo uma grande variedade de nichos, dos criadouros naturais, como bromélias, aos artificiais, como pneus e vasos de plantas (Laporta et al. 2006).

Existem mais de 300 espécies de *Culex* descritas, das quais algumas apresentam capacidade vetora e, portanto, tem interesse médico. Entre eles encontra-se o *Culex quinquefasciatus*, que apresenta um grande desafio para saúde pública devido a sua grande dispersão pelo território nacional e capacidade vetora para arboviroses e filarioses (Taípe-Lagos & Natal 2003).

Thomas Say (1823) estudou a taxonomia do gênero *Culex* e descreveu o *Culex quinquefasciatus* usando como referência as cinco faixas amplas e escuras presentes nos tergitos abdominais do mosquito o

que o caracteriza com o nome de *Culex 5-fasciatus* (Sirivanakarn & White 1978).

O *Culex quinquefasciatus* desenvolve-se por meio de ciclo completo o que implica quatro etapas que contemplam formas distintas. Nas fases de ovo, larva e pupa vivem na água (Figura 1), geralmente estagnada, enquanto na fase adulta exploram os ambientes terrestres e aéreos (Taípe-Lagos & Natal 2003).

Figura 1: Larvas de mosquitos do Gênero *Culex*.
Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Culex_sp_larvae.png

Os ovos são colocados aglutinados formando um conjunto em forma de jangada. A oviposição ocorre diretamente na superfície da água, completando seu desenvolvimento durante a fase de ovo e somente quando o embrião estiver totalmente desenvolvido é que se dá a eclosão. Esse processo corresponde, portanto à saída de dentro do ovo da larva de primeiro estágio (Cardoso et al. 2005)

As larvas se desenvolvem em quatro estádios. A larva de primeiro estágio mede em comprimento aproximadamente 1,5mm e a de quarto estágio chega a atingir 10mm. As larvas apresentam corpo dividido em três partes: cabeça, tórax e abdome.

A fase de pupa corresponde ao período de transição entre a larva de quarto estágio e o mosquito adulto. A pupa tem o corpo dividido em cefalotórax e abdome; não se alimentam e respiram por um par de sífões existente no dorso da área correspondente à parte torácica do cefalotórax. Nessa fase o mosquito sofre mudanças morfológicas e fisiológicas profundas ao utilizar a matéria e a energia acumulada durante a fase larvária, corresponde a um período de intensa atividade bioquímica (Forattini 2002).

Uma única oviposição de *Culex* pode resultar em mais de 200 ovos. Esses resultarão em número semelhante de larvas de primeiro estágio. O desenvolvimento desses indivíduos até quarto estágio e posterior pupação, depende da pressão exercida por vários fatores sobre a população de larvas (Barata et al. 2007).

O mosquito adulto, após a emergência, utiliza nos primeiros momentos a exúvia pupal como local temporário de repouso. Esse tempo é necessário para que se verifique o endurecimento do exoesqueleto. Após esse evento, o mosquito estará apto a alçar vôo. O endurecimento da probóscide é mais lento e no primeiro dia ainda é flácida, impedindo a hematofagia. Nesse primeiro período da vida adulta, as fêmeas procuram geralmente um local escuro, úmido e sem vento utilizando-o como abrigo (Taipe-Lagos & Natal 2003).

Estando pronto para o vôo, ou tendo passado o período inicial da vida adulta, as fêmeas serão fecundadas. Uma vez ocorrida a cópula, os espermatozóides ficarão armazenados no organismo da fêmea, no interior de cápsulas que recebem o nome de espermatécas. A fecundação só ocorre quando o oócito (óvulo) chega ao duto da espermatéca, no momento da oviposição. Uma fêmea que passou pelo processo da cópula e que possui uma carga de espermatozóides acumuladas nas espermatécas, torna-se fértil pelo restante da vida (Forattini 2002).

Na natureza, as fêmeas após o acasalamento iniciarão o comportamento de alimentação (Figura 2). Podem alimentar-se de sucos e néctar vegetais e são também hematófagas. O repasto alimentar

sanguíneo representa para fêmeas matéria-prima e energia, necessárias ao desenvolvimento dos ovários. Assim, para haver a maturação dos oócitos nos ovários é necessária a obtenção de sangue pela fêmea. No momento da oviposição, os oócitos serão fecundados e transformar-se-ão em nova geração (Gomes et al. 2003). A vida das fêmeas adultas reside em ciclos que envolvem alimentação e oviposição (Figura 3).

Figura 2: Mosquito *Culex quinquefasciatus* fazendo hematofagia. Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:CulexNil.jpg>

Figura 3: Fluxo esquemático da vida de uma fêmea de mosquito. Fonte: Delsio Natal (comunicação pessoal).

Seus imaturos desenvolvem-se intensamente em coleções aquáticas comprometidas com efluentes domésticos e industriais, e na ausência de inimigos naturais, que sucumbem nas águas tóxicas, atingem densidades elevadíssimas e dada sua capacidade vetora e sua elevada antropofilia, tornam-se mosquitos de importância médica (Merritt et al. 1992).

As larvas de *Cx. quinquefasciatus* possuem o modo de alimentação do tipo coletor-filtrador. Essa via de alimentação apresenta um mecanismo de filtração bem desenvolvido, com adaptações principalmente nos músculos da faringe, tendo, após a ingestão, um seletor e pequeno conteúdo no estômago, mesmo com o meio externo sobrecarregado de substâncias alimentares. Essa característica permite a sobrevivência da espécie em meios aquáticos poluídos (Merritt et al. 1992).

Adiciona-se ainda o fato de que a alimentação dos imaturos de *Cx. quinquefasciatus* se faz na coluna d'água, próxima à superfície do meio líquido, o que facilita a permanência destes em ambiente anóxico (Moraes et al. 2006).

Estudos realizados na área periférica da grande São Paulo, no Parque Ecológico do Tietê (PET), mostram que, devido à disponibilidade de alimento, essa espécie é muito abundante, pois há intensa proliferação dos imaturos em água estagnada com alta concentração de matéria orgânica (Taípe-Lagos & Natal 2003). Sua presença no Parque é motivo de incômodo para a população, em função da elevada antropofilia.

Quanto à distribuição espacial avaliada pela frequência, verificou-se que os mosquitos estiveram presentes em quaisquer tipos de ambientes, da mata ao intradomicílio. A espécie *Culex quinquefasciatus* foi um dos mais frequentes (Taípe-Lagos & Natal 2003).

O *Culex quinquefasciatus* mostra comportamento endofílico e elevada abundância, tendo importância por ser vetor primário da filariose bancroftiana no Brasil.

1.4 Importância Médica dos Mosquitos do Gênero *Culex*

Os Culicidae (Diptera) de interesse epidemiológico são vetores de agentes infecciosos, como filárias e arbovírus. Além disso, Natal (1991) referiu que *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 é considerado, pela Saúde Pública, como fator de incômodo em inúmeras áreas urbanizadas do Brasil. A presença dessa espécie, no ambiente urbano, é indesejável e constitui diminuição da qualidade de vida (Laporta et al. 2006).

Situado em grande parte na região tropical, o Brasil enfrenta vários problemas de Saúde Pública associados a mosquitos, destacando-se malária, dengue, filarioses, além de várias arboviroses, incluindo-se a febre amarela silvestre. Doenças emergentes, decorrentes de desmatamento, deslocamentos humanos, alteração climática, entre outros

fatores podem surgir em qualquer ponto do território nacional, exigindo-se ações rápidas e eficientes de controle (Cardoso et al. 2005).

A filariose linfática é endêmica em várias regiões tropicais, sendo estimada em 800 milhões a população que vive em áreas endêmicas e em aproximadamente 73 milhões o número de indivíduos infectados pela *W. bancrofti*. O parasita é transmitido, comumente, por mosquitos do gênero *Culex*, nos quais as microfilárias se desenvolvem e atingem o estágio infectante (larva L3). Os vermes adultos da *W. bancrofti* vivem nos linfonodos e vasos linfáticos, e as microfilárias, são encontradas no sangue periférico humano (Fontes et al. 1994).

Mosquitos do gênero *Culex* também possuem potencial vetorial para diversas arboviroses, algumas de grande importância em saúde pública, entre elas a Encefalite do Nilo Ocidental (Huhn et al. 2003)

Os seres humanos são usualmente infectados pelo vírus do Oeste do Nilo, um RNA vírus, através da picada de um mosquito contaminado. O vírus se mantém enzoótico em um ciclo silvestre (mosquitos-aves-mosquitos) que envolve primariamente a espécie de mosquitos *Culex*. Humanos e cavalos geralmente são hospedeiros acidentais porque não desenvolvem viremia suficiente para propagar o vírus após serem picados por mosquitos (Figura 4). Alguns casos de transmissão entre humanos foram relatados, com contaminação por transfusão de sangue e transplante de órgãos (Luna & Pereira 2003).

A infecção do vírus do Nilo Ocidental parece ser igualmente distribuída por todas as idades e sexos entre os seres humanos. No entanto, a incidência de encefalite e morte aumenta 20 vezes em pessoas com 50 anos ou mais e a maioria das pessoas infectadas com o vírus do Nilo Ocidental são assintomáticas (Huhn et al. 2003).

Aproximadamente uma pessoa infectada em cinco desenvolve quadro febril mediano, e aproximadamente uma em 150 desenvolve manifestações neurológicas. Nenhuma vacina é conhecida para prevenir a infecção pelo vírus do Nilo Ocidental em humanos, no entanto pesquisas laboratoriais estão em andamento. Programas de controle de

mosquitos são essenciais na prevenção do vírus do Nilo Ocidental em áreas endêmicas (Shieh et al. 2000).

Em 1999, o vírus do Nilo se espalhou pelos EUA e iniciou a maior epidemia de encefalites causada por arbovírus na história americana. Essa arbovirose foi registrada pela primeira vez em Nova Iorque, (Shieh 2000) e no período de 10 de junho a 31 de dezembro de 2002, ocorreram 4156 casos de infecção pelo vírus do Nilo Ocidental incluindo 284 mortes (Huhn et al. 2003). Sendo dispersa principalmente por aves, espalhou-se pela América do Norte, e já atingiu extensas áreas da América Central e do Caribe (Luna & Pereira 2003)..

Figura 4: Ciclo de transmissão do vírus do Nilo Ocidental. Fonte: Huhn GD 2003

Acredita-se que seja praticamente inevitável a introdução do vírus da encefalite do Nilo Ocidental no Brasil. Publicação recente revela que o Brasil está na rota de migração de aves que poderão introduzir agentes infecciosos em nosso país. As autoridades de Saúde Pública das

diversas esferas do governo estão propondo a inclusão dessa virose dentro do sistema de vigilância sanitária (Luna & Pereira 2003).

1.5 Controle de Mosquitos

No século passado, os programas oficiais de controle de vetores no Brasil utilizaram estratégias químicas com o emprego em demasia de inseticidas como o DDT. Foi assim, na luta contra o *Aedes aegypti*, considerado erradicado em 1956, na campanha de erradicação de malária com grandes esforços até os anos 1970 e nas posteriores epidemias de dengue a partir da década de 1980. Entre sucessos e fracassos, o emprego de estratégias químicas no controle de vetores foi e tem sido bastante criticado, principalmente devido à contaminação ambiental, aos efeitos sobre organismos não alvos e aos problemas decorrentes da seleção de populações de mosquitos resistentes (Dorta et al. 1993).

Axtell & Arends (1990) fundamentaram as bases filosóficas, conceituais e estratégicas do manejo integrado de pragas, recomendando o emprego de inseticidas sintéticos apenas em situações de emergência e estimulando o controle biológico e o ordenamento ambiental como prioridades, com o objetivo de obter maior eficiência e preservar o ambiente de contaminações. Cresceu entre os aplicadores, a consciência ecológica e entre os cientistas a busca por alternativas não prejudiciais ao meio ambiente. Desse modo, campanhas contra a dengue no final do século passado já priorizavam o processo educativo e o saneamento, ficando a utilização de combate químico reduzida aos momentos de epidemias. Entomopatógenos do gênero *Bacillus* passaram a ter papel importante no controle biológico de vetores em muitos programas (Cuba 2005).

Tentativas de controle de mosquitos na maioria das vezes não têm surtido efeito devido principalmente à grande capacidade de reprodução e de flexibilidade genômica dos mosquitos. A flexibilidade

genômica pode ser demonstrada não somente pela rápida seleção de linhagens resistentes a inseticidas químicos e biológicos utilizados no seu controle ou ainda a resistência a diversas condições ambientais, como também pela existência de variedade de espécies intimamente relacionadas, formando complexos de espécies crípticas, algumas das quais parecem estar sofrendo especiação no processo de adaptação ao ambiente modificado pelo homem (Besansky & Collins 1992). A resistência aos inseticidas tem levado a sérios problemas de saúde pública, contribuindo para o ressurgimento de parasitoses e viroses transmitidas por mosquitos. Por estes motivos é importante compreender as bases moleculares da flexibilidade genômica dos mosquitos e por consequência os mecanismos que levam à diversidade de suas populações.

1.5.1 Controle Químico

Entende-se por esse tipo de controle, a aplicação auxiliar de qualquer produto de natureza química, visando reduzir uma população de culicídeos, de maneira a impedir a transmissão de doenças ou evitar incômodo.

Segundo Campo & Andrade 2003, os larvicidas são produtos naturais ou artificiais utilizados para controlar larvas e pupas. Os larvicidas são aplicados em coleções aquáticas reconhecidas como criadouros de mosquitos. Larvicidas de contato se inserem no grupo composto que é efetivo mediante o contato de imaturos com o mesmo. O princípio ativo penetra no corpo através da ingestão ou então, é absorvido via exoesqueleto.

Os Adulticidas designam produtos químicos destinados ao controle de formas aladas de mosquitos. Existem basicamente duas estratégias de combate a adultos: aplicações em solo e aplicações aéreas (Campo & Andrade 2003).

Os Organofosfatos, de maneira geral, são mais baratos que os inseticidas modernos. Atuam bioquimicamente, inibindo a colinesterase através de mecanismo que interfere na junção neuromuscular, provocando um estado de paralisia no inseto (Dorta et al. 1993).

O DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), o primeiro pesticida moderno, tem sido largamente usado após a Segunda Guerra Mundial para o combate dos mosquitos causadores da malária e do tifo (Andrade 1990), e contribuiu para a erradicação da malária em muitos países na década de 1950. Além dos carbamatos que são inibidores da acetilcolinesterase, agem provocando uma superestimulação do sistema nervoso central.

Outro grupo de inseticida bastante utilizado são os piretróides. São produtos derivados das piretrinas naturais extraídas do *Chrysanthemums*. Esses produtos atuam no sistema nervoso através da inibição da bomba sódio-potássio, mecanismo necessário para repetições de impulsos ao longo das fibras nervosas (Andrade 1990), matando rapidamente os mosquitos adultos.

Uma outra abordagem alternativa do uso de inseticidas veio com o Methoprene, que é um análogo sintético de hormônios de insetos denominados hormônios juvenis, sendo reconhecido como regulador de crescimento de inseto. Quando aplicado no habitat aquático e absorvido pelos imaturos de mosquito, esses ficarão com o sistema hormonal desbalanceado, levando ao impedimento da emergência do adulto (Andrade 1990).

1.5.2 Controle Biológico:

Por aproximadamente 30 anos, várias cepas de *Bacillus thuringiensis* foram utilizadas com sucesso como biopesticidas, em sua maioria contra pragas agrícolas (Porter et al. 1993). No decorrer do curso da esporulação, algumas cepas de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* sintetizam uma inclusão de esporos ou “cristais”, que contém proteínas tóxicas para larvas de uma variedade de espécies de mosquitos. Em sua maioria, os componentes presentes no cristal são duas proteínas de 51 e 42 kDa, que isoladamente não são tóxicas, sua toxicidade é formada por sua interação (Baumann et al. 1991).

Estudos de microscopia eletrônica indicam que quando ocorre a ingestão dos cristais pelas larvas de mosquitos, as células epiteliais do sistema digestivo são o primeiro alvo das toxinas (Baumann et al. 1991). As proteínas tóxicas se dissolvem no pH alcalino do sistema digestivo do inseto, onde são ativados proteoliticamente e se ligam às membranas das células epiteliais. As células são destruídas, e a larva para de comer e morre (Porter et al. 1993).

Seus cristais tóxicos são protegidos por um exósporo, o que os torna estáveis a variações de temperatura e à capacidade de continuar tóxico em águas poluídas. O potencial molecular de toxicidade dos esporos é alto comparado com pesticidas químicos, cerca de 300 vezes mais tóxico do que piretróides sintéticos e 80.000 vezes mais tóxico do que organofosforados (Porter et al. 1993).

Comparado ao *B. sphaenicus* o *B. thunrngiensis* possui muito mais diversidade em cepas de inseticidas conhecidos. Além do que certas cepas de *B. sphaericus* são tóxicas exclusivamente para dípteros, já o *B. thunrngiensis* pode ser tóxico a um amplo espectro de insetos, nematóides e protozoários. Dependendo da cepa em particular do *B. thuringiensis*, a proteína tóxica pode ser específica para membros de Lepidoptera, Coleoptera, ou Diptera, porém algumas são específicas tanto para Lepidoptera quanto para Diptera (Porter et al. 1993).

Alguns produtos atingiram sucesso comercial moderado em países em desenvolvimento, porém os altos custos de produção impediram sua implementação plena. Além do que, surgiram algumas dúvidas em relação a sua utilização a longo prazo devido ao desenvolvimento de resistência, que já foi notificado, ao *B. sphaericus* em populações selvagens de mosquitos *Culex* em diversos países (Federici et al. 2003).

As toxinas se degradam em alguns dias, e os bacilos parecem não ser tóxicos a outros insetos, animais e ao meio ambiente. No entanto, sucesso operacional contra os três maiores gêneros de mosquitos: *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* se mostraram limitados e confinados a regiões temperadas do globo, onde estes mosquitos não apresentam seu verdadeiro desafio em saúde pública (Porter et al. 1993).

O uso de peixes larvicidas tem sido bastante difundido em vários países como alternativa auxiliar no controle de vetores de patógenos (FUNASA 2001). Recentemente, vários estudos têm focalizado o uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos (Blanford et al. 2005). Assim, por exemplo, a co-aplicação de fungos com inseticidas, tem sido uma alternativa para solucionar problemas da resistência aos piretróides utilizados no controle.

1.6 Resistência

Duas linhagens de *Cx. quinquefasciatus* foram usadas no presente estudo: a linhagem suscetível IAL, usada como controle, e que tem sido mantida em insetário desde 1983 na seção de virologia do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo. Originária do Município de Iguape, provavelmente nunca entrou em contato com inseticidas; a linhagem PIN que foi estabelecida em 1995 com a coleta de aproximadamente 3.000 espécimes adultos nas margens do rio Pinheiros, na zona sul do Município de São Paulo (Bracco et al. 1997).

A linhagem IAL mostrou-se suscetível a todos os inseticidas testados. Já a linhagem PIN demonstrou uma mortalidade de 58,8% ao malathion, 47,5% ao fenitrothion e 59,4% ao propoxur e completa suscetibilidade tanto ao DDT quanto à permetrina. A mortalidade nos controles nunca foi superior a 8%. Tais resultados mostram resistência, na linhagem PIN, ao malathion, fenitrothion e propoxur e suscetibilidade ao organoclorado DDT e ao piretróide permetrina (Bracco et al. 1997).

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

Estratégias de controle de insetos baseadas em agentes químico e/ou biológicos, têm sido ineficientes na maioria das vezes, além de serem altamente prejudiciais ao meio ambiente. Problemas associados ao custo econômico, impactos ambientais, possíveis efeitos sobre a saúde humana e principalmente a resistência dos mosquitos vetores de patógenos aos inseticidas levaram a propostas de novas estratégias de controle. Uma dessas estratégias, denominada SIT (Técnica do Inseto Estéril) tem sido amplamente utilizada há décadas propiciando resultados positivos no controle de pragas agrícolas (Bushland 1955).

Knipling (1955) propôs o conceito de liberação de insetos estéreis para controlar populações de pragas de importância agrícola. O paradigma deste novo método foi a eliminação bem sucedida do *Cochliomyia hominivorax* nos estados ao sul dos EUA, México e toda América Central. Esta área está atualmente protegida de uma re-invasão pela América do Sul pela liberação de relativamente poucas moscas estéreis através da barreira feita no Panamá. Moscas estéreis também foram utilizadas para eliminar a potencialmente devastadora entrada desta espécie no norte da África (Bushland et al. 1955).

Segundo Robinson (2002), a SIT se baseia na criação em massa, esterilização e liberação de grandes números de insetos machos estéreis em uma área alvo. Os machos liberados cruzarão com fêmeas selvagens, reduzindo o potencial reprodutivo da população selvagem e,

portanto causando a redução da população nas gerações subseqüentes. Se um número suficiente de machos estéreis for liberado por tempo suficiente, a população alvo entrará em colapso, levando à sua supressão ou até mesmo sua eliminação total da área alvo. Sendo assim esta técnica é espécie específica e não agride o meio ambiente.

A Mosca da Fruta do mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), é uma praga de grande impacto ambiental, que causa danos a uma variedade de espécies de frutas em todo o mundo. Com a utilização da técnica do mosquito estéril por radiação a Mosca da Fruta tem sido controlada e até mesmo erradicada em várias regiões (Robinson 2002).

A família Díptera Tephritidae consiste em mais de 4000 espécies, das quais aproximadamente 250 apresentam importância econômica e são amplamente distribuídas em climas temperados, subtropicais e tropicais, uma delas, a *Bactrocera cucurbitae* ataca mais de 81 espécies de plantas (Dhillon et al. 2005). O controle químico contra a *Bactrocera cucurbitae* é relativamente ineficaz e o uso da técnica do mosquito estéril se provou eficaz erradicando a *Bactrocera cucurbitae* do Japão por mais de 24 anos (Koyama et al. 2004)

Existem diversos exemplos onde a SIT está sendo aplicada como controle preventivo para evitar o estabelecimento de moscas exóticas invasoras. No sul da Austrália, onde machos estéreis estão sendo liberados perto de Adelaide para prevenir a invasão de moscas originárias da parte oeste do país. Em Okinawa, Japão, está em progresso a liberação de *Bactrocera cucurbitae* estéreis para evitar a re-invasão de moscas vindo de Yaiwan (Endrichs et al. 2002).

Segundo Myers et al. (1998), a erradicação da *Cochliomyia hominivorax*, (causadora de miíases) 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 à esta espécie.

A *Cochliomyia hominivorax*, agente da miíase, coloca seus ovos em feridas de mamíferos e causa grandes perdas econômicas. A erradicação da *Cochliomyia hominivorax* foi alcançada através da técnica de liberação de mosquitos estéreis (SIT). Milhões de moscas macho foram criadas, esterilizadas e soltas. Entre 1958 e 1960, a *Cochliomyia hominivorax* foi erradicada da Flórida e programas subseqüentes com o objetivo de impelir seus limites no México e América Central. Sua erradicação dos EUA e México foi alcançada em 1991 a um custo estimado de US\$750 milhões (Myers et al. 1998).

Esforços para a erradicação ainda persistem na América Central, com erradicações bem sucedidas em Belize no ano de 1993, em El Salvador em 1994 e em Honduras em 1995 (Bermúdez et al. 2007).

Como descrito anteriormente, a técnica do mosquito estéril (SIT) tem sido aplicada com sucesso em um grande número de pestes agrícolas e foi utilizada contra o *Anopheles albimanus*, Wiedemann 1970, com resultados encorajadores. Nos últimos anos o interesse pela utilização do SIT em vetores da malária levou a estudos que investigaram todos os aspectos do programa SIT, incluindo produção em massa, esterilização e metodologias de soltura (Helinski et al. 2006).

Segundo Helinski et al. (2006), além de utilizar radiação, a SIT pode ser baseada na esterilização de insetos pela esterilização química ou modernas abordagens biotecnológicas. Esterilização por radiação foi extensivamente pesquisada em mosquitos nos últimos 30 anos. Resultados promissores foram obtidos com esterilização química pelo alto nível de esterilização induzido e “fitness”, porém com a desvantagem de serem agentes mutagênicos que apresentam perigo em potencial aos humanos durante o manuseio e animais se existirem resíduos em insetos liberados.

Apesar da quantidade de resíduo liberado no meio ambiente ter sido baixa devido ao cuidadoso processo de liberação, a preocupação se tornou maior aos possíveis efeitos negativos ao meio ambiente se um grande número de insetos tratados forem liberados (Helinski et al. 2006).

Ainda assim, valeria a pena identificar componentes adicionais com propriedades de esterilização química. Permanece duvidoso se os agentes químicos disponíveis hoje em dia terão níveis de toxicidade aceitáveis para o uso em futuros programas de controle genético.

Determinar a dose ótima para um programa SIT depende do nível de esterilidade que se quer induzir e a competitividade dos machos irradiados. Uma dose baixa pode resultar em esterilidade insuficiente, e uma dose alta pode reduzir a eficiência da liberação.

Mosquitos, pupas e adultos podem ser irradiados. Irradiação de pupas é mais simples, porém existem evidências de uma redução na competitividade quando pupas macho são irradiadas com doses altas em comparação com mosquitos adultos (Helinski et al. 2006).

1.7.1 Sexismo Genético para uso na SIT

Uma das dificuldades de se implementar o programa de liberação de insetos estéreis é a necessidade da liberação apenas de indivíduos machos. A separação manual além de ser extremamente laboriosa, em algumas espécies, não apresenta níveis aceitáveis de contaminação de fêmeas entre machos (Delprat et al. 2002).

Desse modo, sistemas que causam a morte de fêmeas em algum estágio de sua vida têm sido desenvolvidos, separando automaticamente os machos das fêmeas, eliminando o trabalho da separação e diminuindo a níveis muito baixos a presença de fêmeas entre machos liberados (Shearman 2002).

Sistemas que causam a morte de fêmeas têm a vantagem de poderem ser aplicados à população como um todo. Por exemplo, 5 milhões de ovos de *Ceratitis capitata*, podem receber tratamento térmico em 5 litros de água. Isso pode ser contrastado com o uso de 40 separadores de pupa por cor, que pode separar apenas 12 milhões de

pupas por hora. A manipulação extra individual de cada pupa pode causar um efeito negativo na qualidade final (Robinson 2002).

Um sistema letal para fêmeas, no entanto requer que duas colônias sejam operadas em uma instalação apropriada. Primeiramente uma colônia produtora onde os tratamentos restritivos não sejam aplicados, as fêmeas não sejam mortas e a colônia possa ser mantida. Então, uma segunda colônia onde os tratamentos restritivos sejam aplicados para produzir machos para esterilização e liberação. Isso significa que existem duas populações, uma que é tratada com calor e produzira apenas machos e a segunda que não é tratada e produzira machos e fêmeas (Robinson 2002).

Para sistemas baseados em seleção, a separação dos sexos pode ser aplicada na mesma população que é usada para a manutenção da colônia uma vez que as fêmeas podem ser recolocadas na colônia após a separação. É desejável sob ponto de vista econômico que o procedimento de sexagem ou seleção sejam feitos o mais cedo possível no desenvolvimento do inseto (Robinson 2002).

Geralmente sistemas baseados em letalidade condicional de fêmeas requerem a aplicação de uma substância química ou alteração física do ambiente (calor). Existem várias razões justificando que substâncias químicas não são ideais. Não é sempre possível tratar embriões em desenvolvimento, uma vez que o cório pode ser impermeável. Se um estágio larval tiver de ser tratado em uma dieta que receba relativamente grandes quantidades de substâncias químicas, esta tem que ser adicionada a uma quantidade grande de ração, o que pode ter algum impacto no resultado esperado (Robinson 2002).

O sucesso da técnica de separação genética em moscas é diretamente atribuído ao fato de que embriões podem ser facilmente tratados com altas temperaturas. Uma mutação sensível a temperatura que só é expressa tarde no desenvolvimento, apresentará sérios problemas operacionais, uma vez que não é fácil regular a temperatura de grandes volumes de ração em salas grandes. (Meats et al. 2002).

Todas as linhagens baseadas em translocações e mutações do macho requerem que as fêmeas sejam homozigotas recessivas para a mutação. Isso restringe os tipos de mutações que podem ser utilizadas. Para a manutenção rotineira dessas linhagens em laboratório, uma redução do “fitness” das fêmeas não é um problema sério, no entanto, em grandes instituições onde produção é o mais importante, fêmeas com “fitness” muito ruim são inaceitáveis. Todas as mutações recessivas serão lesivas em alguma maneira para a fêmea, a chave para a questão é quanto. Por exemplo, a redução da produção de ovos requer que uma colônia proporcionalmente maior seja requerida apenas para a manutenção da colônia (Robinson 2002).

Os machos são heterozigotos para a mutação e não é esperado que qualquer efeito negativo seja percebido. Eles, no entanto carregam uma translocação que reduz a fertilidade de suas parceiras em 50%. Isso deve ser levado em consideração quando se planeja instalação de liberação em massa. Protocolos de controle de qualidade para produção em massa de moscas são componentes muito importantes do programa SIT (Robinson et al. 2004).

O método de obtenção para separação de sexo por meio de um fenótipo depende do tipo de mutação e o mecanismo de determinação do sexo. Tais métodos foram revistos por Robinson (1989) e envolvem translocação cromossômica que, para aplicação prática, devem ser estáveis, e não deletérios para competitividade sexual, fisiológica ou comportamental incluindo seleção do habitat (Shearman 2002).

Moscas da Fruta possuem determinação por sexo que é muito influenciada pelo sistema de cromossomos sexuais XX/XY. Uma linhagem genética de separação sexual pode ser concebida para espécies localizando-se uma mutação recessiva autossomal que é letal em situações específicas, como a sensibilidade a altas temperaturas, que é ligado ao alelo selvagem ao cromossomo Y usando a translocação. A linhagem mutante para separação sexual deve possuir fêmeas

homozigotas para sensibilidade a temperatura e os machos fenotipicamente normais para esta característica (Meats et al. 2002).

A constante termal de sobrevivência da *Bactrocera tryoni* foi dada por Meats et al. (2002). A habilidade de sobrevivência a temperaturas (altas ou baixas) depende da duração da exposição e do estágio de vida que se encontram. Sobreviver a um estresse térmico em um estágio de desenvolvimento em particular, pode estar associado a uma menor habilidade de sobreviver a um estresse em um estágio subsequente, podendo estar associado a uma taxa de sobrevivência menor do que o normal, mesmo que as condições termais sejam ótimas. A habilidade de sobreviver a uma temperatura extrema pode ser afetada dramaticamente pelo estado de aclimação (Meats et al. 2002).

1.8 Controle Genético de Insetos: supressão e substituição de população

O controle genético de vetores não é uma única estratégia, mas possui uma variedade de técnicas promissoras, que podem ser subdivididas em duas categorias baseadas na produção de insetos transgênicos: substituição ou supressão de uma população alvo. O fator comum é que o mecanismo de controle genético é introduzido na natureza por cruzamentos (Curtis 1968).

O uso das tecnologias de controle genético para limitar o tamanho da população vetora (supressão da população), ou para alterar a população para que eles sejam resistentes a patógenos (substituição de população) é discutido a seguir (Jasinskiene et al. 2007).

O sistema de controle genético para supressão de uma população alvo é baseado na técnica de insetos estéreis (SIT), que levou ao desenvolvimento da tecnologia conhecida como “liberação de insetos carregando um gene letal dominante” (RIDL). Nessa estratégia, o produto do transgene suprime a reprodução dos insetos alvos, que cruzados com

os mosquitos transgênicos levam ao declínio da população (Kokoza et al. 2001).

A utilidade da supressão de uma população depende da ecologia da população vetora alvo. Particularmente o tamanho da população selvagem, a área em que a liberação em massa será conduzida, a estrutura genética da população selvagem e a pressão da re-invasão de áreas não alvo adjacentes (Coleman & Alphey 2004).

1.8.1 Patógenos

Na estratégia de controle genético para substituição da população, os mosquitos transgênicos devem carregar algum gene que iniba o desenvolvimento de patógenos e, quando liberados no meio ambiente, o transgene seja introduzido na população, passando a ser dominante e assim reduzindo a transmissão de doenças (Moreira et al. 2000).

A expressão de genes ativados por repasto sanguíneo é de grande importância e especificidade. Regiões reguladoras destes genes podem ser usadas para expressar moléculas efetoras anti-patogênicas em mosquitos geneticamente modificados com precisão temporal e espacial designada para maximizar o efeito no patógeno (Kokoza et al. 2001).

No caso da transmissão da malária, pela sua distribuição geográfica, se enquadra na categoria de estratégias genéticas de substituição de população. Esta estratégia requer dois conceitos fundamentais: a criação de um laboratório onde uma linhagem geneticamente modificada se tornará refratária ao patógeno relevante e o desenvolvimento de um sistema onde a característica refratária seja difundida na população selvagem. Se a frequência da característica refratária na população vetora possa ser aumentada a um nível crítico

onde a transmissão do patógeno não ocorra, o fardo da doença será eliminado (Coleman & Alphey 2004).

Com o desenvolvimento de métodos padronizados de microinjeções (Jasinskiene et al. 2007), a possibilidade de utilização de mosquitos transgênicos está rapidamente ganhando força. A descoberta de elementos de transposição mais apropriados para transformação de mosquitos, os achados de marcadores de transformação ideais para o monitoramento das transformações, tais como proteínas fluorescentes GFP e DsRed (Handler 2002), a caracterização de promotores específicos que podem controlar a expressão de genes estranhos em tecidos e estágios específicos, e a identificação e caracterização de moléculas que podem interferir com o desenvolvimento de parasitas no hospedeiro invertebrado (Moreira et al. 2000).

1.8.2 Elementos de Transposição (transposons)

A transformação genética de uma variedade de insetos usando diversos sistemas foram revistas extensamente por diversos autores. A inserção de genes em insetos abre uma gama de opções para o controle de populações de mosquitos de importância médica ou como controle de pragas agrícolas (Alphey 2002).

Os sistemas disponíveis incluem transformação de embriões que resultam em integrações hereditárias estáveis, como também sistemas que permitem expressão transiente extracromossomal de um sistema gênico, geralmente mediado por um sistema de vírus ou bactérias (Allen et al. 2001).

Para a aplicação prática do sistema de expressão gênica em insetos de importância médica, a transformação embrionária é tipicamente mediada por um elemento de transposição que atualmente é o método mais promissor. Estes elementos tem a capacidade de se moverem no genoma devido a ação da transposase, e ocupam porções

significativas do genoma da maioria dos eucariotos (Lander et al. 2001). Os elementos de transposição tem basicamente a mesma estrutura: repetições terminais invertidas (RTI) de 10 a 30 pb, e uma unidade transcricional interna que codifica a enzima transposase, responsável pela integração do transposon (ou um transgene) em um genoma hospedeiro (mosquito, por exemplo), em um tipo de mecanismo “cortar e passar” (Figura 5), e podendo ser divididos em duas classes:

Classe I: Retrotransposons: Os Retrotransposons funcionam copiando-se e colando cópias em diversos lugares do genoma. Inicialmente retrotransposons transformam-se em RNA, porém ao serem transcritos, o RNA é transformado em DNA por uma transcriptase reversa, que geralmente é codificada pelo próprio transposon, e é inserida novamente no genoma (Behura 2006).

Classe II: Transposons DNA: A maior diferença entre transposons de Classe II e retrotransposons é que seus mecanismos de transposição não são intermediados por RNA. Transposons de Classe II normalmente se movem cortando e colando, ao invés de copiar e colar, usando a enzima transposase. Diferentes tipos de transposase funcionam de diversas maneiras. Algumas podem se ligar a qualquer parte da molécula de DNA, enquanto outras se ligam a seqüências específicas (Handler 2002).

A transposase faz um corte no sítio alvo produzindo uma saliência, o transposon é cortado pela transposase e ligado no sítio alvo. A DNA polimerase preenche os espaços vazios e a DNA ligase fecha a ligação açúcar-fosfato inserindo-o no genoma celular (Kokoza et al. 2001).

Figura 5: Estrutura de um elemento de transposição. RTI - repetições terminais invertidas (RTI) de 10 a 30 pb. Unidade transcripcional interna que codifica a enzima transposase.

Existem quatro sistemas disponíveis que utilizam transposons de classe II que podem ser utilizados em uma grande gama de insetos. São eles o *Hermes* da *Musca domestica*, *mariner* da *Drosophila mauritiana*, *Minos* da *D. hydei*, e o *piggyBac* da *Trichoplusia ni*.

Curiosamente, os primeiros transposons estudados para transformação de não-drosófilas, elemento *P* e *hobo*, foram descobertos em *D. melanogaster* e já foram usados rotineiramente para esta espécie. Ainda assim estes dois elementos não possuem, ou possuem muito pouca função quando utilizados fora da *Drosophila*, enquanto os outros sistemas citados funcionam efetivamente em drosofilídeos e não-drosofilídeos (O'Brochta et al. 2003).

Similar ao *mariner*, o elemento de transposição *piggyBac* foi descoberto muito antes de seu uso potencial em transformações em não-drosofilídeos se tornar aparente. Notavelmente, ele foi descoberto pela capacidade de transpor material genético de seu hospedeiro dentro de um plasmídeo (Fraser et al. 1983).

Posterior análise molecular do elemento e sua caracterização funcional por sua mobilidade transiente, combinado com sua capacidade de incisão precisa e transposição em células e embriões indicaram seu potencial uso como vetor para transformações embrionárias em várias espécies de insetos (Grossman et al. 2000).

Similar ao *Minos*, ele foi primeiro testado em moscas usando o sistema de marcadores brancos, mas ao invés dos outros vetores que utilizavam calor, o *piggyBac* usou uma transposase indicando que o *piggybac* tem uma função autônoma em diversas ordens de insetos (Handler et al. 1998).

Transformação embrionária com *piggyBac* foi alcançada em outros dípteros incluindo *D. melanogaster* (Handler & Harrell 1999), *Bactrocera dorsalis* (Handler & McCombs 2000), *Anastrepha suspensa* (Handler & Harrell 2001a), *M. domestica* (Hediger et al. 2001), *A. aegypti* (Lobo et al. 2002), *Anopheles albimanus* (Perera et al. 2002); *Bombyx mori* (Tamura et al. 2000), *Pectinophora gossypiella* (Peloquin et al. 2000); e *T. castaneum* (Berghammer et al. 1999).

Ao invés dos outros elementos de transposição, o *piggyBac* não é um membro de uma grande família de elementos, outros elementos dividem a especificidade de integração no sítio do tetranucleotídeo TTAA. Buscas pelo *piggyBac* não apresentaram evidências de sua existência além do plasmídeo, e foi então, surpreendente achar múltiplos elementos muito parecidos com o *piggyBac* presentes no genoma da *B. dorsalis* (Handler & McCombs 2000). Hibridizações iniciais e estudos com PCR indicaram que existem de 10 a 20 elementos no genoma de selvagens e linhagens transgênicas, porém nenhuma se provou funcional.

Estudos de hibridização indicaram que o *piggyBac* existe também na *Spodoptera frugiperda*, porém 140 desses elementos são provavelmente formas muito truncadas.

A existência de um *piggyBac* em ambas, próximas e distantes espécies sugere que ele recentemente foi transmitido por transmissão horizontal e provavelmente existe em outras espécies. Esse movimento teve de ser facilitado por elementos funcionais do *piggyBac* ou sistemas de mobilidade cruzada, porém considerações sobre a estabilidade do *Hermes* devem ser estendidas, assim como o *piggyBac* (Handler 2002).

1.8.3 Marcadores para a Seleção de Transformação

Para o monitoramento de parâmetros que influenciam o sucesso de programas de liberação em massa de insetos, como no caso da liberação de mosquitos estéreis pelo método SIT, é necessário que os mosquitos liberados sejam discriminados dos selvagens. Estes

parâmetros incluem, a dispersão dos insetos a partir dos locais de liberação, a sobrevivência desses em campo, e a competição por acasalamento com os selvagens. Monitorar o tamanho de uma população de campo, também seria outro parâmetro facilitado por um marcador que discrimina os indivíduos liberados e os de selvagens (Alphey 2002).

Um dos métodos para marcação e monitoramento para trabalho em campo utiliza a marcação de adultos liberados com pó-fluorescente, que além de caro, compromete a capacidade de acasalamento e competitividade dos insetos liberados.

No caso de manipulação genética de insetos, os genes marcadores são utilizados para permitir a identificação de organismos transgênicos. Expressando o gene marcador, o mosquito transgênico será diferenciado dos não transgênicos verificando assim, o sucesso da transformação. As primeiras tentativas de transformação de mosquitos utilizavam inseticidas e genes de resistência a antibióticos como marcadores da transformação (Miller et al. 1987; Morris et al. 1989). Este método se tornou problemático devido às dificuldades de discriminar larvas transformadas das não-transformadas. A concentração da droga que deveria matar 100% das larvas não transformadas e que permitisse a sobrevivência de cada larva transformada era de difícil determinação, resultando na seleção de muitos falsos positivos.

Mais tarde, o uso de genes que resgatam a coloração do olho passou a ser utilizado mostrando eficiência na identificação de *Ae. aegypti* transgênico (Jasinskiene et al. 1998). No entanto, este marcador só se aplicava em espécies que possuíam mutantes para a cor dos olhos, para que o resgate da coloração original fosse possível, após a incorporação do gene marcador.

Um grande avanço na técnica foi a utilização da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* ou GFP), pois esta tem a vantagem de funcionar em várias espécies de animais, incluindo insetos (Pinkerton et al. 2000, Horn e Wimmer, 2000, Catteruccia et al. 2000, Kokoza et al. 2001), células de mamíferos (Cheng et al. 1996) e em

espécies de protozoários como *P. berghei* e *P. falciparum* (De Koning-Ward et al. 1998, Kadakoppala et al. 2000).

O GFP controlado pelo promotor constitutivo de actina de *Drosophila* foi utilizado pela primeira vez como marcador de mosquitos transformados em *A. aegypti* (Pinkerton et al. 2000), tendo a vantagem de ser detectado em qualquer fase de vida, economizando tempo e esforço de criar mosquitos não transgênicos até a fase adulta (Moreira et al. 2002). Além de controlado pelo promotor de actina, outras construções utilizando GFP com promotores de poliubiquitina e 3xP3 (específico de olho) têm sido produzidos com sucesso. Destes, o promotor específico de olho (3xP3) é o de preferência, uma vez que a expressão em tecidos do olho pode reduzir um possível efeito tóxico da proteína GFP. Este promotor, como os constitutivos, dirige a expressão em todos os estágios de desenvolvimento. A expressão em sistemas ópticos permite a identificação de transgênicos em organismos com cutículas espessas e melanizadas.

O GFP tem sido o marcador de preferência em transformações de mosquitos, e tem sido usado em *A. aegypti* (Pinkerton et al. 2000, Kokoza et al, 2001), *Culex quinquefasciatus* (Allen et al. 2001) *A. stephensi* e *A. gambiae* (Catteruccia et al. 2000, Ito et al. 2002).

Outro marcador bastante utilizado é o DsRed2, uma proteína fluorescente vermelha, que foi clonada do coral *Discosoma* homologamente a proteína fluorescente verde (GFP) da água viva *Aequorea*. A proteína fluorescente vermelha (DsRed) tem um brilho mais intenso e estabilidade contra variações de pH, desnaturações e foto sensibilidade. Pode ainda, sofrer mutações para emitir maiores comprimentos de onda e apresentar mais excitação (Gross et al. 2000).

Além das proteínas GFP e DsRed, outras proteínas fluorescentes têm sido sugeridas para uso em organismos transformados, como por exemplo, o AmCyan. Cada qual necessita de filtros com comprimentos de onda específicos para visualização, possibilitando a inserção de mais de um marcador fluorescente, permitindo que mais de

um gene seja inserido e monitorado no mesmo indivíduo. Pode-se também, inserir dois marcadores fluorescentes com promotores ligados a genes distintos propiciando expressões em locais e situações distintas (Baird et al. 2000).

1.9 O Melhoramento da Técnica SIT

O controle de populações de insetos com a técnica SIT tem sido realizado com sucesso em diversas ocasiões, erradicando pragas agrícolas e ajudando no combate a vetores de patógenos. Este método de controle, também conhecido como método de liberação de mosquitos estéreis, é espécie-específico e não poluente ao meio ambiente. Ele está baseado na liberação em massa de machos estéreis (Bushland 1955). O acasalamento dos machos estéreis com as fêmeas selvagens leva a uma diminuição no potencial reprodutivo das fêmeas, e se forem liberados em número suficiente por um período de tempo, pode levar à uma erradicação da população vetora ou peste de agricultura local.

Baseado nos princípios da técnica SIT havia grande otimismo no final da década 1960 e início da década de 1970 no uso desta técnica como estratégia alternativa no controle de mosquitos vetores de doenças. Entretanto, a técnica SIT tem sido usada somente contra um número restrito de espécies de mosquitos alvos. Este fato é devido em grande parte a alguns problemas fundamentais do sistema.

Os insetos machos liberados devem competir por acasalamento com os tipos selvagens e o processo de produção, e em particular a necessidade de esterilizar os insetos machos por radiação pode, em alguns casos, causar uma perda drástica na capacidade de acasalamento destes insetos comparados aos machos selvagens. Os machos irradiados podem ser menos competitivos e também apresentar um tempo de vida reduzido (Alphey 2002). A combinação destes dois fatores pode levar a uma redução nos parâmetros de fitness de *Cx. quinquefasciatus* (acasalamento e sobrevivência). Como exemplo, o método de esterilização usado para Mosca da Fruta, *Ceratitis capitata*, levou a

redução de quatro a dez vezes nos parâmetros de competitividade prejudicando o programa de erradicação dessa espécie (Rendón et al. 2000; Boake et al. 1994).

As instalações de irradiação são caras e potencialmente perigosas (Alphey 2002). Há ainda a possibilidade de liberação de indivíduos irradiados, porém ainda férteis, o que pode ser potencialmente perigoso. A logística é prejudicada pela necessidade de soltura em estágios de vida pré-estabelecidos e pela distância das instalações das áreas alvo.

Além disso, e em todas situações, no esforço de suprimir determinada população vetora de patógenos, é importante a liberação exclusiva de mosquitos machos, por não exercerem a hematofagia. Somente as fêmeas adultas fazem o respasto sanguíneo e são as responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos. A liberação em massa de machos estéreis mesmo que contaminados com uma mínima porcentagem de fêmeas não seria aceitável do ponto de vista ético, não somente pelo incômodo que essas fêmeas poderiam provocar, mas também pela possibilidade de contribuir com a transmissão.

Outro fato importante é que as fêmeas estéreis podem comprometer o sucesso do programa ao inibir o acasalamento dos machos estéreis com as fêmeas selvagens, podendo ocorrer neste caso um efeito neutralizador quando liberadas junto aos machos estéreis. Tal fenômeno foi demonstrado com *Ce. capitata*, ocasião em que a liberação somente de machos foi três a cinco vezes mais efetiva do que a liberação equivalente de machos misturados com fêmeas (McInnis et al. 2002).

Para algumas espécies de culicídeos, a separação entre machos e fêmeas poderia ser feita por métodos físicos, baseados no tamanho das pupas, porém, sob o ponto de vista prático, essa estratégia seria extremamente trabalhosa e inviabilizaria qualquer projeto em grande escala. Com moscas *tse-tse*, a separação mostrou-se exequível com base no tempo de eclosão, que diferia entre os sexos. Na prática esses métodos raramente mostram-se eficazes e seriam portanto de aplicações

restritas. Na Índia, centenas de milhares de machos de *Culex* e *Aedes* foram diariamente produzidos, porém sempre com “contaminação” por fêmeas nos lotes de pelo menos 0.2%, pelo uso de separadores de pupas (Sharma et al. 1972).

Uma alternativa para produzir somente machos seria induzir o dimorfismo sexual utilizando-se de estratégias da genética. Tais métodos, são conhecidos como mecanismos de sexismo genético, citados anteriormente. Os métodos mais usados são baseados na translocação do cromossomo Y induzida por radiação como marcador seletivo dominante, complementar a um gene ligado ao X ou autossomo, tal como a cor da pupa, a letalidade sensível à temperatura ou a resistência a inseticida (Robinson et al. 1999). Porém, como discutido anteriormente, haveria ainda a necessidade de radiação, que causa perda na capacidade de acasalamento destes insetos comparados aos machos selvagens. Além disso, sistemas baseados em aberrações cromossômicas tendem a ser instáveis, e a reversão pode ser um problema quando da produção e liberação de insetos em larga escala, além de reduzir o *fitness* dos insetos tornando-os menos efetivos em relação ao SIT (Thomas et al. 2000).

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

Seria claramente uma vantagem ser possível monitorar parâmetros que influenciam ou buscam a eficiência de um programa de liberação em massa. Isto inclui a dispersão dos insetos a partir de seu ponto de soltura, sua sobrevivência na natureza e sua eficiência em competir por fêmeas. Também seria útil ser capaz de monitorar o tamanho da população selvagem.

Um sistema eficiente, de baixo custo para remover fêmeas da população que será liberada seria o maior benefício para os programas de SIT. Isso pode ser alcançado introduzindo um gene letal específico para fêmeas que pode ser induzido (ou reprimido) na população a ser liberada, levando a morte dessas fêmeas (Alphey 2002).

Este novo sistema pode ser considerado uma variante do SIT, “liberação de insetos carregando um gene letal dominante” (RIDL), porque os insetos na verdade não são estéreis, mas geneticamente modificados (Thomas et al. 2000). O sistema de RIDL (do inglês “**R**elease of **I**nsects carrying a **D**ominant **L**ethal gene”) proposto simultaneamente por Thomas et al. (2000), e Heinrich & Scott (2000), consiste na integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico da fêmea, como por exemplo o promotor do gene para vitelogenina.

O centro do sistema é o tTA, uma fusão de proteínas que combinam a seqüência específica de DNA tetraciclina repressível adicionando propriedades da proteína Tn10 TetR com as propriedades de ativação transcricional eucariótica do Herpes vírus VP16. Na ausência de tetraciclina, esta proteína se ligará a seqüência tetO e ativará a transcrição de um promotor mínimo adjacente (Grether et al. 1995). Colocando-se um gene efector sobre o controle de tetO uma grande variedade de genes se tornam disponíveis. Tudo que é requerido é que eles matem a célula quando expressados (Fortini et al. 1992).

Uma forma de se tornar o sistema específico de fêmeas é se colocar a proteína tTA sob o controle de um promotor específico de fêmea (Figura 6). A proteína de tTA é então expressa apenas em fêmeas, portanto os machos sobrevivem com ou sem tetraciclina porém, as fêmeas perecem em sua ausência.

Figura 6: tTA e o sistema de expressão repressível de tetraciclina. Fonte: Alphey 2002

O sistema RIDL requer que uma linhagem do organismo alvo possua um gene, dominante, condicional, sexo-específico e letal. Onde uma condição permissiva possa ser criada em laboratório, mas não na natureza. Thomas et al. (2000), construíram um sistema RIDL em *Drosophila melanogaster* usando elementos de controle transcripcionais para direcionar a expressão da proteína de fusão tetraciclina reprimível (tTa).

Na ausência de tetraciclina, tTa expressará qualquer gene sob o controle do elemento responsivo para tetraciclina (tRe). O tTa foi primeiramente expresso sob ativador de corpo gorduroso *yp3* que leva a expressão em larvas fêmeas e adultas, porém não em machos (Thomas et al. 2000). O corpo gorduroso é um órgão essencial cujas funções incluem processamento e armazenamento de nutrientes e a síntese de componentes para o sistema imune do inseto. É esperada então, a expressão do gene citotóxico no padrão do *yp3* para ser letal a fêmeas e desta forma apenas machos sobreviveriam para ser liberados na natureza criando um sistema genético de separação sexual hereditário (Thomas et al. 2000).

Do mesmo modo, Heinrich & Scott (2000) desenvolveram um sistema específico de fêmeas, tetraciclina-repressível na mosca *Drosophila melanogaster*. Um dos componentes do sistema, que mais tarde foi denominado de RIDL, é o gene sob o controle do corpo gorduroso, e o aumento da transcrição do gene *yolk protein 1* específico de fêmeas controlado pela tetraciclina (Figura 6). Outro elemento consiste no gene pró-apoptótico *hid* sob o controle de um elemento sensível a tetraciclina. Linhagens de machos e fêmeas carregando os dois componentes são viáveis em meio suplementado com tetraciclina, mas apenas machos sobrevivem em meio normal. Uma linhagem com estas propriedades seria ideal para um programa de liberação de insetos,

que é mais efetivo quando apenas machos são liberados (Heinrich & Scott 2000).

Figura 7: O sistema letal específico de fêmeas regulado por tetraciclina. Fonte: Heinrich & Scott 2000

O RIDL possui algumas vantagens sobre o SIT, como por exemplo, os insetos seriam mais competitivos na natureza do que os produzidos por SIT. Não existe risco de radiação e soltura de animais não irradiados. Pode ser aplicado em insetos que não toleram radiação, como os mosquitos. Os insetos podem ser liberado em qualquer estágio de desenvolvimento. O RIDL não necessita de radiação e, portanto não é associada a altos custos ou danos ambientais (Alphey 2002).

Os insetos geneticamente modificados recebem uma dieta suplementada com um repressor químico (tetraciclina), que mantém o

gene letal desligado. Ao remover o repressor químico todas as fêmeas morrem restando apenas machos prontos para serem liberados na natureza. Este processo possibilita a criação em massa de insetos geneticamente modificados uma vez que com a adição do repressor químico as fêmeas sobrevivem normalmente. Esta possibilidade apresenta um grande avanço na logística de criação em massa e liberação em áreas alvo (Phuc et al. 2007).

Machos geneticamente modificados quando liberados na natureza irão cruzar com fêmeas selvagens. Tal cruzamento irá resultar em nascimentos de machos viáveis, mas de fêmeas inviáveis, uma vez que a letalidade dominante em fêmeas deve ser expressa na ausência do repressor químico usado como supressor do gene letal. Os machos não irão produzir nenhuma fêmea, e os machos que eclodirem possuirão a construção do RIDL na forma heterozigótica, e contribuirão na eliminação das fêmeas em gerações posteriores (Coleman & Alphey 2004).

2 Objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Obter linhagens de mosquitos transgênicos *Culex quinquefasciatus* carregando um gene letal dominante (**sistema RIDL**), as quais poderiam ser utilizados no controle desses mosquitos, com vistas a garantir estratégias de elevada eficiência, específica para o inseto alvo, e de mínimo impacto ambiental.

2.2 Objetivos Específicos

01 Padronizar a técnica de microinjeção para *Culex quinquefasciatus* para obtenção de uma taxa de eclosão viável aos experimentos.

02 Padronizar o procedimento entre os cruzamentos de indivíduos injetados e selvagens para *Culex quinquefasciatus*.

03 Obter linhagens de mosquitos transgênicos *Culex quinquefasciatus* carregando um gene letal dominante.

3 Material e Métodos

3.1 Colônia de Mosquitos

Neste estudo foram utilizados mosquitos de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* 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 (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 sangüínea, 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 Animais

Os camundongos adultos da linhagem Balb-C, utilizados na alimentação sangüínea dos mosquitos, são produzidos pelo biotério do ICB-II da USP. 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 Utilizadas

Foram utilizadas três construções denominadas LA513, LA882 e LA3653, descritas a seguir:

Estrutura e Função das Construções LA513 e LA882

O LA513 (Figura 8) e o LA882 (Figura 9) são construções que utilizam o transposons *piggyBac* não autônomos (Classe II).

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 transcripcional tetraciclina repressível que se encontra sobre o controle de seu próprio sitio 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.

Conseqüentemente, 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 8: Estrutura e Função dos Transposons LA513. Fonte: Phuc et al. 2007

A construção LA882 (Figura 9) é muito semelhante à LA513 (Figura 8), 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 (Phuc et al. 2007).

Figura 9: Estrutura e Função dos Transposons LA882. Fonte: Phuc et al. 2007

A construção LA3653, apresentada na Figura 10 apresenta dois promotores, um específico de olho 3xP3 e o quase onipresente Hr5IE1, e dois marcadores diferentes, o DsRed2 e o AmCyan.

3.4 Transformação e Clonagem

3.4.1 Meio de Cultura

Foram feitas placas de Meio LB-Agar para o cultivo de bactérias competentes a fim de inserir os plasmídeos. Utilizamos 500 ml de LB-Agar (para cada 20 placas), adicionamos 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 -20 °C.

3.4.2 Preparo das Células Eletro-Competentes

Células eletro competentes DH10B foram preparadas para a replicação 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 pré-aquecido em banho-maria à 37°C e o deixamos em agitação “overnight”, também a 37°C.

Foi retirado então, 5ml de meio com células competentes e colocado em um recipiente com 500ml de meio de cultura LB, que foi mantido novamente sob agitação até alcançar densidade óptica de 0,650. 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 as células competentes pronto para uso.

Para a clonagem dos plasmídeos foi adicionado 5µl de cada Plasmídeo a 100µl de células Competentes.

Para cada placa de Meio produzido previamente foi colocado: 40µl de XGAL, 4µl de IPTG, 100µl de água e 100µl da solução que foi colocada no Shaker. As placas ficaram em estufa a 37°C “overnight”.

Foram coletadas apenas colônias isoladas e colocadas individualmente em tubo Falcon de 50ml. Foi adicionado então 3ml de LB líquido e 3µl de Ampicilina. Os tubos foram colocados no agitador “overnight” a 37°C e 150 RPM.

3.4.3 Purificação dos Plasmídeos

Mini Preparação (Mini-Prep)

Foi realizada uma Mini Preparação para purificação dos plasmídeos obtidos nas transformações das bactérias. Coletamos 2,5ml de cultura das colônias mantidas “overnight” e centrifugamos a 12500 RPM, desprezando o sobrenadante. Foi adicionado 300µl de solução 1 (Glicose 2M, Tris HCl 1M pH 8) ao “pellet” de Bactérias, que foi então ressuspensado com uma ponteira. Foi acrescentado 300µl da solução 2 (SDS 1%, NaOH 200nM), misturando por inversão. Incubamos 5 minutos em temperatura ambiente.

Adicionamos 300µl da solução 3 (Acetato de Potássio 2M) e misturamos por inversão. Incubamos em gelo por 10 minutos e centrifugamos a 12500 RPM a 4°C por 15 minutos. Recuperamos o sobrenadante, transferindo-o para um novo tubo. Tratamos com RNase, adicionando 5µl de RNase (10mg/ml) e incubamos a 37°C por 30 minutos. Acrescentamos então, 600µL de clorofórmio isoamílico e misturamos por inversão. Centrifugamos a 12500 RPM a 4°C por 15 minutos. Coletamos o sobrenadante e transferimos para um novo tubo, adicionamos 600µL de

isopropanol absoluto e incubamos por 30 minutos. Centrifugamos a 12500 RPM a 4°C por 15 minutos. Descartamos o sobrenadante. Lavamos o pellet com 1000µl de ETOH a 70% e hidratamos o pellet com 50µl de T.E.

Mini Prep Qiagen

Foram selecionadas 3 amostras de cada plasmídeo, adicionamos 1µl de plasmídeo a 40µl de células competentes e deixamos sob agitação por 16 horas. A partir deste material foi feita uma Mini Prep com um kit comercial da Qiagen.

Maxi Prep Qiagen

A partir dessas duas amostras purificadas com o Kit de Mini Prep Qiagen, as amostras LA513, LA882 e Helper (Figura 11) foram novamente inoculadas em bactérias competentes e purificadas com o Kit Maxi Prep Qiagen. Obtivemos ainda uma nova construção de nosso colaborador, Dr. Luke Alphey, o LA3653 que também foi submetido a uma Maxi Prep Qiagen.

Figura 11: Gel de agarose 1,0% com as amostras obtidas pela Maxi Prep Qiagen. Coluna 1 –Marcador de Peso Molecular com 10 mil pares de base. Coluna 2 – Construção LA513, Coluna 3 – Construção LA882, Coluna 4 – Plasmídeo Helper.

3.5 Microinjeção: procedimentos

3.5.1 Solução de Injeção

A cada procedimento de micro-injeção foi feita uma solução de cada um dos plasmídeos em tampão KCl 0,1nM, NaH_2PO_4 .

Utilizamos o plasmídeo a 0,5ng/ μl , o HELPER piggyBac a 0,3ng/ μl e completamos a solução com tampão até atingir 40 μl . Este processo foi repetido em todos os lotes de injeção, utilizando sempre a concentração de 0,5ng/ μl para os plasmídeos (LA513, LA882 e LA3653) e 0,3ng/ μl para o HELPER piggyBac.

3.5.2 Preparação dos Capilares

Os capilares de quartzo, utilizados na microinjeção, foram confeccionados por estiramento no equipamento Sutter (Figura 12) 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 DNAs, por volta de 2 μ l, foi inserida nos capilares com o auxílio de uma microponteira Eppendorf (microloader).

Figura 12: Capilar de quartzo após ser confeccionado por estiramento no equipamento Sutter.

3.5.3 Padronização da Disposição dos Ovos

Foram realizados 4 experimentos distintos (em 10 réplicas) com o intuito de obter o maior número de eclosões. Partimos do princípio de que os ovos tem de permanecer úmidos ou tocando a superfície da água. Os ovos foram dispostos sempre com o pólo posterior para baixo e nunca submerso.

No primeiro experimento (Tabela 1) os ovos foram alinhados em lamínula e fixados em uma lâmina. Um papel filtro foi colocado em contato com a parte posterior dos ovos e o inserido em um tubo Falcon de 50ml disposto a 90° e com cerca de 30 ml de água com tetraciclina.

Em outro experimento (Tabela 2), o mesmo processo foi repetido sem papel filtro, colocando água até que tocasse na base dos ovos.

Foi também testado a taxa de eclosão em placas de Petri, dispondo a lâmina com a lamínula e os ovos em um ângulo de aproximadamente 45°. O procedimento foi repetido encostando o papel filtro no pólo posterior dos ovos (Tabela 3), ou colocando os ovos em contato com superfície da água (Tabela 4).

O controle foi feito com jangadas intactas dispostas diretamente na água. A água ou papel filtro fica em contato com os ovos sempre pela parte posterior. Estes experimentos foram mantidos à mesma temperatura e umidade controlada que o restante da colônia ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade)

3.5.4 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 sangüíneo em camundongos.

Quatro dias após o repasto sangüíneo, 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 (Figuras 13 e 14). Os ovos depois de alinhados foram fixados em uma lamínula com uma fita dupla-face, cobertos com óleo e levados ao microscópio óptico para a microinjeção. Esta foi realizada no aparelho Fento-Jet da Eppendorf .

Figura 13: Alinhamento dos embriões

Figura 14: Injeção no pólo posterior do embrião

3.6 Procedimentos Após as Microinjeções: tentativa de se obter uma linhagem transgênica

Após 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 30ug/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 30ug/ml e alimentadas com ração para peixe (Goldfish Colour).

Os embriões injetados com a construção LA3653 não necessitam do repressor químico (tetraciclina) em seu meio, uma vez que o plasmídeo não possui gene letal efector. 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 30ug/ml para a eclosão.

As larvas eclodidas foram mantidas até aproximadamente o estágio de L4 e então foram analisadas quanto à presença de DsRed.

3.7 Amplificação do Gene Marcador DsRed2 por meio da Reação em Cadeia da Polimerase

Foi realizado amplificação do gene marcador DsRed com os oligonucleotídeos (*primers*) :

dsRed-F 5'-GGCGCGCCATGAAGCTTGCCTCCTCCGAGA-3' e

dsRed-R 5'-AGTACTGAATTCCTAGGTTAGTGGTGGTGGTGGT-3'

Em todas as Maxi-Prep para confirmação da presença das construções nas purificações.

Além disso também foi realizado o mesmo procedimento (PCR) utilizando o DNA de extraído de mosquitos injetados, que morreram no decorrer do experimento. Estes mosquitos foram separados em 10

mosquitos por pool, macerados e submetidos a extração de DNA com o kit comercial da Invitex[®] (Invisorb Spin Tissue Kit).

Após a extração do DNA executamos a PCR, mesmo nas amostras que se mostraram negativas para a presença de DsRed.

4 Resultados e Discussão

Durante as décadas de 1950 e 1960 ocorreram, em muitas regiões endêmicas de malária, a utilização em massa de inseticidas (DDT) de forma bem organizada em domicílios e peri-domicílios contra populações de mosquitos vetores suscetíveis aos plasmódios. Esse procedimento erradicou com sucesso a malária do sul da Europa e Taiwan, reduzindo ainda casos de malária na Índia de aproximadamente 75 milhões para 105.000 ao ano. Até mesmo na África tropical, com transmissão intensa, a dedetização de casas reduziu a prevalência de malária a sua quase erradicação em áreas limitadas, como por exemplo, em Zanzibar (Curtis & Lines, 2000).

Entretanto, resultados recentes com o uso de DDT não foram tão promissores na Índia ou em Zanzibar, devido à evolução da resistência de alguns vetores a este tipo de inseticida. No sul da África, a resistência a piretróides levou ao retorno do uso de DDT em domicílios, que foi seguido de um aumento do número de casos de malária (Hargreaves et al., 2000).

Devido a este tipo de problema, outros métodos de controle devem ser considerados, como os métodos de controle genético (técnica do mosquito estéril e métodos relacionados) como opções alternativas de controle. Ao invés de confiar inteiramente no fator humano na procura de todas as casas, criadouros ou locais que necessitem de tratamento, o controle genético busca a cobertura universal por se aproveitar do comportamento altamente eficiente do macho em localizar fêmeas da mesma espécie para acasalar (Wyss, 2000)

Resistência a inseticida é irrelevante ao sucesso desse tipo de método, mas o fato de fêmeas selvagens evitarem acasalar com machos criados artificialmente ou estéreis deve ser levado em consideração. No entanto, existe a real possibilidade de que a liberação de mosquitos estéreis possa erradicar populações alvo isoladas, uma vez que com o início da supressão a densidade da população selvagem diminui

aumentando-se a taxa de mosquitos estéreis na população facilitando cada vez mais o cruzamento entre machos estéreis e fêmeas selvagens.

Existem alguns exemplos de erradicação e controle de pragas agrícolas e até mesmo de vetores de patógenos utilizando-se a técnica de liberação de mosquitos estéreis (SIT), como a erradicação da *Cochliomyia macellaria* da Flórida e por toda extensão do Texas até a Costa Rica (Wyss, 2000) e a erradicação da mosca *tsé-tsé*, vetor dos agentes da tripanosomíase do gado (doença do sono) em Zanzibar (Vreysen et al. 2000). Nos locais onde ocorre imigração contínua de fêmeas que já tenham copulado com machos selvagens, a liberação contínua de machos irradiados será necessária, uma vez que a maioria das fêmeas dípteras tende a monogamia e se recusam a copular novamente com machos estéreis após chegarem à área alvo de soltura (Parker & Mehta 2007).

No final dos anos de 1960 e início de 1970 existia grande quantidade de pesquisa sobre mosquitos estéreis. No entanto, do ponto de vista ético e de segurança, a liberação de mosquitos machos estéreis somente seria aceitável se houvesse a separação total das fêmeas e sua não liberação (Sharma et al., 1972). Os machos não realizam repasto sangüíneo, portanto não transmitem patógenos, e não são fator de incômodo como as fêmeas. Em mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* a separação pode ser feita com base no tamanho das pupas, sendo que o macho menor pode ser liberado e as fêmeas retidas (Ansari et al., 1977)

Este sistema foi utilizado na Índia e apenas 0,2% de fêmeas eram liberadas entre os machos. Porém centenas de milhares de mosquitos eram produzidos diariamente acarretando na liberação de grandes quantidades de fêmeas entre os machos impossibilitando o processo (Sharma et al., 1972).

A liberação de fêmeas entre os machos irradiados acarreta não só no aumento de fêmeas no ambiente podendo causar incômodo e transmitir doenças, como na possibilidade de cópula com machos

irradiados competindo com fêmeas selvagens e conseqüentemente prejudicando o resultado final da liberação (Myers et al., 1998).

No caso do *Anopheles*, o método mecânico de separação por tamanho de pupa não se mostra eficiente. Em seu lugar foram desenvolvidos sistemas genéticos baseados na translocação do cromossomo Y propiciando resistência a inseticidas. Este método parece encorajador, porém quando se aumenta a escala de produção como foi feito com a *Ceratitis capitata* em uma escala de milhões de moscas por dia, até mesmo as mais improváveis formas de recombinação genética podem ocorrer e causar um decaimento na perfeição da separação entre machos e fêmeas (Curtis et al., 2000).

Como foi demonstrado por McDonald et al. (1977) quando buscava introduzir machos estéreis de *Aedes aegypti* geneticamente modificados pela translocação do cromossomo Y, com o objetivo de diminuir o nível de mosquitos presentes no Litoral do Quênia. Para cada 1000 mosquitos liberados 4 não possuíam a translocação e portanto não eram estéreis. Esta taxa representa um grande empecilho na produção em massa destes mosquitos uma vez que quando se aumenta a escala de produção o número de machos saudáveis liberados é impraticável.

Lorimer et al. (1976) utilizou mosquitos *Aedes aegypti* com translocações heterozigotas duplas como forma de controle genético, e obteve um decréscimo no número de eclosões em ovos ovipostos por fêmeas coletadas durante o experimento de 93% quando copuladas com machos selvagens para eclosões entre 30 e 40 % dos ovos após a cópula com machos modificados geneticamente.

Durante a primavera de 1981 em Serra Nevada, Califórnia, aproximadamente 85 mil machos de *Culex tarsalis* irradiados foram marcados com pó fluorescente e liberados em um cânion semi-isolado e então foram monitorados por abundância e esterilidade. Os resultados foram comparados a outros dois cânions próximos com características similares. Os machos esterilizados se dispersaram de maneira satisfatória pelo cânion e representaram 30% dos machos capturados. Porém a

população apresentou apenas 11% de esterilidade e este resultado se mostrou insuficiente para suprimir ou mesmo causar algum decréscimo na população de fêmeas. Em sua maioria os machos irradiados não eram competitivos em relação aos selvagens quanto à cópula com fêmeas locais selvagens (Milby et al., 1983).

Além da dificuldade inerente de irradiar mosquitos e localizar o ponto exato de exposição à radiação que proporcione esterilidade, porém não prejudique em demasia sua competitividade e expectativa de vida. Adicionado à necessidade de uma instalação nuclear próxima a região alvo, o que aumenta a complexidade e a logística, bem como eleva os custos da operação.

A alta taxa de eclosão para os padrões atuais, a liberação de indivíduos férteis juntamente com estéreis, a dificuldade de separação entre machos e fêmeas e o alto custo criam empecilhos para utilização destes processos como forma de controle para mosquitos vetores de doenças (Alphey, 2002).

Desse modo, foi desenvolvido um novo sistema transgênico baseado no SIT, porém com princípios totalmente diferentes e que une suas melhores características a baixo custo, facilidade de produção e logística já que não utiliza radiação, hereditariedade e a capacidade de desativar a letalidade em laboratório eliminando a necessidade de se repetir todo o processo a cada geração.

O sistema RIDL proposto por Thomas et al. (2000) pode proporcionar tal sistema que consiste em um gene letal dominante associado a um promotor específico de fêmeas, como por exemplo, o promotor de vitelogenina de tal forma que a expressão do gene letal dominante possa ser desativada na presença de tetraciclina para que se possa manter a colônia. Quando for necessário separar machos e fêmeas, a tetraciclina é removida causando a morte de todas as fêmeas.

O RIDL tem sido usado com sucesso em *Drosophila melanogaster* (Thomas et al. 2000, Heinrich & Scott 2000, Alphey 2002) indicando que pode ser adaptado para mosquitos e outros vetores de doenças. Phuc et

al. (2007) adaptaram o sistema para o mosquito *Aedes aegypti* utilizando as construções LA513 e LA882, que poderão ser funcionais em *Cx. quinquefasciatus*. Nestas construções, tTAV (uma variante de tTA) esta sob controle de seu próprio sítio de ligação, o tetO, um promotor mínimo de *Drosophila hsp70*, e uma sequência terminal de *Drosophila fs(1)K1032*.

Na ausência de tetraciclina, tTAV se liga a tetO levando a expressão de mais tTAV, em um tipo de *feedback* positivo. Na presença de tetraciclina, tTAV se liga a tetraciclina, e não se liga a tetO, não levando assim a mais expressão de tTAV. Há um nível basal de expressão de tTAV na presença de tetraciclina. Altos níveis de tTAV é tóxico, e assim esta construção provém um sistema letal tetraciclina-repressível (Figura 15).

Figura 15: Estrutura e função do transgene LA513. Utilizando o elemento de transposição *piggyBac*, os mosquitos transformados são identificados pela fluorescência DsRed2. O transgene LA882 é muito similar ao LA513. A principal diferença é o uso do promotor EI-2 do baculovirus *OpNPV* para dirigir a expressão do DsRed em lugar do Act-5C (Puch et al., 2007)

Construções desse tipo estão sendo utilizadas para a obtenção de linhagens RIDL de *Culex quinquefasciatus* pelo nosso grupo. Os mosquitos transformados com esta construção poderão ser identificados pela fluorescência DsRed2. O principal objetivo deste projeto foi a obtenção de linhagens transgênicas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* pelo sistema RIDL. A liberação desses mosquitos em campo será parte de um próximo projeto, dependendo dos resultados iniciais.

Os transgenes LA513, LA882 foram utilizados para transformar bactérias *E.coli* DH5 α , para obtenção de material purificado e quantidades suficiente para as microinjeções. Utilizando o Kit comercial da Qiagen para mini-preparações (Mini Prep) obtivemos concentrações de: LA513A: 550ng/ μ l, LA513B: 300ng/ μ l, LA882A: 500ng/ μ l, LA882B: 450ng/ μ l.

Tentativas para a obtenção de linhagens transgênicas com estas construções foram frustradas (descrito a seguir) e assim, um novo plasmídeo, denominado LA3653, foi cedido pelo nosso colaborador Dr. Luke Alphey, na concentração de 3,60mg/ μ l. Este novo plasmídeo não possui gene letal nem a proteína tetraciclina-repressível a tTAV, parte central do sistema RIDL, porém possui dois promotores diferentes, o específico de olho 3xP3 e o quase onipresente Hr5IE1, e dois marcadores diferentes, o DsRed2 e o AmCyan.

Estas construções foram purificadas com o Kit Maxi Prep Qiagen para obtenção de concentrações ideais para as microinjeções. Obtivemos a concentração de: LA513: 2,85mg/ μ l, LA882: 6,05 mg/ μ l, LA3653 3,63mg/ μ l e HELPER pBac: 2,40 mg/ μ l.

Estão sendo providenciadas novas construções para uso futuro com promotor *Act4* específico de fêmeas imaturas (Muñoz et al. 2004), que provavelmente será funcional em *Culex*. Uma vez obtidas às linhagens serão caracterizadas quanto à expressão e funcionalidade dos genes letais.

4.1 Padronização da Manipulação dos Ovos

Parte crucial para o sucesso do projeto foi a adaptação do método de microinjeção de embriões para a espécie *Culex quinquefasciatus*, que possui características muito distintas das espécies do gênero *Aedes* ou *Anopheles*, pois espécies do gênero *Culex* depositam seus ovos unidos em forma de jangadas. Para que seja possível a injeção do plasmídeo no embrião, é necessário que os ovos sejam alinhados em uma lâmina, obrigando a separação os ovos unidos em forma de jangada. Não é possível recolocar os ovos em sua formação original, porém estes devem

ser mantidos em posição vertical, se colocados individualmente na água, estes ovos afundam e não se desenvolvem. Adaptamos então, a técnica descrita por Allen et al. (2001) para *Culex quinquefasciatus*, e de *Aedes aegypti* descrita por Nijole Jasinskiene (comunicação pessoal).

Desse modo, foram realizados experimentos com a finalidade de padronizarmos a manipulação dos ovos para o alinhamento e melhor taxa de eclosão dos mesmo. Nesse processo os ovos foram sujeitos a mesma manipulação que receberiam no procedimento de injeção, porém os ovos não foram injetados. Estes experimentos tiveram como finalidade descobrir a melhor disposição dos ovos, uma vez que a jangada deve ser destruída para a separação e alinhamentos dos ovos, que não flutuam por si só.

Os resultados mostram que quando os ovos manipulados ficaram em contato direto com a superfície da água, a maioria não se desenvolve ou não há eclosões, mostrando taxas de eclosão muito baixas (3,4% e 1,9%) (Tabelas 2, 3).

Além disso, concluiu-se que os ovos devem ser dispostos a 90° e com papel filtro umedecido em contato com a fileira de ovos alinhados, desse modo, foi obtido uma taxa de eclosão significativamente maior (taxa de eclosão – 56,3%), e com um número razoável de eclosões para realização dos experimentos (Tabela 1).

Os resultados dos experimentos em placa de petri a 45° e com papel filtro em contato com a fileira alinhada de ovos (Tabela 4), também não apresentaram uma taxa de eclosão suficiente para a realização dos trabalhos (9,1%).

Tabela 1. Manipulação das jangadas de ovos de *Culex quinquefasciatus* colocados para eclosão em Tubo Falcon a 90° com os ovos alinhados e em contato com papel filtro umedecido.

Tubo Falcon + papel filtro	Ovos	Eclosões
controle	98	95
tubo 01	52	30
tubo 02	46	26
tubo 03	72	60
tubo 04	36	15
tubo 05	54	20
tubo 06	65	36
tubo 07	62	42
tubo 08	45	20
tubo 09	50	31
tubo 10	54	22
TOTAL	536	302 (56,3%)

Tabela 2. Manipulação das jangadas de ovos de *Culex quinquefasciatus* colocados para eclosão em Tubo Falcon com os ovos alinhados em contato direto com a superfície da água.

Tubo Falcon - ovos tocando a superfície da água	Ovos	Eclosões
controle	78	76
tubo 01	48	2
tubo 02	62	3
tubo 03	34	1
tubo 04	45	0
tubo 05	46	0
tubo 06	52	2
tubo 07	53	3
tubo 08	60	4
tubo 09	32	0
tubo 10	41	1
TOTAL	473	16 (3,4%)

Tabela 3. Manipulação das jangadas de ovos de *Culex quinquefasciatus* colocados para eclosão em placas de petri - ovos alinhados dispostos a 45° em contato direto com a superfície da água.

Placa de Petri - ovos a 45° em contato com a superfície da água	Ovos	Eclosões
controle	87	83
Placa 01	35	1
Placa 02	38	0
Placa 03	52	0
Placa 04	56	2
Placa 05	61	1
Placa 06	29	0
Placa 07	35	0
Placa 08	62	2
Placa 09	41	3
Placa 10	49	0
TOTAL	458	9 (1,9%)

Tabela 4. Manipulação das jangadas de ovos de *Culex quinquefasciatus* colocados para eclosão em placas de petri - ovos alinhados, dispostos a 45° em contato com papel filtro umedecido

Placa de Petri - ovos a 45° com papel filtro umedecido	Ovos	Eclosões
controle	112	105
Placa 01	54	10
Placa 02	65	12
Placa 03	53	6
Placa 04	52	4
Placa 05	45	2
Placa 06	51	0
Placa 07	42	5
Placa 08	62	7
Placa 09	52	1
Placa 10	36	0
TOTAL	512	47 (9,1%)

4.2 Microinjeções

Conforme os resultados obtidos na padronização da manipulação dos ovos (jangadas) para uma melhor taxa de eclosão dos mesmos, as microinjeções foram iniciadas dispondo os ovos para eclosão conforme descrito no experimento mostrado na Tabela 1.

Os ovos injetados devem, portanto, ser sempre mantidos a 90° e constantemente em contato com papel de filtro úmido. Desse modo, as larvas eclodidas podem cair na água mantida no tubo e continuar o desenvolvimento normal.

4.2.1 Microinjeções com a Construção LA882

Os experimentos foram iniciados com uma solução de microinjeção com a construção LA882 (Figura 8).

Nesse caso, os experimentos de microinjeção foram divididos em grupos lotes distintos e cada tubo Falcon (50 ml) recebeu uma numeração individual. As larvas obtidas foram removidas e colocadas em potes com 1 litro de água com tetraciclina na concentração de 30ug/ml mantendo a numeração original.

Neste primeiro experimento, foram injetados um total de 908 ovos sendo que eclodiram apenas 131 larvas, das quais 53 chegaram ao estágio de pupa e apenas 30 mosquitos chegaram a fase adulta, sendo 20 machos e 10 fêmeas. Os resultados estão resumidos no Quadro 1.

As pupas foram separadas individualmente, e para cada macho que emergia eram adicionadas 10 fêmeas selvagens virgens em uma pequena gaiola para acasalamento. Para cada fêmea que emergia eram adicionados 3 machos selvagens.

Após 3 dias, necessários para que ocorresse os cruzamentos, foi oferecido aos mosquitos camundongos anestesiados para realização de respasto sanguíneo. A oviposição (geração G1) ocorria geralmente após 3 ou 4 dias. Estes ovos eram então acompanhados até a eclosão das larvas, que eram colocadas em potes separados e observadas no

estadio de L4 em uma lupa adaptada com filtros para verificação da presença da fluorescência da proteína DsRed.

Para esta construção (LA882) foram analisadas para a presença de DsRed2, aproximadamente 7000 larvas (G1) provenientes dos cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens (G0). Entretanto, nenhuma larva foi positiva para a presença da proteína fluorescente. Os resultados detalhados dos experimentos e dos cruzamentos entre injetados e selvagens estão no Anexo 1.

Devido a um problema na manutenção da temperatura e umidade do insetário parte do experimento sofreu uma redução drástica na taxa de eclosão, porém não condiz com os resultados observados previamente, nos experimentos de padronização da manipulação dos ovos.

Algumas microinjeções de embriões também foram realizadas com um transgene que expressa apenas EGFP (sob controle de promotor de olho), com o objetivo de obter linhagens transgênicas controles. No entanto, nenhuma linhagem transgênica foi obtida (dados não mostrados).

Quadro 1. Resumo dos resultados obtidos nas microinjeções de embriões de *Culex quinquefasciatus* com o transgene LA882. Total de ovos injetados, de eclosões, de adultos obtidos e de larvas G1

TOTAL DE OVOS INJETADOS	908	TOTAL DE MACHOS ADULTOS	20
TOTAL DE LARVAS	131	TOTAL DE FÊMEAS ADULTAS	10
TOTAL DE PUPAS	53	TOTAL DE LARVAS G1 ANALISADAS	7000

4.2.2 Microinjeções com a Construção LA513

No segundo grupo de injeções foi utilizado o plasmídeo LA513 (Figura 8), cuja construção é similar ao LA882. O mesmo procedimento foi realizado: os ovos foram dispostos em uma lamínula que posteriormente foi fixada a uma lâmina em contato com papel filtro umedecido e colocada em um tubo Falcon (50 ml) com água. Neste lote todas as larvas obtidas dos embriões injetados foram divididas em duas bacias com 1 litro de água com tetraciclina. No total foram injetados 807 ovos, sendo que eclodiram apenas 92 larvas, das quais 81 passaram ao estágio de pupa e 64 mosquitos alcançaram a fase adulta, sendo 23 machos e 41 fêmeas. Os resultados estão resumidos no Quadro 2.

As pupas foram separadas individualmente e após sua eclosão, cada macho injetado foi colocado em um copo com 10 fêmeas selvagens virgens. Foi observado que no Lote 01 as fêmeas não copularam de modo satisfatório quando colocadas individualmente com 3 machos. E então, para este segundo lote de experimentos foi feito um *pool* de 10 fêmeas injetadas com 10 machos selvagens, obtendo resultados significativamente melhores.

Para esta construção (LA513) foram analisadas para a presença de DsRed2, em aproximadamente 7750 larvas (G1) provenientes dos cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens, porém, nenhuma larva foi positiva para a presença da proteína fluorescente (detalhes no Anexo 2).

Quadro 2. Resumo dos resultados obtidos nas microinjeções de embriões de *Culex quinquefasciatus* com o transgene LA513. Total de ovos injetados, de eclosões, de adultos obtidos e de larvas G1

TOTAL DE OVOS INJETADOS	807	TOTAL DE MACHOS ADULTOS	23
TOTAL DE LARVAS	92	TOTAL DE FÊMEAS ADULTAS	41
TOTAL DE PUPAS	81	TOTAL DE LARVAS G1 ANALISADAS	7750

4.2.3 Microinjeções com a Construção LA3563

Foram realizados, então, mais três lotes de microinjeções com o terceiro plasmídeo fornecido por nosso colaborador Dr. Luke Alphey (LA3563). Neste caso, apesar de um número similar de embriões ter sido injetado, foi obtido uma taxa de eclosão muito maior, com maior sobrevivência dos embriões até a fase adulta. Concluiu-se que a ausência do gene letal (proteína tTAV) no plasmídeo, que é tóxico para o embrião, adicionada à ausência de tetraciclina na água foi fator determinante para este fenômeno.

Novamente as larvas obtidas foram dispostas em bacias com água e posteriormente as pupas separadas individualmente. Cruzamos cada macho com 10 fêmeas e devido aos bons resultados obtidos com as fêmeas no lote anterior, foram feitos novamente pools de 10 fêmeas injetadas com 10 machos selvagens, mantido para cópula durante 5 dias.

Devido às condições laboratoriais, tais como espaço e dificuldade de propiciar um repasto sanguíneo adequado aos mosquitos, foi definido que seria possível mantê-lo todos juntos em uma mesma gaiola, já que os indivíduos injetados não copulariam entre si novamente, pois já haviam copulado previamente com indivíduos selvagens virgens. Passou-se, então, a adotar este método e caso fossem observadas larvas transgênicas, trataríamos cada indivíduo como uma linhagem separada. Ao unirmos os mosquitos em uma gaiola percebemos uma melhoria no número de oviposições além da facilidade de manuseio e economia de material.

Para o primeiro lote de injeções (Quadro 3), com a construção LA3653, foram analisadas para a presença de DsRed2, aproximadamente 16700 larvas (G1) provenientes dos cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens, porém nenhuma larva foi positiva para a presença da proteína fluorescente (detalhes no Anexo 3).

Quadro 3. Resumo dos resultados obtidos nas microinjeções de embriões de *Culex quinquefasciatus* com o transgene LA3653 (Lote 3). Total de ovos injetados, de eclosões, de adultos obtidos e de larvas G1

TOTAL DE OVOS INJETADOS	727	TOTAL DE MACHOS ADULTOS	59
TOTAL DE LARVAS	123	TOTAL DE FÊMEAS ADULTAS	48
TOTAL DE PUPAS	114	TOTAL DE LARVAS G1 ANALISADAS	16700

Foram realizados ainda mais dois lotes de microinjeções com o mesmo plasmídeo, Para o Lote 4 (Quadro 4) e 5 (Quadro 5) utilizamos novamente a construção LA3653 e utilizamos a mesma metodologia do Lote 3. Foram analisadas para a presença de DsRed2, aproximadamente 32000 larvas do Lote 4 (Anexo 4) e 12250 larvas do Lote 5 (Anexo 5), provenientes dos cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens, porém nenhuma larva foi positiva para a presença da proteína fluorescente.

Devido a problemas com a temperatura da sala de injeção o Lote 5 foi prejudicado e sua taxa de eclosão não deve ser tomada como parâmetro.

Quadro 4. Resumo dos resultados obtidos nas microinjeções de embriões de *Culex quinquefasciatus* com o transgene LA3653 (Lote 04). Total de ovos injetados, de eclosões, de adultos obtidos e de larvas G1.

TOTAL DE OVOS INJETADOS	833	TOTAL DE MACHOS ADULTOS	55
TOTAL DE LARVAS	115	TOTAL DE FÊMEAS ADULTAS	52
TOTAL DE PUPAS	109	TOTAL DE LARVAS G1 ANALISADAS	32000

Quadro 5. Resumo dos resultados obtidos nas microinjeções de embriões de *Culex quinquefasciatus* com o transgene LA3653 (Lote 5). Total de ovos injetados, de eclosões, de adultos obtidos e de larvas G1.

TOTAL DE OVOS INJETADOS	892	TOTAL DE MACHOS ADULTOS	14
TOTAL DE LARVAS	54	TOTAL DE FÊMEAS ADULTAS	13
TOTAL DE PUPAS	33	TOTAL DE LARVAS G1 ANALISADAS	12750

4.3 Reação de Amplificação do Marcador DsRed2

Para nos assegurarmos sobre a estabilidade dos plasmídeos, após a reação de Maxi Prep, realizamos uma reação de amplificação (PCR) com todas as construções disponíveis para a presença do gene DsRed2. Observamos a presença de bandas exatamente no respectivo tamanho para cada plasmídeo podendo visualizar a diferença de tamanho entre eles.

Figura 16: Gel de agarose contendo amostras dos plasmídeos utilizados para transformação de *Culex quinquefasciatus*, LA513A, LA513B, LA513C, LA882A, LA882B, LA882C e LA3653, amplificados para a presença do gene DsRed2. O peso molecular utilizado possui 10 mil pares de base

4.4 Conclusões

Objetivo 01

Conseguiu-se através de experimentos a obtenção de uma taxa de eclosão viável a fim de suprir as necessidades requeridas para obtenção de uma linhagem transgênica.

Objetivo 02

Foi padronizado o procedimento para cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens com resultados satisfatórios.

Objetivo 03

Não obtivemos transgenia em indivíduos injetados.

4.5 Considerações finais

De acordo com o Dr. Luke Alphey, os transgenes LA882 e LA513 são de difícil integração ao genoma dos mosquitos e um número muito maior de ovos deveriam ter sido injetados para a obtenção de um maior número de adultos e a possibilidade de sucesso na obtenção de um linhagem transgênica (comunicação pessoal). Obtivemos apenas 30 adultos após injeção de mais de 900 ovos em nosso primeiro lote (construção LA882). Segundo o Dr. Alphey, para a obtenção de apenas uma família de *Aedes aegypti* com a mesma construção foram injetados cerca de 30.000 embriões.

Com as dificuldades na padronização e relativa baixa taxa de eclosão dos ovos de *Culex* quando comparados com os de *Aedes aegypti*, devido a manipulação demasiada dos ovos, pela impossibilidade de ressecá-los para facilitar a penetração da agulha e a dificuldade de dispor os ovos de forma que possam eclodir após o alinhamento, uma vez que a jangada não pode ser refeita, refletindo diretamente na quantidade de adultos obtidos e na complexa logística que envolve a injeção e seus passos subsequentes tornando por várias razões como falta de espaço físico no insetário, grande carga de trabalho durante a montagem e análise do lote e falta de tempo hábil, tornam inviável o número de embriões necessários para alcançar o sucesso na transgenia. A produção de embriões injetados, por fim, se restringe ao espaço disponível para embriões injetados e seus respectivos selvagens.

O sucesso de nossos colegas na obtenção de mosquitos transgênicos se deve também ao fato de que possuem grande infraestrutura laboratorial possibilitando a injeção de embriões em larga escala. Nosso colaborador Dr. Luke Alphey, para a obtenção do *Aedes aegypti* transgênico com o plasmídeo LA882, injetou mais de 30 mil ovos. Este número seria impossível para se alcançar nas condições atuais do espaço do insetário e com o tempo disponível durante este projeto.

As microinjeções foram continuadas com uma nova construção similar ao plasmídeo LA882, o LA513. Esta construção foi utilizada com sucesso na transgenia de mosquitos *Aedes aegypti* e assim como o LA882 possui um gene letal e marcador fluorescente DsRed2. O procedimento deste lote foi exatamente igual ao anterior, sendo que a única mudança foi a não separação das larvas injetadas em lotes, mas matando-as juntas e as separando posteriormente na fase de pupa. Este segundo lote apresentou as mesmas dificuldades do primeiro, porém com uma taxa de eclosão ligeiramente melhor.

Passamos então a utilizar uma nova construção, a LA3653, que tem a característica de não necessitar do repressor químico uma vez que não possui gene letal e a proteína tetraciclina-repressível (tTAV), mas apenas os marcadores fluorescentes. Ao recebermos este novo plasmídeo demos preferência por sua injeção já que por não possuir gene letal é significativamente menos tóxico para os embriões e deve conseqüentemente ser de mais fácil integração, além de não necessitar do repressor químico tetraciclina. Assim como os demais plasmídeos, o LA3653 possui marcador DsRed2 ligado a um promotor de actina. Neste caso, após as microinjeções, obteve-se uma maior taxa de sobrevivência com um número maior de larvas G1 analisadas, levando a conclusão que a obtenção de uma linhagem com esta construção pode ser obtida com tempo maior de trabalho, mesmo com o espaço inferior ao ideal. A questão de espaço influi diretamente no número possível de embriões a serem injetados, levando-se em conta que para cada embrião injetado necessita-se de indivíduos selvagens para a realização dos cruzamentos.

Como a inserção do plasmídeo no genoma do mosquito é uma questão de probabilidade podemos aferir que como o espaço disponível foi fator limitante para nossa produção, precisaríamos dispor de mais tempo para obtenção de linhagens transgênicas. Porém sua viabilidade é clara e novos procedimentos estão sendo adaptados para nossa realidade podendo suprimir este empecilho em projetos futuros.

O potencial real desta nova técnica para controle em campo ainda é desconhecido, porém as inúmeras vantagens sobre outras técnicas de controle de vetores como facilidade de manutenção da colônia e separação entre machos e fêmeas, baixo custo de produção e alta eficácia poderá credenciá-lo futuramente como importante ferramenta do manejo integrado para controle de insetos de interesse médico e pragas agrícolas.

5 Referências Bibliográficas

- [SMA] São Paulo. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. Coordenadoria de Planejamento Ambiental. Informações básicas para o planejamento ambiental. SMA 2002.
- Allen ML, Christensen BM. Flight muscle-specific expression of act88f: GFP in transgenic *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera; Culicidae). **Parasitol Int.** 2004; 53: 307-314.
- Allen ML, O'Brochta DA, Atkinson PW, Levesque CS. Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** 2001; 38(5): 701-710.
- Alphey L, Andreasen M. Dominant lethality and insect population control. **Mol Biochem Parasitol.** 2002; 121: 173- 178.
- Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochem Mol Biol.** 2002; 32: 1243–1247.
- Andrade CFS. Avaliação da sensibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* say a inseticidas químicos de contato. **Rev. Saude Publica.** 1990; 24(4): 259-264.
- Ansari MA, Singh KR, Brooks GD, Malhotra PR. A device for separation of pupae from larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** 1977 25; 14(2): 241-3.

- Atkinson MP, Su Z, Alphey N, Alphey L, Coleman PG, Wein LM. Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2007; 104(22): 9540–9545.
- Atkinson PW, Michel K. What's Buzzing? Mosquito Genomics and Transgenic Mosquitoes. **Genesis**. 2002; 32: 42–48.
- Axtell RC, Arends JJ. Ecology and Management of Arthropod Pests of Poultry. 1979. **Annu Rev Entomol**. 1990; 35:101-126. .
- 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, Andrigueti MTM. Captura de culicídeos em área urbana: avaliação do método das caixas de repouso. **Rev Saude Publica**. 2007; 41(3): 375-82.
- Baumann P, Clark MA, Baumann L, Broadwell AH. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiol Rev**. 1991; 55(3): 425-436.
- Behura SK. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Mol Ecol**. 2006; 15: 3087–3113.
- Benchimol JL .Adolpho Lutz: um esboço biográfico: História, Ciências, Saúde. **Manguinhos**. 2003; 10(1): 13-83

- Benedict MQ, Robinson AS. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends Parasitol.** 2003; 8(19): 349-355.
- Berghammer A, Bucher G, Maderspacher F, Klingler M. A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle *Tribolium castaneum*. **Dev Genes Evol.** 1999; 209(6): 382-389.
- Bermúdez SE, Espinosa JD, Cielo AB, Clavel F, Subía J, Barrios S, Medianero E. Incidence of myiasis in Panama during the eradication of *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel 1858, Diptera: Calliphoridae)(2002-2005). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102(6): 675-679.
- Besansky NJ, Collins FH. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol Today.** 1992; 8(6):186-192.
- Blandford S, Chan BH, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB. Fungal pathogen reduces potential of malaria transmission. **Science.** 2005; 308(5728): 1638-1641
- Boake CR, Shelly TE, Kaneshiro KY. Sexual selection in relation to pest-management strategies. **Annu Rev Entomol.** 1996; 41: 211-29.
- Boëte C, Koella JC. A theoretical approach to predicting the success of genetic manipulation of malaria mosquitoes in malaria control. **Malar J.** 2002; 1:3.
- Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O, Barata JMS. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. **Rev. Saude Publica.** 1997; 31(2): 182-183.

- Bushland RC, Lindquist AW, Knippling EF. Eradication of Screw-Worms through Release of Sterilized Males. **Science**. 1955; 122(3163): 287-288.
- Campos J, Andrade CFS. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Rev Saude Publica** 2003; 37(4):523-527.
- Cardoso JC, Corseuil E, Barata JMS. Culicinae (Diptera, Culicidae) ocorrentes no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras Entomol**. 2005; 49(2): 275-287.
- Catteruccia F, Nolan T, Blass C, Muller HM, Crisanti A, Kafatos FC, Loukeris TG. Toward Anopheles transformation: Minos element activity in anopheline cells and embryos. **Proc. Natl. Acad. USA**. 2000a; 97: 2157-2162
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. **Nature**. 2000b; 405: 959-962
- Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley RG. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. **Nat Biotechnol**. 1996; 14: 606-609
- Claro LBL, Tomassini HBC, Rosa MLG. Dengue prevention and Control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices. **Cad. Saúde Pública**. 2004, 20(6): Disponível on

line:www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010
2311X2004000600002&lng=en&nrm=iso&tlng=en

Coleman PG, Alphey L. Genetic control of vector populations: an imminent prospect. **Trop Med Int Health**. 2004; 9: 433–437.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Índice de qualidade das águas**. [on line]. **Disponível em** <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/ugrhis/u06.asp>

Cuba LM. Situação atual do controle biológico no manejo integrado de mosquitos (Diptera: Culicidae). Apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia para obtenção do grau de Mestre. São Paulo; s.n; 2005. 91 p.

Curtis CF, Lines JD. Should DDT be banned by international treaty?. **Parasitol Today**. 2000; 16(3):119-121

Curtis CF. A possible genetic method for the control of insect pests, with special reference to tsetse flies. **Bull Entomol Res**. 1968; 57(4):509-23

Dafa'alla TH, Condon GC, Condon KC, Phillips CE, Morrison NI, Jin L, Epton MJ, Fu G, Alphey L. Transposon-free insertions for insect genetic engineering. **Nat Biotechnol**. [on line]. 2006; Disponível em <<http://www.nature.com/nbt/journal/v24/n7/abs/nbt1221.html;jsessionid=E9778B506E7551B9E58FCAF4E4D232E2>>

De Koning-Ward TF, Thomas AW, Waters AP, Janse CJ. Stable expression of green fluorescent protein in blood and mosquito stages of *Plasmodium berghei*. **Mol. Biochem. Parasitol**. 1998; 97: 247-252

- 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.
- Dhillon MK, Singh R, NareshJS Sharma HC. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. **J Insect Sci**. 2005; 5(40): available online: insectscience.org/5.40
- Dorta DM, Vasuki V, Rajavel A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. **Rev Saude Publica**. 1993; 27(6): 391-397.
- Endrichs JH, Obinson ASR, Ayol JPC, Nkerlin WE. Medfly \sreawide Sterile Insect Technique Programmes For Prevention, Suppression or Eradication: The Importance of Mating Behavior Studies. **Florida Entomologist**. 2002; 85(1): 1-13.
- Federici BA, Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ. Recombinant bacteria for mosquito control. **J Exp Biol**. 2003; 206: 3877-3885
- 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(2): 293-300.
- Forattini OP. Espécie 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.

- Fraser MJ, Smith GE, Summers MD. Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Viruses. **J Virol.** 1983; 47(2): 287-300.
- Fu G, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa'alla TH, Alphey L. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nat Biotechnol.** 2007; 25(3).
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Controle biológico e manejo ambiental. Brasília (DF). 2001; 65
- 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(1): 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.
- Grossman GL, Rafferty CS, Fraser MJ, Benedict MQ. The piggyBac element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem Mol Biol.** 2000; 30(10): 909-914.

- Handler AM, Harrell RA. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. **Insect Mol Biol.** 1999; 8(4): 449-457.
- Handler AM, Harrell RA. Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. **Insect Biochem Mol Biol.** 2001; 31(2): 199-205.
- Handler AM, McCombs SD, Fraser MJ, Saul SH. The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998; 95(13): 7520-7525.
- Handler AM, McCombs SD. The piggyBac transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. **Insect Mol Biol.** 2000; (6): 605-612.
- Handler AM. Prospects for using genetic transformation for improved SIT and new biocontrol methods. **Genetica.** 2002; 116: 137–149.
- Handler AM. Understanding and improving transgene stability and expression in insects for SIT and conditional lethal release programs. **Insect Biochem Mol Biol.** 2004; 34: 121–130.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. **Med Vet Entomol.** 2000; 14(2):181-189.

- Hediger M, Niessen M, Wimmer EA, Dübendorfer A, Bopp D. Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon piggyBac. **Insect Mol Biol.** 2001; 10(2): 113-119.
- Heinrich JC, Scott MJ. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect suitable for a sterile-release program. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2000; 97(15): 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; 5(41).
- Hiscox A, Epton MJ, Fu G, Scaife S, Hiscox A, Condon KC, Condon GC, Morrison NI, Kelly DW, Dafa'alla T, Coleman PG, Alphey L. A Dominant Lethal Gene System for Autocidal Control of the Mediterranean FruitFly. **Nat Biotechnol.** 2005; 23(4).
- Hood-Nowotny R, Mayr L, Knols BGJ. Use of carbon-13 as a population marker for *Anopheles arabiensis* in a sterile insect technique (SIT) context. **Malar J.** 2006; 5(6).
- Horn C, Wimmer EA. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. **Nat Biotechnol.** 2003; 21: 64-70.
- Horn C, Wimmer EA. A versatile vector set for animal transgenesis. **Dev. Genes Evol.** 2000; 210: 630-637
- 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(4): 653-660.

- 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
- Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Raffarty 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. USA**. 1998; 95: 3743-3747
- 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(6): 1072–1078.
- Kadekoppala JM, Kline K, Akompong T, Haldar K. Stable expression of a new Chimeric fluorescent reporter in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun**. 2000; 68: 2328-2332
- 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.
- Koyama J, Kakinohana H, Miyatake T. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: Importance of Behavior, Ecology, Genetics, and Evolution. **Annu Rev Entomol**. 2004; 49: 331-349.

- 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
- Laporta GZ, Urbinatti PR, Natal D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. **Rev Bras Entomol**. 2006; 50(1): 125-127.
- Li F, Patra KP, Vinetz JM. An Anti-Chitinase Malaria Transmission–Blocking Single-Chain Antibody as an Effector Molecule for Creating a *Plasmodium falciparum*–Refractory Mosquito. **J Infect Dis**. 2005; 192: 878–87,
- Lobo N, Li X, Hua-Van A, Fraser Jr MJ. Mobility of the piggyBac Transposon in Embryos of the vectors of Dengue fever (*Aedes albopictus*) and La Crosse encephalitis (*Ae. Triseriatus*). **Mol Genet Genomics**. 2001; 265: 66-71.
- Lobo NF, Clayton JR, Fraser MJ, Kafatos F, Collins FH. High efficiency germ-line transformation of mosquitoes. **Nat Protoc**. 2006; 1(3): 1312-1317.
- Lobo NF, Hua-Van A, Li X, Nolen BM, Fraser Jr MJ. Germ line transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, mediated by transpositional insertion of a *piggyBac* vector. **Insect Mol Biol**. 2002; 11(2): 133–139.

- Lorimer N, Lounibos LP, Petersen JL. Field trials with a translocation homozygote in *Aedes aegypti* for population replacement. **J Econ Entomol.** 1976; 69(3):405-409.
- Luna EJA, Pereira LE, Souza RP. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia?. **Epidemiol Serv Saúde.** 2003; 12(1): 7-19.
- Lycett GJ, Kafatos FC, Loukeris TG. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-on and Tet-off systems. **Genetics.** 2004; 167:1781-1790.
- Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2007; 104(13): 5580–5583.
- Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. Mosquito Transgenesis: what is the fitness cost?. **Trends Parasitol.** 2006; 22(5): 197-202.
- Mayer DG, Atzeni MG, Stuart MA, Anaman KA, Butler DG. Mating competitiveness of irradiated flies for screwworm fly eradication campaigns. **Preventive Veterinary Medicine.** 1998; 36: 1-9.
- McDonald PT. Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) in villages on the Kenya coast. II. Dispersal within and between villages. **J Med Entomol.** 1977; 14(1): 49-53.

- 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(1): 117-124.
- Meats A, Maheswaran P, Frommer M, Sved J. Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation. **Genetica**. 2002; 116: 97–106.
- Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annu Rev Entomol**. 1992; 37: **349–76**.
- Milby MM, Reisen WK, Reeves WC. Intercanyon movement of marked *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**. 1983; 20(2): 193-198.
- 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; 247(4816): 779-781
- Ministério da Saúde. Oswaldo Cruz. [on line]. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=114&sid=6>
- 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; 30(3): 413-418.

- 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(3): 413-418.
- 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 USA.** 2000; 97(20): 10895–10898.
- 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(43): 40839-40843.
- Moreira LA, Wang J, Collins FH, Jacobs-Lorena M. Fitness of Anopheline Mosquitoes Expressing Transgenes That Inhibit Plasmodium Development. **Genetics.** 2004; 166: 1337–1341.
- Morris AC, Egglestone P, Crampton JM. Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. **Med. Vet. Entomol.** 1989; 3(1): 1-7
- Muñoz D, Jimenez A, Marinotti O, James AA. The *AeAct-4* gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes aegypti*. **Insect Mol Biol.** 2004; 13(5): 563–568.
- Murgel S, Branco S. Ecológica. Uma abordagem integrada dos problemas do meio ambiente. **Rev Saude Publica.** 1990; 24(1): 84-90

- 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
- Nimmo DD, Alphey L, Meredith JM, Eggleston P. High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito Genome. **Insect Mol Biol.** 2006; 15(2): 129–136.
- O'Brochta DA, Sethuraman N, Wilson R, Hice R, Pinkerton H, Levesque AC, Bideshi DK, Jasinskiene N, Coates CJ, James AA, Lehane MJ, Atkinson PW. Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. **J. Exp. Biol.** 2003; 206: 3823-3834.
- Parker A, Mehta K. Sterile Insect Technique: a Model for Dose Optimization for Improved Sterile Insect Quality. **Florida Entomologist.** 2007; 90(1): 88–95
- Peloquin JJ, Thibault ST, Staten R, Miller TA. Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: gelechiidae) mediated by the piggyBac transposable element. **Insect Mol Biol.** 2000; 9(3): 323-333.
- Perera OP, Harrell II RA, Handler AM. Germ-line transformation of the South American malaria vector, *Anopheles albimanus*, with a piggyBac/EGFP transposon vector is routine and highly efficient. **Insect Mol Biol.** 2002; 11(4): 291-297.
- Phuc HK, Andreasen 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; 5(11).
- Pilon AF. Twenty steps for developing a healthy cities project. World Health Organization. Regional Office for Europe. Copenhagen, 1992.
- Rev Saude Publica.** 1993; 27(4): 308-310.
- 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
- Porter AG, Davidson EW, Liu JW. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. **Microbiol Rev.** 1993; 57(4): 838-861
- 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(5):1547-1553.
- Robinson A. Genetic sexing methods in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Elsevier.** 1989; 57–65.
- Robinson AS, Franz G, Atkinson PW. Insect transgenesis and its potencial role in agriculture and human health. **Insect Biochem Mol Biol.** 2004; 34: 113-120.
- Robinson AS. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis 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(7): 755-757.

Sanjad N. Da abominável profissão de vampiros: Emílio Goeldi e Os mosquitos no Pará (1905). **Manguinhos.** 2003; vol. 10(1): 85-111

São Paulo 450 anos. OS RIOS E SEUS AFLUENTES. [on line]. Disponível em http://www.aprenda450anos.com.br/450anos/vila_metropole/1-5_rio_pinheiros.asp

Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Os Rios Que Fazem Nossa História. [on line]. Disponível em <<http://www.ambiente.sp.gov.br/pomar2/osrios.htm>>

Sethuramana N, Fraser Jr. MJ, Egglestonc P, O'Brochta DA. Post-integration stability of *piggyBac* in *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol.** 2007; 37: 941–951.

Sharma VP, Patterson RS, Ford HR. A device for the rapid separation of male and female mosquito pupae. **Bull World Health Organ.** 1972; 47(3):429-432.

Shearman DC. The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. **Genetica.** 2002; 116(1):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(4): 370-372.
- Simberloff D. Eradication—preventing invasions at the outset. **Weed Science.** 2003; 51: 247–253.
- Sirivanakarn S, White GB. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera:Culicidae). **Proc. Entomol. Soc Washington.** 1978; 80(3): 360-372.
- Taípe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana Preservada e suas Implicações Epidemiológicas. **Rev Saude Publica.** 2003; 37(3): 275-9.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. **Nat Biotechnol.** 2000; 18(1):81-84.
- Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. **Cad. Saúde Pública.** 2005; 21(5): 1307-1315.

Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey L. Insect Population Control Using a Dominant, Repressible, Lethal genetic Sistem. **Science**. 2000; 287(5462): 2474-2476.

Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA, Feldmann HU. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. **J Econ Entomol**. 2000; 93(1):123-135.

Wyss JH. Screwworm eradication in the Americas. **Ann N Y Acad Sci**. 2000; 916: 186-193.

Anexos

Anexo 1

Lote 1: Embriões injetados e posterior desenvolvimento

LÂMINAS	OVOS	FÊMEAS	Larvas G0
Controle	76	X	
Grupo 1			
1	36	0	
2	41	0	
3	64	0	
4	85	1	
TOTAL	226	1	350
Grupo 2			
5	29	2	
6	45	2	
7	47	3	
TOTAL	121	7	5900
Grupo 3			
8	54		
9	54	0	
10	50	0	
TOTAL	158	0	250
Grupo 4			
11	44	0	
12	48	0	
13	36	1	
14	64	0	
15	60	1	
16	75	0	
TOTAL	327	2	500

Cruzamentos entre fêmeas injetadas e machos selvagens,
e número de larvas G1 obtidas

FÊMEAS		LARVAS
1	10F + 15M	750

Cruzamentos entre machos injetados e fêmeas selvagens,
e número de larvas G1 obtidas.

	MACHOS	FÊMEAS SELVAGENS	POOL	LARVAS
GRUPO	1	10F	1	950
GRUPO	2	10F		
GRUPO	3	10F		
GRUPO	4	10F	2	900
GRUPO	5	10F		
GRUPO	6	10F		
GRUPO	7	10F	3	800
GRUPO	8	10F		
GRUPO	9	10F		
GRUPO	10	10F	4	1050
GRUPO	11	10F		
GRUPO	12	10F		
GRUPO	13	10F	5	700
GRUPO	14	10F		
GRUPO	15	10F		
GRUPO	16	10F	6	1150
GRUPO	17	10F		
GRUPO	18	10F		
GRUPO	19	10F	7	700
GRUPO	20	10F		

Anexo 2

Lote 2: Embriões injetados e posterior desenvolvimento

OVOS	LARVAS	PUPAS	MACHOS	FÊMEAS
61	x	x	x	x
79	x	x	x	x
86	7	7	2	2
41				
76	x	x	x	x
64	2	1	X	1
49	8	5	2	3
104	2	2	X	1
74	2	1	X	1
63	71	65	19	33
88				
91				
71				

Cruzamentos entre pool de fêmeas injetadas e machos selvagens, e número de larvas G1 obtidas

	POOL DE FÊMEAS		REPASTO	OVIPOSIÇÃO	LARVAS
GRUPO	1	10F + 15M	2	1	0
GRUPO	2	10F + 15M	2	1	0
GRUPO	3	10F + 15M	2	1	0
GRUPO	4	11F + 15M	2	2	300

Cruzamentos entre machos injetados e fêmeas selvagens,
e número de larvas G1 obtidas.

	MACHOS	FÊMEAS SELVAGENS	POOL	REPASTO	OVIPOSIÇÃO	LARVAS
GRUPO	1	10 F	1	2	2	1050
GRUPO	2	10F				
GRUPO	3	10F				
GRUPO	4	10F	2	2	2	1350
GRUPO	5	10F				
GRUPO	6	10F				
GRUPO	7	10F	3	2	2	1550
GRUPO	8	10F				
GRUPO	9	10F				
GRUPO	10	10F	4	2	2	800
GRUPO	11	10F				
GRUPO	12	10F				
GRUPO	13	10F	5	2	2	1150
GRUPO	14	10F				
GRUPO	15	10F				
GRUPO	16	10F	6	2	2	1550
GRUPO	17	10F				
GRUPO	18	10F				
GRUPO	19	10F	7	2	1	900
GRUPO	20	10F				
GRUPO	21	10F				
GRUPO	22	10F				

Anexo 3

Lote 3: Embriões injetados e posterior desenvolvimento até adultos.

OVOS	LARVAS	PUPAS	MACHOS	FÊMEAS
42	80	78	40	34
71				
62				
67				
77				
73				
94	43	36	19	14
46				
82				
113				

Cruzamentos entre pool de fêmeas injetadas e machos selvagens,
e número de larvas G1 obtidas

	POOL DE FÊMEAS		LARVAS
GRUPO	1	10F + 10M	1400
GRUPO	2	10F + 10M	500
GRUPO	3	10F + 10M	1050
GRUPO	4	10F + 10M	1400
GRUPO	5	08F + 10M	1200

Cruzamentos entre machos injetados e fêmeas selvagens,
e número de larvas G1 obtidas.

	MACHOS		POOL	LARVAS
GRUPO	1	10F	1	1000
GRUPO	2	10F		
GRUPO	3	10F		
GRUPO	4	10F	2	400
GRUPO	5	10F		
GRUPO	6	10F		
GRUPO	7	10F	3	400
GRUPO	8	10F		
GRUPO	9	10F		
GRUPO	10	10F	4	500
GRUPO	11	10F		
GRUPO	12	10F		
GRUPO	13	10F	5	950
GRUPO	14	10F		
GRUPO	15	10F		
GRUPO	16	10F	6	800
GRUPO	17	10F		
GRUPO	18	10F		
GRUPO	19	10F	7	550
GRUPO	20	10F		
GRUPO	21	10F		
GRUPO	22	10F	8	
GRUPO	23	10F		
GRUPO	24	10F		

	MACHOS		POOL	LARVAS
GRUPO	25	10F	9	
GRUPO	26	10F		
GRUPO	27	10F		
GRUPO	28	10F	10	
GRUPO	29	10F		
GRUPO	30	10F		
GRUPO	31	10F	11	1050
GRUPO	32	10F		
GRUPO	33	10F		
GRUPO	34	10F	12	850
GRUPO	35	10F		
GRUPO	36	10F		
GRUPO	37	10F	13	650
GRUPO	38	10F		
GRUPO	39	10F		
GRUPO	40	10F	14	900
GRUPO	41	10F		
GRUPO	42	10F		
GRUPO	43	10F	15	600
GRUPO	44	10F		
GRUPO	45	10F		
GRUPO	46	10F	16	400
GRUPO	47	10F		
GRUPO	48	10F		
GRUPO	49	10F	17	950
GRUPO	50	10F		
GRUPO	51	10F		
GRUPO	52	10F	18	
GRUPO	53	10F		
GRUPO	54	10F		
GRUPO	55	10F	19	550
GRUPO	56	10F		
GRUPO	57	10F		
GRUPO	58	10F	20	600
GRUPO	59	10F		

Anexo 4

Lote 4: Embriões injetados, posterior desenvolvimento, ;

OVOS	LARVAS	PUPAS	MACHOS G0	FÊMEAS G0
833	115	109	55	52

Cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens, e larvas G1 obtidas.

MACHOS	SELVAGENS		FÊMEAS	SELVAGENS
1	10 FÊMEAS		1	10 MACHOS
2	10 FÊMEAS		2	
3	10 FÊMEAS		3	
4	10 FÊMEAS		4	
5	10 FÊMEAS		5	
6	10 FÊMEAS		6	
7	10 FÊMEAS		7	
8	10 FÊMEAS		8	
9	10 FÊMEAS		9	
10	10 FÊMEAS		10	
11	10 FÊMEAS		11	10 MACHOS
12	10 FÊMEAS		12	
13	10 FÊMEAS		13	
14	10 FÊMEAS		14	
15	10 FÊMEAS		15	
16	10 FÊMEAS		16	
17	10 FÊMEAS		17	
18	10 FÊMEAS		18	
19	10 FÊMEAS		19	
20	10 FÊMEAS		20	
21	10 FÊMEAS		21	10 MACHOS
22	10 FÊMEAS		22	
23	10 FÊMEAS		23	
24	10 FÊMEAS		24	
25	10 FÊMEAS		25	
26	10 FÊMEAS		26	
27	10 FÊMEAS		27	
28	10 FÊMEAS		28	
29	10 FÊMEAS		29	
30	10 FÊMEAS		30	
31	10 FÊMEAS		31	10 MACHOS
32	10 FÊMEAS		32	
33	10 FÊMEAS		33	
34	10 FÊMEAS		34	

MACHOS	SELVAGENS		FÊMEAS	SELVAGENS
35	10 FÊMEAS		35	
36	10 FÊMEAS		36	
37	10 FÊMEAS		37	
38	10 FÊMEAS		38	
39	10 FÊMEAS		39	
40	10 FÊMEAS		40	
41	10 FÊMEAS		41	
42	10 FÊMEAS		42	
43	10 FÊMEAS		43	
44	10 FÊMEAS		44	
45	10 FÊMEAS		45	
46	10 FÊMEAS		46	
47	10 FÊMEAS		47	
48	10 FÊMEAS		48	
49	10 FÊMEAS		49	
50	10 FÊMEAS		50	
51	10 FÊMEAS		51	
52	10 FÊMEAS		52	
53	10 FÊMEAS			
54	10 FÊMEAS			
55	10 FÊMEAS		TOTAL G1	32.000

Anexo 5

Lote 5: Embriões injetados e posterior desenvolvimento;

OVOS	LARVAS	PUPAS	MACHOS G0	FÊMEAS G0
892	54	33	14	13

Cruzamentos entre indivíduos injetados e selvagens, e larvas G1 obtidas.

MACHOS	SELVAGENS		FÊMEAS	SELVAGENS
1	10 FÊMEAS		1	13 MACHOS
2	10 FÊMEAS		2	
3	10 FÊMEAS		3	
4	10 FÊMEAS		4	
5	10 FÊMEAS		5	
6	10 FÊMEAS		6	
7	10 FÊMEAS		7	
8	10 FÊMEAS		8	
9	10 FÊMEAS		9	
10	10 FÊMEAS		10	
11	10 FÊMEAS		11	
12	10 FÊMEAS		12	
13	10 FÊMEAS		13	
14	10 FÊMEAS		TOTAL G1	12.750