

DANILO DE OLIVEIRA CARVALHO

**Estudo de dispersão de machos da linhagem
transgênica OX513A de *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Parasitologia

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

Versão original

São Paulo
2011

RESUMO

CARVALHO, D. O. **Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti***. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Novas alternativas são necessárias para controlar o mosquito transmissor da dengue, como a manipulação genética. Baseada na técnica do inseto estéril (SIT) que compreende a esterilização, a criação em massa e a liberação de grandes números de insetos machos estéreis em uma área alvo, a tecnologia RIDL, baseada em SIT, compreende criação em massa e liberação de mosquitos machos que carregam gene letal para sua prole, neste caso a linhagem OX513A de *Aedes aegypti* é testada nesse projeto, através da avaliação em testes laboratoriais e em testes de campo com marcação liberação e recaptura, comparando esta linhagem com linhagens selvagens. Foi mensurada a competitividade, longevidade e dispersão. Os testes foram realizados no bairro de Itaberaba (Juazeiro/BA) e na Universidade de São Paulo. Além da avaliação foi realizado o monitoramento com armadilhas “ovitrampa”, captura de mosquitos adultos com aspirações em residências. E o desenvolvimento de um plano de comunicação para a sociedade. Os resultados apontam que a compatibilidade entre as linhagens (transgênica e selvagem) foi positiva e a competitividade não apresentou tendência entre as fêmeas de escolherem uma linhagem ou outra. Estatisticamente não há diferença entre o número de ovos e larvas (logo a fertilidade) entre a linhagem selvagem e transgênica. O monitoramento da área de estudo confirmou a presença de *A. aegypti*, e não foi capturado nenhum indivíduo de *Aedes albopictus*. Para avaliar a dispersão, os mosquitos machos transgênicos foram liberados no ambiente e esses apresentaram uma sobrevivência no campo de 2,3 dias e um raio de vôo de 80 metros do ponto de liberação. O índice de esterilidade relativa foi determinado baseado na competitividade e proporção de ovos fluorescentes encontrados. Foi possível estabelecer uma produção em massa para realizar a fase de pré-supressão com a liberação de 540.000 machos ao longo de seis semanas e obtenção de 17% de larvas transgênicas oriundas do cruzamento desses machos com fêmeas do campo. Baseado nesses dados iniciou-se a fase de supressão com a liberação alvo de 400.000 por semana, aproximadamente 05 vezes mais esperando alcançar o estágio de supressão.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Dispersão. Transgênico. Supressão.

ABSTRACT

CARVALHO, D. O. **Dispersal study with transgenic males line OX513A of *Aedes aegypti***. 2012. 112 p. Masters thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

New alternatives are needed to control mosquitoes that transmit Dengue. Based on insect technique Sterile (SIT), which comprises sterilizing, mass rearing and release a large number of sterile males in an area target, RIDL technology based on SIT, but using transgenesis instead of radiation. Doing the same process for mass rearing and release of male mosquitoes carrying lethal gene to their offspring, in this case the strain OX513A of *Aedes aegypti* is under test in this project, through the evaluation of laboratory and field trials with mark-release-recapture (MRR), comparing transgenic with wild-type. We measured competitiveness, longevity and dispersal. The tests were performed in Itaberaba neighborhood (Juazeiro / BA) and at University of São Paulo. The evaluation was carried out with monitoring through ovitraps and adult mosquitoes collection with aspiration in houses. It was also developed a communication plan to society/community in general. The results indicate that the compatibility between the lines (transgenic and wild-type) was positive, and competitiveness showed no trend among females to choose one lineage or another. Statistically there were no difference between the number of eggs and larvae (resulting fertility) between the transgenic line and wild-type. The study area monitoring confirmed the presence of *Ae. aegypti*, and no *Aedes albopictus* was captured. To evaluate dispersion, transgenic males were released into the environment and they showed a field survival of 2.3 days and a flight range of 80 meters from the release point. The relative sterility index was determined based on the competitiveness and fluorescent proportion of eggs. Mass production was established to perform the pre-suppression phase releasing 540,000 males over six weeks and obtaining 17% of transgenic larvae in response of transgenic males mating field females. Based on these data suppression process have started with a release target of 400,000 per week, this is about 05 times more to reach the suppression stage briefly.

Keywords: *Aedes aegypti*. Dispersion. Transgenic. Suppression.

1 INTRODUÇÃO

As primeiras espécies de mosquito somente foram identificadas por volta do século XVIII, quando aspectos gerais de seu ciclo biológico também foram então elucidados. Até as últimas décadas do século XIX acreditava-se que mosquitos provocavam apenas incomodo através de sua picada, porém foi durante este período que se descobriu que os agentes etiológicos da filariose bancroftiana (*Wulchereria* sp.) e da malária (*Plasmodium*) são transmitidos pelos mosquitos. Houve então a necessidade de se conhecer melhor esses organismos e suas espécies para obter um estudo mais detalhado de sua biologia e estudar sua sistemática(CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATTINI 1996;). Posteriormente outros organismos classificados na mesma família (Culicidae) foram incriminados na participação da transmissão de vírus, principalmente vírus das famílias Flaviviridae e Togaviridae, onde entre essas famílias virais se destacam o vírus da febre amarela, dengue, chikungunya e algumas encefalites (St. Louis, Equina do Oeste e Leste, Japonesa e da Venezuela) (FIGUEIREDO, 2007). Desta forma a história natural dessas doenças recebeu uma atenção ainda maior, pois se conhecendo bem a biologia, descobrem-se pontos vulneráveis da transmissão sendo assim mais fácil combatê-las.

Em especial, o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) é designado o principal transmissor do vírus dengue em todo o mundo. Tanto a mortalidade quanto a morbidade dessa doença está em crescente aumento (GUBLER, 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de serem infectadas. A incidência de dengue aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos e anualmente são estimados por volta de 50 a 100 mil casos. No âmbito nacional, a dengue é a principal enfermidade transmitida por vetores. Entre junho de 2010 e junho de 2011 mais de 1,4 milhões de casos foram notificados ao Ministério da Saúde com 999 óbitos pela forma mais grave da doença – febre hemorrágica por dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O quadro se agrava com a ausência de vacinas que sejam eficazes com os quatro sorotipos virais (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) e pela falta de medicação específica que combata o vírus, existindo apenas medicação para o tratamento paliativo dos sintomas. Em 30 de julho de 2010, após 20 anos, ocorreu a reintrodução do vírus DENV4 na cidade de Boa Vista (RR) através de um caso autóctone seguido de mais 11 casos. Isso implica que uma geração inteira de pessoas esteve fora do alcance deste sorotipo. Diante deste quadro, a preocupação com o controle da dengue passa a ter o mosquito como principal alvo(GUBLER, 2004; GUZMAN; ISTURIZ 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2009; 2010).

A espécie *Ae. aegypti* é originária da África subsahariana, onde se domesticou e se adaptou ao ambiente criado pelo homem, tornando-se uma espécie extremamente antropofílica e também de hábito antropofágico, de forma geral é uma espécie sinantrópica de fácil adaptabilidade (FORATTINI, 2002). Foi por conta dessa adaptação e também pelo fato dos seus ovos entrarem no estado de quiescência que esta espécie teve a possibilidade de se propagar por toda faixa tropical e subtropical ao redor do mundo (TEIXEIRA, 1999). Essa distribuição se deve principalmente ao período das grandes navegações com o tráfego de escravos do continente africano para outras regiões do mundo, principalmente para o Brasil, acredita-se que nesse período, os ovos desse mosquito eram trazidos e deixados nas áreas portuárias onde lá encontraram as condições mínimas necessárias para se desenvolver. Assim também ocorreu com o vírus, que foi transportado em seus hospedeiros (vertebrados e invertebrados) infectados (BRYANT et al., 2007; TOMA et al., 2011). No Brasil há relatos desde 1846 de uma doença que se assemelharia com dengue, porém foi somente em 1981 que foi realizado o primeiro isolamento do vírus no estado de Roraima (região norte do país) pelo Instituto Adolfo Lutz (DE FIGUEIREDO et al., 2010).

Uma das primeiras tentativas de controle do vetor teve como foco o controle da febre amarela, através da parceria com a fundação Rockefeller e o Departamento Nacional de Saúde Pública onde foram iniciadas atividades de controle vetorial com uso de inseticidas e em 1947 a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) juntamente com a Organização Mundial de Saúde (WHO) formam um novo grupo para combate do vetor e formam a coordenação do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* no hemisfério oeste. Foi através dessas ações públicas que no final da década de 1950 o mosquito *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do território nacional. Porém durante a década de 1970 houve a reintrodução da espécie na pela região costeira do nordeste do país. E desde então o número de municípios que passaram a reportar a presença do vetor e da doença está aumentando (FUNASA, 2001; BRAGA; VALLE, 2007).

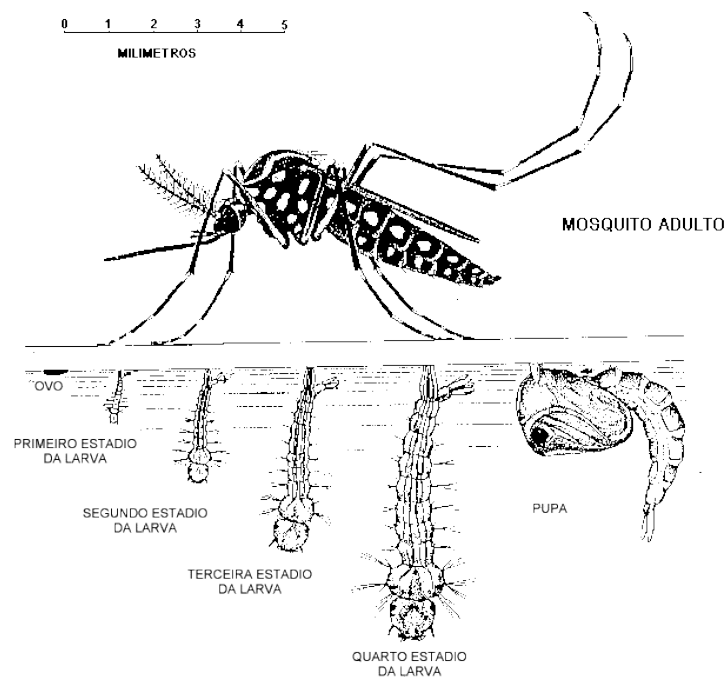
Conhecer o ciclo de vida do mosquito (figura 01) pode auxiliar no combate á doença, por exemplo, somente as fêmeas realizam repasto sanguíneo e durante o mesmo é que elas transmitem o vírus e machos não se alimentam de sangue. A alimentação sanguínea é necessária para o término do desenvolvimento dos ovos. Durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro já infectado as fêmeas se infectam com o vírus estando aptas a transmitirem o vírus para o próximo hospedeiro entre 07 e 14 dias (SALAZAR et al., 2007; TRAVANTY et al., 2004). De forma geral, o ciclo de vida passa por quatro estágios, ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos que podem ficar em estado de quiescência e permanecerem

viáveis no ambiente, esperando condições ideais para desenvolvimento por até um ano. Com o aumento da umidade, da disponibilidade de água nos criadouros e de alimento (condições favoráveis) as larvas eclodem e passam por quatro estádios (L1-L4) que tem duração de aproximadamente oito dias no total. Passada esta fase as larvas passam para o novo estágio, transformando-se em pupas. E é nessa fase que ocorre a reorganização de todo material para a formação do adulto, esta fase assim como as demais é dependente da temperatura que tem duração de dois dias (quando em temperatura igual a 27 °C), embora a pupa não se alimente, ela possui foto-sensibilidade e consegue se locomover na coluna d'água. Com o desenvolvimento do imago no interior da pupa ocorre então a emergência do adulto. E nas primeiras horas após a emergência ocorre o enrijecimento do exoesqueleto do inseto. Após a emergência do macho adulto, nas primeiras 24hs ocorre a torção da genitália para a garantia de sucesso de cópula, esse período também é necessário para produção em quantidade suficiente de espermatozoides para iniciar as cópulas, portanto o macho estará maduro sexualmente somente após este período. Por outro lado, a fêmea emerge pronta para realizar cópula e após a realização da cópula a fêmea não tem necessidade de realizar outra, pois ela armazena quantidade suficiente de espermatozoides nas espermatecas por todo o seu período reprodutivo. E após três dias ela realiza um repasto sanguíneo para o término da maturação dos ovos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002).

Dessa forma, as estratégias utilizadas para combater o vetor são em geral atividades preventivas que envolvem medidas baseadas no manejo integrado que tem como pilares, ações de controle biológico, mecânico e químico. No Brasil, somente em 2008 e 2009 foram utilizados mais de 110 milhões de reais para combater a doença através de ações de combate ao vetor (SUAYA, et al. 2009). Mesmo com o alto investimento, o manejo integrado não é suficiente e não consegue lidar com a demanda. Dessa forma acaba sendo uma estratégia pouco eficaz, que se agrava com a falta de conscientização por parte da população, contribuindo para a prevalência da do vetor e da doença no ambiente (MACORIS et al., 1999; TAUIL, 2002).

Atualmente o uso de inseticida é a principal estratégia usada contra o vetor. Essa atividade iniciou usando principalmente DDT (organoclorado), carbamatos (propréter, propoxur), posteriormente organofosforados (como malathion e temefós), e piretróides (como deltametrina e cipermetrina) (MACORIS et al. 1999). O uso de temefós é bastante intenso sendo que somente entre 1997 e 2001 foram usados 33.833 kg, onde esta quantidade representou apenas 60% do total usado apenas no ano de 2003 (CARVALHO et al. 2004).

Figura 01 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



As larvas eclodem dos ovos e passam por quatro estádios (aproximadamente dois dias cada estágio) até alcançarem a fase de pupa (duração de dois dias). Quando emergem os adultos, as fêmeas estão aptas a realizarem cópula e repasto sanguíneo, enquanto que o macho necessita de 24 horas para que ocorra a torção da genitália permitindo a realização da cópula.

Fonte: UNICAMP (2001)

Como se pode notar, em populações que apresentam a resistência ao inseticida empregado as medidas são maior frequência de aplicação do produto assim como aumento da dosagem a ser utilizada, mesmo quando o uso é combinado entre dois ou mais inseticidas. Outro ponto negativo do uso de inseticidas é o efeito adverso em organismos não-alvos, embora sejam desenvolvidos para atingirem um grupo específico, na maioria dos casos acaba gerando mortalidade em outras populações (SCHLEIER; PETERSON, 2010).

Atualmente uma ferramenta de grande potencial é o uso de *Bacillus thuringiensis israelensis*, ou Bti, como larvicida. Essa bactéria gram-negativa produz cristais durante a fase de esporulação que ao entrarem em contato com o trato digestivo das formas imaturas têm função de toxinas matando as larvas. Porém assim como para outros inseticidas, estudos científicos apresentam populações de *Ae. aegypti* resistentes as toxinas produzidas por Bti (CANTON et al., 2010; PARIS et al., 2010; 2011).

A resistência esta associada principalmente à maior eficiência no sistema de detoxificação do mosquito, enzimas como esterases, glutathioneS-transferases e reação monooxigenase fazem parte desse mecanismo. Genes que eram raros ou pouco expressos passam a ser mais frequentes e mais expressos em uma população, resultado de uma seleção

genética. Genes relacionados a resistência contra Bti, também estão envolvidos com a expressão, mudando sua taxa de transcrição, por exemplo a redução na expressão de receptores no intestino das larvas impede a interação das toxinas, outro mecanismo é quanto a modificação de algumas sequencias dos receptores que faz com que a ligação entre o receptor e a toxina não seja possível. Outro mecanismo envolve a redução na expressão de uma protease serina que ativa a família daptotoxina Cry no intestino do inseto. Essa seleção de mosquitos imunes a agentes químicos tem causado sérios problemas de saúde pública, além do controle do mosquito a cada dia ficar mais difícil, ainda temos o ressurgimento de parasitoides e viroses transmitidas por mosquitos (DARRIET et al., 2010; PARIS et al., 2010; 2012; BOYER; ZHANG; LEMPÉRIÈRE; 2011).

Frente aos problemas relatados e com a possibilidade de se agravar devido ao aquecimento global, há uma evidente necessidade de melhorar as atuais intervenções e também explorar alternativas para o controle do vetor, que sejam diferentes das estratégias atualmente utilizadas. Desde o início da década de 1960 tentativas de manipulação genética abriu espaço para controlar pragas e vetores. Primeiro com a utilização de radiação ionizante para provocar esterilidade em insetos e reduzindo assim a população alvo (ASMAN et al. 1981).

A técnica do inseto estéril (SIT – *Sterile Insect Technique*) de uma forma simplificada compreende a criação em massa de insetos machos, seguida de esterilização e liberação desse produto em uma área alvo, assim machos estéreis copulam com fêmeas selvagens e a prole gerada desse cruzamento é inviável. Por se tratar de cópula, esta é uma técnica espécie-específica, uma vez que o macho não copula com fêmeas de outras espécies. O uso dessa técnica esta baseada na exposição dos insetos a radiação que danifica permanentemente seu material genético, provocando esterilidade nesses indivíduos, e também na intensa liberação dos machos estéreis para garantir essa cópula (10 machos estéreis para cada macho selvagem) (ALPHEY 2002; 2008; BENEDICT; ROBINSON, 2003; DYCK et al., 2005; PHUC et al., 2007).

A primeira tentativa utilizando SIT em mosquitos foi realizada também no início da década de 1960 nos USA, com a utilização de raios gama de fonte de cobalto (Co^{60}) para gerar esterilidade em pupas macho. Neste estudo, nas duas áreas tratadas não foi possível confirmar o efeito de uma supressão populacional (MORLAN et al. 1962). Outras tentativas subsequentes com *Ae. aegypti* e outras espécies obtiveram resultados diversificados, mas de maneira geral todos relatam que, além desse sistema apresentar instabilidade, a radiação provoca perda de *fitness* dos machos, que os tornam menos eficientes e muito pouco

competitivos (THOMAS et al., 2000; ALPHEY, 2002; ALPHEY; ANDREASEN, 2002; BENEDICT; ROBINSON, 2003; DYCK et al., 2005; COLEMAN; ALPHEY, 2004).

Tabela 01 –Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT)

(continua)

Organismo	Ano	Local	Esterilidade	N. Liberado	Objetivo	Resultado
	1960-1961	EUA	Ga	4,6 milhões por 43 semanas	Redução populacional	Apesar da esmagadora quantidade liberada de material selvagem, nenhum efeito foi concluído.
	1967	EUA	Ma	17 mil machos férteis por 2 semanas	Introgressão alélica morfológica	De 1084 ovos, dois cruzamentos foram para indivíduos marcados.
	1971	Índia	Tr	30 mil machos translocados por 4 semanas	Persistência da translocação em população selvagem	Machos foram competitivos e persistência da translocação foi observada.
	1971	Índia	Ma	~50 mil machos marcados por 4 semanas	Introgressão alélica em população selvagem	Machos foram competitivos e introgressão do alelo marcador foi observado.
<i>Aedes aegypti</i>	1974	Índia	Ch, Tr ou Sg	40.500 em 3 experimentos de 6 dias cada	Competitividade de cópula entre machos	Machos foram competitivos.
	1974	Quênia	Tr	57 mil por 10 semanas	Redução populacional e esterilização parcial	Esterilização parcial, mas não houve persistência em longo prazo de translocação nem um grande efeito na população de pupa e adultos.
	1975	Quênia	Tr	31.500 por 9 semanas	Redução populacional e dinâmica	Machos liberados acasalaram fêmeas selvagens, mas os ovos não foram depositados nas ovitampas e progênie híbrida não sobreviveu a pupa.
<i>Aedes albopictus</i>	1990-1991	EUA	Ma	21 mil machos em 3 liberações	Diapausa e introgressão rara eletromórfica	Evidência de introgressão

Tabela 01 –Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT)

(continuação)						
Organismo	Ano	Local	Esterilidade	N. Liberado	Objetivo	Resultado
<i>Culex pipens</i>	1970	França	Tr	Centena de milhares por 8 semanas	Redução populacional e esterilização parcial	Persistência da translocação e redução populacional foram observadas
	1967	Mianmar	CI	5 mil diariamente por 9 semanas	Eliminação da população	População eliminada
	1968	EUA	Ch	2.500 machos diariamente por 8 semanas	Redução da população	Esterilidade aumentada, mas equilíbrio no número de jangadas de ovo.
	1969	EUA	Ch	930 mil machos por 12 semanas	Redução da população	Supressão populacional e/ou eliminação devido a liberação de machos estéreis.
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1973	Índia	CI+Tr ou Ch	11.400 machos em 2 experimentos de 9 ou 10 dias	Competitividade de cópula entre machos	Machos foram competitivos
	1973	Índia	Tr+CI	~23 milhões de machos por 14 semanas	Redução populacional, e esterilidade por incompatibilidade citoplasmática.	Esterilidade por incompatibilidade e translocação com redução populacional
	1973	Índia	Ch	38 milhões de machos por 25 semanas	Redução populacional e esterilidade	Até 90% das jangadas de ovos estéreis, mas nenhuma supressão populacional aparente.
<i>Culex tarsalis</i>	1977	EUA	Tr	76 mil machos por 4 semanas	Redução populacional	Nenhum efeito mensurável
	1978	EUA	Tr	180 mil machos por 2,5 meses	Competitividade masculina	Evidencia de cópula, mas dispersão e competitividade baixa. Sem evidencia de redução populacional.
	1979	EUA	Ga	13 mil machos em uma liberação	Redução populacional	Aumento da esterilidade no lote dos ovos.
	1981	EUA	Ch	85 mil machos por 8 semanas	Redução populacional e comportamento de cópula	Acasalamento observado e não houve redução populacional

Tabela 01 –Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT)

							(conclusão)
Organismo	Ano	Local	Esterilidade	N. Liberado	Objetivo	Resultado	
	1982	EUA	Ma	159 mil machos e fêmeas por 6 semanas	Introgessão de mutação para cor de olhos carmin	Frequência alélica aumentada e persistiu em baixos níveis por até dois anos após o término das liberações	
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	1977	Paquistão	Tr	167 mil por 2 semanas	Competitividade masculina	Machos competiram bem por fêmeas criadas em laboratório, mas não selvagens. Imigração impediu evidencia de redução populacional	
	1972	El Salvador	Ch	4,4 milhões de machos por 22 semanas	Desenvolvimento de metodologia e redução populacional	População eliminada	
<i>Anopheles albimanus</i>	1977-1979	El Salvador	Ch, Ga	Centena de milhões de machos	Redução populacional	População suprimida em área de liberação, mas acredita-se que imigração reduziu o efeito.	
	1979	Paquistão	Tr	3.100 machos em 1 liberação	Cópula com fêmeas selvagem e da colônia liberadas	Acasalamento não pareceu ter sido selecionado devido ao difícil processo de colonização. Machos eram competitivos.	
<i>Anopheles culicifacies</i>	1980	Paquistão	Ch	7.500 machos em 1 semana	Cópula com fêmeas selvagem e da colônia liberadas	Machos menos competitivos, mas dispersão, <i>swarming</i> e cópula foram observadas.	
<i>Anopheles gambiae</i>	1968-1969	Burkina Faso	Hy	240 mil por 9 semanas	Redução populacional	Nenhum efeito significativo. Dispersão alta, mas pobre competitividade.	
	1959-1960	EUA	Ch	433.600 machos por 48 semanas em 2 localidades	Redução populacional e esterilização parcial	Nenhuma redução populacional, e nenhuma ou pouca esterilidade parcial foram observadas.	
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	1962-1963	EUA	Ch	50 mil machos selvagens e da colônia	Competitividade masculina, comportamento, e métodos de esterilização.	Cópula com fêmeas selvagem e da colônia foi observado.	

Abreviações: Ch, quimioesterilização; CI, incompatibilidade citoplasmática; Ga, radiação gama; Hy, esterilidade macho híbrido; Ma, apenas marcado (esterilidade não intencional); Sg, Segregação distorcida.

Fonte: Adaptada de Benedict; Robinson (2003)

Em paralelo, a tentativa de encontrar translocações cromossômicas promovidas pela radiação e com a utilização de quimioesterilizantes a fim de promover a esterilidade em machos, alguns estudos encontraram resultados promissores, mas que não geraram resultados subsequentes. Por outro lado, ocorreram problemas de criação em massa acabaram, tornando-se inviáveis, além de outros trabalhos que não obtiveram o resultado esperado (ASMAN et al., 1981; CURTIS et al., 1976; LOFGREN et al., 1974).

A utilização desses processos radioativos acarretam alterações somáticas no indivíduo que indiretamente interferem na capacidade desses insetos de copularem, uma vez que o processo gera perda de competitividade, entre outros parâmetros, no seu conjunto a perda de *fitness* do inseto. Curtis (1968) comenta que para se obter sucesso na técnica, tais modificações não devem ser deletérias para o inseto, embora qualquer modificação cause uma pequena redução em seu *fitness*. Além disso, o número de insetos que não eram estéreis era grande e a utilização insetos esterilizados por quimioesterilizantes mostrou um efeito acumulativo quando são usados como dieta para outros organismos, esterilizando assim também outros animais que porventura se alimentarem deles. Outra questão é quanto ao uso de fontes geradoras de radiação que expõem os trabalhadores humanos a pequenas, porém frequentes doses de radiação (BRACKEN; DONDALE, 1972; HELINSKI et al., 2009).

Dessa forma, com o advento das ferramentas de biologia molecular foram criadas novas abordagens que utilizam mecanismos mais complexos para a produção de organismos modificados geneticamente. Utilizando essas ferramentas, essas modificações permitem utilizar genes de outras espécies e assim alcançar o objetivo de controle da doença ou da população vetora de uma forma mais direta, pontual e eficiente. Então, nesse tipo de abordagem temos pelo menos duas metodologias, a primeira visa promover uma substituição populacional em uma determinada área, enquanto que a segunda tem como objetivo suprimir a população não-transgênica (tipo selvagem) a níveis que promovam um colapso populacional, interrompendo o ciclo de transmissão da doença (CARTER; HURD, 2010; VONTAS et al. 2010).

1.1 Substituição de população

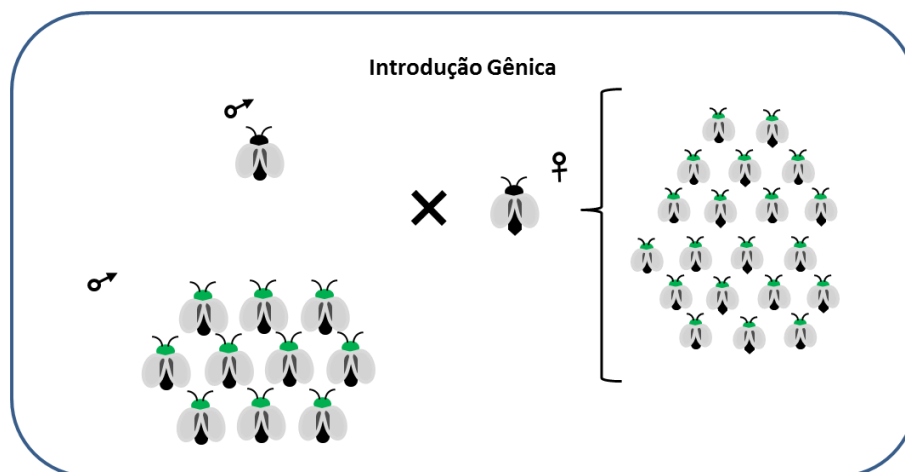
Esta estratégia consiste em disseminar um novo gene dentro de uma população de mosquitos numa determinada área, dessa forma a população a cada geração será substituída e passa a ter com mais frequência esta nova informação transgênica inserida no genoma (figura 02). Grande parte das linhagens transgênicas obtidas em laboratório está contida nesse grupo,

elas têm como função expressar genes que de alguma forma impeçam o agente etiológico de completar seu ciclo e/ou de ser transmitido para o próximo hospedeiro (CATTERUCCIA et al., 2009; HAY et al., 2010).

Para exemplificar, a linhagem transgênica que expressa moléculas efetoras contra o vírus dengue sorotipo DENV-2 (ADELMAN et al., 2002), a construção expressa no mosquito um fragmento de RNA específico do vírus dengue, este RNA dupla fita acaba ativando a via do RNA de interferência (RNAi) inibindo a replicação viral no mosquito e interrompendo seu ciclo, conseqüentemente a transmissão. Esta linhagem foi capaz de bloquear a transmissão do sorotipo DENV-2. Embora o autor comente que alguns indivíduos ainda fossem capazes de transmitirem o vírus. E que esse escape possa ser causado por sutis diferenças fisiológicas que cada indivíduo apresenta, incluindo o próprio vírus que pode ter meios de escapar. O autor ainda salienta que a linhagem não foi capaz de bloquear a transmissão do sorotipo DENV-4 (ADELMAN et al., 2002; FRANZ et al., 2006; TRAVANTY et al., 2004).

A expressão de múltiplas moléculas efetoras, reguladas por diferentes promotores em tecidos diferentes, pode ser necessária para reduzir a intensidade da infecção à zero. Além disso, múltiplas moléculas efetoras, com mecanismo de ação diferente, são necessárias para evitar potencial seleção por resistência a uma molécula efetora ou mecanismo-alvo (KOKOZA et al., 2010; MATHUR et al., 2010). Embora a maior dificuldade nesta estratégia seja em como disseminar o transgene dentro da população (HAY et al., 2010; MARSHALL; HAY, 2011; WINDBICHLER et al., 2007; YAHARA et al., 2009).

Figura 02 –Esquema de substituição de população por introdução gênica



Liberação de machos em uma população para introduzir um gene onde a frequência dos genes aumenta conforme se mantém as liberações em campo, neste caso a espécie não é eliminada ou suprimida, apenas substituída.

Fonte: Carvalho (2012)

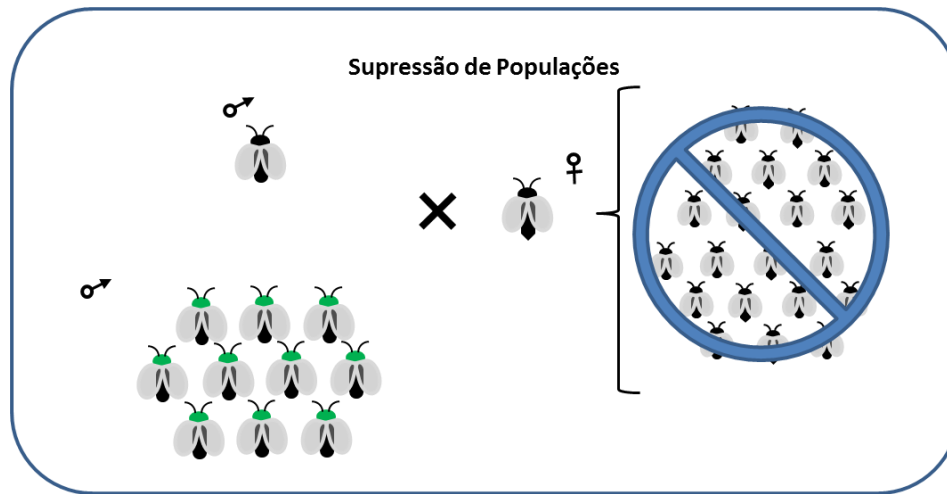
1.2 Supressão de população

Reduzir o número de uma população existente em uma determinada área, através da liberação contínua e suficiente de machos (estéreis ou portadores de uma desvantagem dominante) ao longo do tempo, causa o colapso dessa população. Assim, com menos mosquitos disponíveis menores serão as chances de transmissão do patógeno no ciclo vetor-hospedeiro (DYCK et al., 2005).

Baseada no princípio da SIT, uma nova abordagem para supressão de população é apresentada com o advento da tecnologia RIDL (*Release of Insect carrying a Dominant Lethal gene*) que compreende a liberação de machos portadores de um gene letal condicionado, ou seja, apenas em uma determinada condição o gene será expresso. Estes machos transgênicos copulam com fêmeas selvagens e transmitem este gene letal para sua prole (figura 03). Os indivíduos portadores desse gene são impedidos de alcançar a fase adulta (fase de transmissão da doença). E isso se dá por não conseguirem sobreviver no ambiente na ausência de um “antídoto”. Dentre as diversas vantagens com a utilização dessa tecnologia RIDL, a mais atraente é que não faz uso de fonte de radiação ionizante. Não há necessidade de cada lote a ser liberado no ambiente ser tratado com nenhum tipo de radiação ou produto químico, pois os organismos já nascem com o gene letal condicionado inserido em seu genoma. A intenção é utilizar esta tecnologia em conjunto com as estratégias de controle já utilizadas, mas que por si mesmas não alcançam o efeito esperado (ALPHEY; ANDREASEN, 2002; BENEDICT; ROBINSON, 2003; LEE et al., 2009; NAZNI et al. 2009; PHUC et al., 2007; THOMAS et al. 2000).

No âmbito dessa tecnologia, a Oxford Insect Technology (Oxitec Ltd., Oxford, Inglaterra), empresa que tem como foco o desenvolvimento de tecnologia para o combate de insetos com o uso de linhagens transgênicas, desenvolveu linhagens de *Ae. aegypti* para controle populacional. Atualmente a linhagem OX513A foi a primeira que mostrou os melhores resultados em laboratório, tendo grande possibilidade de ser testada em campo. Testes realizados nas Ilhas Caiman mostraram a eficiência dessa linhagem na supressão de população do mosquito em uma pequena área que esta livre do vírus causador da dengue (HARRIS et al. 2011). Esta linhagem transgênica foi gerada a partir de uma linhagem laboratorial (Rockfeller) que é susceptível a inseticidas, através de microinjeções de solução com o transgene em ovos embrionados de *Aedes aegypti* (MCGRANE et al., 1988; JASINSKIENE et al., 2007).

Figura 03–Esquema de supressão de população por transmissão de gene letal

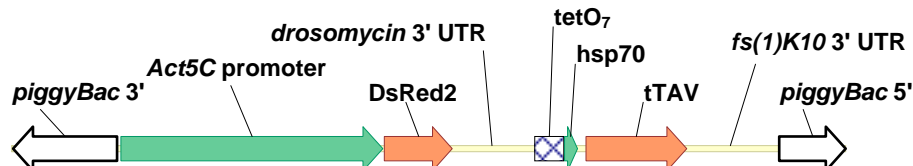


Liberação de machos em uma população para transmissão do gene letal para sua prole matando os portadores do gene, conforme são realizadas as liberações em campo, neste caso a espécie pode ser eliminada ou suprimida.

Fonte: Carvalho (2012)

Como principal característica esta linhagem apresenta o sistema letal, e também um marcador genético. Essa marcação é promovida pela expressão da proteína vermelha fluorescente (DsRed2 - com comprimento de onda entre 563 a 582 nm) (GROSS et al., 2000) no exoesqueleto do inseto promovido pelo promotor de actina Act5c (PHUC et al., 2007), que foi inserida juntamente com o sistema letal e possui duas funções interligadas, a primeira é marcar de forma irrefutável a linhagem transgênica, a segunda é quanto ao monitoramento e avaliação do projeto, pois somente uma marcação eficiente facilita a identificação do mosquito modificado o que gera economia no tempo de identificação com ampla margem de segurança. Pois um marcador molecular (DNA) tende a ser mais polimórfico e muito heterogêneo, diferentemente de um marcador protéico, como a proteína DsRed2 (BEHURA, 2006; HOY, 2002).

Figura 04 – Esquema do transgene LA513 da linhagem OX513A de *Aedes aegypti*

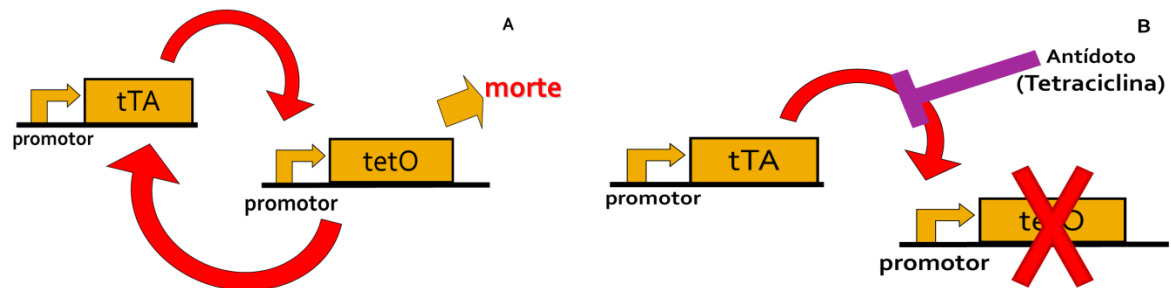


Utilizando o elemento de transposição piggyBac, os mosquitos transformados são identificados pela fluorescência DsRed2.

Fonte: Phuc et al. (2007)

Na figura 04 é apresentado o esquema do transgene LA513A que promove a mortalidade das larvas e que foi microinjetado nos embriões. Este transgene é constituído pelo sistema ativador de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV) . A proteína tTA, que é produto do sistema tTAV, se liga e ativa a expressão do elemento de resposta à tetraciclina (tRE), uma sequência que inclui cópias múltiplas da sequência específica de DNA a que o tTA se liga, isso ativa a sequência tetO. Que por sua vez promove a expressão exacerbada de tTA por retroalimentação positiva (*feedback* positivo). A expressão em altos níveis de tTA é deletéria às células dos mosquitos, pois modifica a taxa de transcrição normal das células (figura 05A). O gene é condicional, pois a proteína tTA se liga à tetraciclina com alta afinidade, logo, o antibiótico atua como um interruptor regulando a expressão - na ausência deste antibiótico. A proteína tTA induzirá a expressão de tRE, enquanto que na presença de tetraciclina esse processo é interrompido (figura 05B). A expressão basal de tTA é posteriormente bloqueada por tetraciclina nos mosquitos transgênicos e não tem efeito detectável nos mosquitos transgênicos independente da fase de desenvolvimento (FU et al., 2007; FURTH et al., 1994; GONG et al., 2005; GOSSEN et al., 1994; LYCETT et al., 2004; ZHANG et al., 2009).

Figura 05 – Representação do sistema da letalidade condicional



A letalidade condicional causada pela presença ou ausência de tetraciclina. (A) situação na ausência de tetraciclina que induz a morte no mosquito, onde a proteína tTA se liga ao elemento tRE produzindo tetO e por retroalimentação positiva modifica a taxa de transcrição normal das células e passa a ser deletério; (B) situação na presença de tetraciclina, onde tTA tem mais afinidade por tetraciclina que pelo elemento tRE, nessa condição a maquinaria letal é interrompida e o mosquito alcança a fase adulta.

Fonte: Oliveira et al. (2011)

Com o estabelecimento dessa linhagem, tendo sua caracterização e testes preliminares em ambiente natural, temos uma nova ferramenta que necessita ser avaliada e colocada à prova para que possa ser apresentada às autoridades responsáveis como uma nova estratégia oficial no combate ao vetor e conseqüentemente á doença. Dessa forma visamos apresentar os efeitos da liberação de uma linhagem transgênica em campo. Testes no Brasil foram

realizados por este projeto aqui apresentado sob aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) como publicado no Diário Oficial da União (página 48 da secção 1 nº 241, de sexta-feira, 17 de dezembro de 2010) que permite a realização de testes em campo utilizando a linhagem transgênica OX513A de *Ae. aegypti* apenas nos sítios de estudo selecionados no município de Juazeiro no estado da Bahia.

5 CONCLUSÃO

O processo de supressão de uma população esta baseada na estimativa da densidade populacional durante o período de atuação, no modelo de liberação e principalmente na produção em larga escala dos mosquitos machos. Dessa forma para implantação de todas essas etapas o tempo disponibilizado para o programa de pós-graduação para obtenção do título de mestre não foi suficiente para finalizar o processo de supressão na localidade. Porém, mesmo não podendo apresentar o resultado de supressão populacional, este projeto teve continuidade com a última fase para alcançar a supressão populacional, tanto na localidade apresentada, como também em mais três outros distritos no mesmo município. Embora, nesta dissertação somente foi possível avaliar do início ao fim o processo de liberação de uma linhagem transgênica para supressão de população.

A comparação laboratorial entre as linhagens transgênica e selvagem (neste caso linhagem de laboratório - Higgs) mostra que nos itens avaliados (número de ovos e larvas, taxa de eclosão dos ovos e a preferência das fêmeas selvagens) as duas linhagens possuem números similares e que não apresentam diferença estatística. Isso significa que a inserção do transgene não trouxe desvantagem (e também nenhuma vantagem) sobre esses aspectos analisados que pudessem ser notados durante a avaliação. Lee et al. (2009) mostram que a linhagem OX513A não possui diferenças em parâmetros similares quando comparada com uma linhagem selvagem da Malásia testada em laboratório. Logo, a linhagem OX513A não mostrou diferença significativa no que diz respeito a fisiologia do inseto quando comparada em duas situações diferentes e com populações selvagens de diferentes linhagens.

Estudos anteriores mostraram que outras espécies e linhagens de mosquitos transgênicos podem ou não ter alguma vantagem sobre o equivalente organismo selvagem, ou seja, da mesma espécie. E o fator que confere tal variabilidade da característica pode estar relacionado com o local onde o transgene foi inserido, o fato de a linhagem estar em homozigose (o que somente é possível por endocruzamentos) e/ou pelo tipo de construção utilizada (elementos de transposição e outros), além do papel no estado funcional do transgene (IRVIN et al., 2004; MARRELLI, et al. 2006; 2007). No caso da linhagem OX513A, a mesma já se encontrava em homozigose a mais de 65 gerações antes de ser estabelecida uma colônia em território nacional e não apresentou nenhum tipo de alteração ou modificação genética que tenha conferido alguma vantagem ou desvantagem que não tenha sido predita pela construção inserida no genoma, mesmo durante sua utilização ao longo do período de execução desse projeto (aproximadamente de 2 anos).

Embora Bargielowski et al.(2011) comentem que a linhagem RIDL OX513A de *Aedes aegypti* possa ter uma redução no fitness por conta da transformação do tipo do elemento de transposição usado (piggyBac) e também pelos cruzamentos em endogamia para obtenção de linhagem homozigota. O estudo também comenta que provavelmente exista uma pequena redução na longevidade causada pela ausência de consumo de tetraciclina na fase adulta, entretanto isso não foi detectado. No entanto, esta mesma redução também foi observada por Lee (2009), utilizando a mesma linhagem em laboratório, embora tal redução na longevidade não apresentasse diferença estatística com a linhagem selvagem testada. Testes laboratoriais são importantes para servirem de base para iniciar testes em campo, pois dessa forma autoridades e população podem se basear nos resultados laboratoriais imaginando o resultado esperado em campo.

Com relação aos dados de monitoramento obtidos em campo, a armadilha ovitrampa é amplamente utilizada como método de detecção de vetor, além de ter sido apontada como um método de maior precisão do que outros índices na detecção em baixa densidade populacional do vetor. O monitoramento realizado pelas ovitrampas é uma das formas de avaliar o andamento do estudo, isso se dá pelo acompanhamento do número de ovos coletados e também do aumento do número de larvas portadoras da marcação genética. Este é o indicativo que os machos liberados realizaram cópula, e, portanto com o aumento de larvas portadoras no ambiente e na ausência de tetraciclina, esta população transgênica está pré-determinada a entrar em colapso e não alcançar a fase adulta reduzindo a população selvagem (CHADEE, 2009; ESTALLO et.al 2011; GOVELLA, 2011; SILVA, 2009).

O bairro de Itaberaba consegue manter o ciclo do mosquito durante o ano todo sem depender da época chuvosa. Uma possibilidade para a manutenção do número de ovos nesta área é a presença de reservatórios de água utilizados pela população humana para armazenamento de água, e que promove o constante desenvolvimento dos mosquitos na área de estudo. Além disso, como nesta região do país a temperatura é sempre elevada, mesmo durante o inverno (por volta dos 25°C), esse fator não é capaz de interromper o desenvolvimento do mosquito significativamente (CODECO, 2009; ESTALLO et al., 2011).Williams et al. (2010) comentam que criadouros, tais como estes reservatórios de água, podem contribuir para o aumento populacional da espécie sendo indiferente à sazonalidade. E que a remoção desses criadouros, seja pela implantação do fornecimento de água, por exemplo, pode reduzir significativamente a disponibilidade de criadouros e contribuindo na diminuição da densidade populacional da espécie.

De acordo com os dados de dispersão determinou-se a média de distanciamento do ponto de liberação dos mosquitos. Alguns autores comentam que a distancia média de dispersão para esta espécie é de 200 metros, assim como no experimento de MLR apresentado, e comentam também que as fêmeas têm a capacidade de dispersão de até 2 km do ponto de liberação em busca de criadouros (HONORIO et al., 2003; MUIR; KAY, 1998; REITER et al., 1995). O fato do curto distanciamento pode estar relacionado à antropofilia realizada pela espécie, pois na presença de edificações, criadouros e da presença humana o mosquito não tem necessidade de se deslocar por longas distancias em busca de melhores condições para dar continuidade ao ciclo de desenvolvimento (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1998; PAUPY et al. 2010). E tendo as duas linhagens os mesmos parâmetros, isso mostra a capacidade de ambos os machos (transgênicos e selvagens) de se dispersarem em busca de fêmeas para tentativa de se realizar pelo menos uma cópula.

A fase de pré-supressão foi fundamental para estabelecimento de parâmetros para iniciar a fase de supressão que teve início em julho (ainda em andamento). Em especial gerar dados suficientes para a análise e futura expansão do número de mosquitos machos a serem liberados, dessa forma a ampliação foi de aproximadamente 10 mil machos para 60 mil machos e posteriormente 100 mil machos alcançando o limite de produção do biotério atualmente utilizado. Para iniciar o processo de supressão populacional é necessário ter a proporção de 10:1 (transgênicos:selvagem) para que em poucas gerações possa ter o efeito esperado (DYCK et al., 2005). O que confirma os dados obtidos pelas ovitrampas, onde foi possível apontar a variação no número de larvas transgênicas e verificar que um aumento na quantidade de mosquitos a serem liberados era necessário, pois segundo Harris et al. (2011) para gerar o quadro de supressão populacional seria necessário atingir 50% de larvas transgênicas, enquanto que durante a fase de pré-supressão apenas 17% de larvas foi alcançado. Segundo Dame et. al. (2009) para provar que a técnica funcione não é absolutamente necessário eliminar a espécie alvo da área de interesse.

O aumento da produção semanal de mosquitos foi colocado a prova, mesmo contando com a experiência de outros profissionais na área de criação, pois, nenhum outro projeto ou biofábrica conseguiu produzir (e ainda produz) esta quantidade de mosquitos machos por semana. O mais interessante é que os mesmos problemas apontados por outros estudos (BENEDICT et al., 2009) também se tornaram problemas durante a execução deste projeto e foi possível verificar que para cada unidade de produção um novo desafio será gerado, sendo necessária a procura de ajustes para cada situação. Problemas com fungos, densidade larval em bandejas de criação de larvas e densidade em gaiolas de adultos, quantidade de sangue

oferecido para fêmeas e a metodologia utilizada (pois ficaria inviável alimentação com camundongos ou cobaias para 60 gaiolas duas vezes na semana). Além da dificuldade de encontrar fornecedores de todo tipo de material necessário para manter a produção em níveis aceitáveis para liberação.

A determinação da taxa transgênico:selvagem é obtida através da taxa sexual entre cada uma das populações da área controle e tratada para determinar a proporção entre os dois sexos. Baseado neste dado é realizado uma nova proporção, sabendo-se quantos machos selvagens seriam esperados para cada fêmea é possível inferir a diferenças entre estes dois machos e determinar a taxa entre RIDL:Selvagem. A proporção esperada para a população selvagem é de 1:1 (macho e fêmea) para alcançar a supressão aconselha-se 10:1 (macho transgênico:macho selvagem) (DYCK et al., 2005;KNIPLING et al., 1968).

Quanto ao esclarecimento populacional, este foi realizado utilizando a todas as estratégias às quais tivemos alcance e também aquelas que eficientemente atingissem o objetivo de informar a população sobre a utilização dessa tecnologia para controle do mosquito transmissor da dengue. A boa aceitação deste projeto se deve pelas experiências anteriores de todos os tipos, baseados em tentativas realizadas com o mesmo tipo de projeto em outros países/regiões, com o compartilhamento de informações com especialistas na área, e principalmente da transparência e clareza de que se trata de uma linhagem transgênica (BENEDICT et al., 2008; LAVERY et al., 2008; 2010). Além de ter apoio dos representantes governamentais em todas as instancias (municipal, estadual e federal), a aprovação do órgão responsável pela regulamentação de organismos transgênicos no Brasil, foi de extrema importância para iniciar as atividades, pois sem aprovação legal e sem autorização da comunidade, o estudo não tem validade, uma vez que cabe aos responsáveis do estudo agir com ética legal e principalmente social (LAVERY et al., 2008; TINDANA et al., 2007). A experiência obtida com durante todo o processo, servirá como referência para futuras ações que envolvam utilização e/ou liberação de organismos geneticamente modificados no ambiente.

A avaliação de novas técnicas de controle de vetores é fundamental para garantir que a população humana não entre em contato com o agente etiológico e que passe para o quadro de doença. A crescente resistência a inseticidas e falta de conscientização da população auxilia a propagação do vetor e conseqüentemente do vírus no ambiente. Ampliar o campo de atividades que possam controlar eficientemente o vetor é essencial para bloquear a transmissão da doença (MARSHALL, et al. 2010).

A linhagem transgênica OX513A apresenta fatores que agregam vantagens na utilização da técnica RIDL, por não utilizar radiação e produtos químicos nocivos à saúde. Mesmo em casos extremos com liberações indevidas ou acidentais, os mosquitos liberados sobreviveram por apenas uma geração, pois o gene letal condicional não permite que o transgene seja incorporado na população selvagem na ausência da condição necessária, ou seja, caso as larvas oriundas da liberação indevida, cheguem ao ambiente elas não sobreviverão na ausência de tetraciclina.

Assim como roga o manejo integrado, aconselha-se o uso dessa tecnologia agregado com as demais estratégias de controle para obtenção de uma redução populacional capaz de prevenir significativamente o contato da população humana com o vírus dengue.

REFERÊNCIAS*

- ADELMAN, Z. N. et al. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. **J. Virol.** 76(24), v.12 (9), p.25-33, 2002.
- ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1243-1247, 2002.
- ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 121, n. 2, p. 173-178, 2002.
- ALPHEY, L. et al. Insect population suppression using engineered insects. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 627, p. 93-103, 2008.
- ASMAN, S. M. et al. Field studies of genetic control systems for mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 26, p. 289-318, 1981.
- BARGIELOWSKI, I. et al. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20699, 2011.
- BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Mol. Ecol.**, v. 15, n. 11, p. 3087-3113, 2006.
- BENEDICT, M. et al. Guidance for contained field trials of vector mosquitoes engineered to contain a gene drive system: recommendations of a scientific working group. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 8, n. 2, p. 127-166, 2008.
- BENEDICT, M. Q. et al. Colonisation and mass rearing: learning from others. **Malar. J.**, v. 8, p. 2-4, 2009.
- BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends. Parasitol.**, v. 19, n. 8, p. 349-355, 2003.
- BOYER, S. et al. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. **Bull. Entomol. Res.**, p. 01-17, 2011.
- BRACKEN, G. K.; DONDALE, C. D. Fertility and survival of *Achaearanea tepidariorum* (Araneida: Theridiidae) on a diet of chemosterilized mosquitoes. **Can. Entomol.**, v. 104, n. 11, p. 1709-1712, 1972.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epid. Serv. Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

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

BRYANT, J. E., et al. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

BUONACCORSI, J. P. et al. Estimation and comparison of mosquito survival rates with release-recapture-removal data. **J. Med. Entomol.**, v. 40, n. 1, p. 6-17, 2003.

CANTON, P. E. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 595-600, 2010.

CARTER, V.; HURD, H. Choosing anti-Plasmodium molecules for genetically modifying mosquitoes: focus on peptides. **Trends. Parasitol.**, v. 26, n. 12, p. 582-590, 2010.

CARVALHO, M. S. L. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Rev. de Saúde Pública**, v. 38, p. 623-629, 2004.

CATTERUCCIA, F. et al. Transgenic technologies to induce sterility. **Malar. J.**, v. 8, p. 2-7, 2009.

CHADEE, D. D. Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002-2006). **Acta Trop.**, v. 111, n. 3, p. 279-283, 2009.

CODECO, C. T. et al. Seasonal dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the northernmost state of Brazil: a likely port-of-entry for dengue virus 4. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 614-20, 2009.

COLEMAN, P. G.; ALPHEY, L. Genetic control of vector populations: an imminent prospect." **Trop. Med. Int. Health**, v. 9, n. 4, p. 433-437, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. 228p.

CURTIS, C. F. Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations. **Nature**, v. 218, n. 5139, p. 368-369, 1968.

CURTIS, C. F. et al. Comparative field cage tests of the population suppressing efficiency of three genetic control systems for *Aedes aegypti*. **Heredity**, v. 36, n. 1, p. 11-29, 1976.

DAME, D. A. et al. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. **Malar. J.**, v. 8, 2009.

DARRIET, F. et al. Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). **Parasit. Vectors**, v. 3, p. 88, 2010.

DE FIGUEIREDO, M. L. et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virol. J.**, v. 7, p. 152, 2010.

DYCK, V. et al. **Sterile insect technique**. Netherlands: Springer, p. 1-559, 2005.

ESTALLO, E. L. et al. Prevention of dengue outbreaks through *Aedes aegypti* oviposition activity forecasting method. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 11, n. 5, p. 543-549, 2011.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v. 26, p. 531-535, 1966.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica** - princípios gerais, morfologia e glossário taxonômico. São Paulo, EdUSP, 1996, 549p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica** - identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo, Edusp, 2002, 594p.

FRANZ, A. W. et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 11, p. 4198-4203, 2006.

FU, G. et al. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n.3, p. 353-7, 2007.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, (FUNASA). **Dengue**. Ministério da Saúde. Brasília, Coordenação de Vigilância de Fatores de Riscos Biológicos: 84. 2001.

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

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

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

GOVELLA, N. J. et al. Monitoring mosquitoes in urban Dar es Salaam: evaluation of resting boxes, window exit traps, CDC light traps, Ifakara tent traps and human landing catches. **Parasit. Vectors**, v. 4, p. 40, 2011.

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

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUZMAN, A.; ISTURIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, n. 1, p. 40-42, 2010.

HARRINGTON, L. C. et al. Age-dependent survival of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) demonstrated by simultaneous release-recapture of different age cohorts. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 2, p. 307-313, 2008.

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

HARRIS, A. F. et al. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 2, p. 277-284, 2010.

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

HELINSKI, M. E. et al. Radiation biology of mosquitoes. **Malar. J.**, v. 8, p. 2-6, 2009.

HONORIO, N. A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n.2, p. 191-198, 2003.

HOY, M. A. Analysis of risks of transgenic insects for pest management: past and future guidelines. **Development**, v.7, p. 121-137, 2002. Apresentado no International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, 7, 2002, Beijing.

IRVIN, N. et al. Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 3, p. 891-896, 2004.

JASINSKIENE, N. et al. Microinjection of *A. aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes. **J. Vis. Exp.**, v. 5, p. 219, 2007.

KNIPLING, E. F. et al. Genetic control of insects of public health importance. **Bull. World Health Org.**, v. 38, n. 3, p. 421-438, 1968.

KOKOZA, V. et al. Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 18, p. 8111-8116, 2010.

LAVERY, J. V. et al. Ethical, social, and cultural considerations for site selection for research with genetically modified mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 3, p. 312-318, 2008.

LAVERY, J. V. et al. Towards a framework for community engagement in global health research. **Trends Parasitol**, v. 26(6), p. 279-83, 2010.

LEE, H. L. et al. Comparative life parameters of transgenic and wild strain of *Aedes aegypti* in the laboratory. **Dengue Bull.**, v. 33, p. 103-114, 2009.

LILLIE, T. H. et al. The dispersal of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in a salt marsh near Yankeetown, Florida. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 1, n. 4, p. 463-467, 1985.

LOFGREN, C. S. et al. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. 3. Field methods and population control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, n. 2, p. 288-297, 1974.

LYCETT, G. J. et al. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1781-1790, 2004.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Calculating the survival rate and estimated population density of gravid *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 12, p. 2747-2754, 2008.

MACORIS, M. et al. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of São Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MARINI, F. et al. Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. **Med. Vet. Entomol.**, v. 24, n. 4, p. 361-368, 2010.

MARRELLI, M. T. et al. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 13, p. 5580-5583, 2007.

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

MARSHALL, J. M.; HAY, B. A. Inverse Medea as a novel gene drive system for local population replacement: a theoretical analysis. **J. Hered.**, v. 102, n. 3, p. 336-341, 2011.

MARSHALL, J. M. et al. Perspectives of people in Mali toward genetically-modified mosquitoes for malaria control. **Malar. J.**, v. 9, p. 128, 2010.

MATHUR, G. et al. Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 753-763, 2010.

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

MCINNIS, D. O.; LANCE, D. R.; JACKSON, C. G. Behavioral resistance to the sterile insect release technique by the Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae) in Hawaii. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 89, p.739-744, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. NOTA TÉCNICA CGPNCD/DEVEP/SVS. Brasília. 2010. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>> Acesso em: 25 Mar. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tabulação de Dados - Dengue. 2011.

MORLAN, H. B. et al. Field tests with sexually sterile males for control of *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v. 22, n. 3, p. 295-300, 1962.

MUIR, L. E.; KAY, B. H. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 3, p. 277-282, 1998.

NASCI, R. S. A lightweight battery-powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. **Mosq. News**, v. 41, n. 4, p. 808-811, 1981.

NAZNI, W. A. et al. Susceptibility status of transgenic *Aedes aegypti* (L.) against insecticides. **Dengue Bull.**, v. 33, p. 124-129, 2009.

NIEBYLSKI, M. L.; CRAIG, G. B. Jr. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 10, n. 3, p. 339-343, 1994.

OLIVEIRA, S. L et al. Mosquito transgênico do papel para realidade. **Rev. Biol.**, v. 6b, p. 38-43, 2011.

PARIS, M. et al. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*." **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1184-1194, 2011.

PARIS, M. et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest. Manag. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 122-128, 2010.

PAUPY, C. et al. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, n. 4, p. 473-480, 2010.

PHUC, H. K. et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.**, v. 5, p. 1-11, 2007.

REITER, P. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 2, p. 177-179, 1995.

- RENDON, P. et al. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. **J. Econ. Entomol.**, v. 97, n. 5, p. 1547-1553, 2004.
- RUSSELL, R. C. et al. Mark-release-recapture study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. **Med.Vet. Entomol.**, v. 19, n. 4, p. 451-457, 2005.
- SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol.**, v. 7, p. 1-13, 2007.
- SCHLEIER, J. J.; PETERSON, R. K. D. Toxicity and risk of permethrin and naled to non-target insects after adult mosquito management. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1140–1146, 2010.
- SILVA, V. C. et al. Comparative study between larvitrap and ovitrap for evaluating the presence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Campo Grande, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 6, p. 730-731, 2009.
- SILVER, J. B. **Mosquito ecology: field sampling methods.** New York: Springer, 2008. 1477p.
- SUAYA, J. A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 5, p. 846-855, 2009.
- TAUIL, P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cad. Saude. Publ.**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.
- TEIXEIRA, M. G. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.
- THOMAS, D. D. et al. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science**, v. 287, n. 5462, p. 2474-2476, 2000.
- TINDANA, P. O. et al. Grand Challenges in Global Health: Community Engagement in Research in Developing Countries. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1451-1455, 2007.
- TOMA, L. et al. *Aedes aegypti*: risk of introduction in Italy and strategy to detect the possible re-introduction. Rome: IstitutoSuperiore di Sanità, 2011. Disponível em: <http://www.izs.it/vet_italiana/collana_di_monografie/mon23_2_Toma.pdf> Acesso em: 17 de Mar. 2011.
- TRAVANTY, E. A. et al. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 34, n. 7, p. 607-613, 2004.

TRPIS, M. et al. Estimates of population size, dispersal, and longevity of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by mark-release-recapture in the village of ShauriMoyo in eastern Kenya. **J. Med. Entomol.**, v. 32, n. 1, p. 27-33, 1995.

UNIVERSIDADE DE ESTADUAL DE CAMPINAS, (UNICAMP). Ciclo de vida mosquito *Aedes aegypti*. Campinas, 2001.

VONTAS, J. et al. Transcriptomics and disease vector control. **BMC Biol.**, v. 8, p. 52-55, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>> Acesso em: 18 Mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Health topics – Dengue. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>> Acesso em: 19 Mar. 2011.

WILLIAMS, C. R. et al. The extinction of dengue through natural vulnerability of its vectors. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 12, p. e922, 2010.

WINDBICHLER, N. et al. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, n. 17, p. 5922-5933, 2007.

YAHARA, K. et al. Evolutionary maintenance of selfish homing endonuclease genes in the absence of horizontal transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 44, p. 18861-18866, 2009.

ZHANG, Q. et al. Temporally and spatially controlled expression of transgenes in embryonic and adult tissues. **Transgenic Res.**, v. 19, n. 3, p. 499-509, 2009.

