

## CAPÍTULO 18

1

# Mosquitos Transgênicos para o Controle de Doenças Tropicais.

**André L. da Costa-da-Silva<sup>1</sup>, Ceres Maciel<sup>1</sup>, Luciano A. Moreira<sup>2</sup>  
& Margareth L. Capurro<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP, 05508-900, Tel: (11) 3091-7336, Fax: (11) 3091-7417, Email: [mcapurro@icb.usp.br](mailto:mcapurro@icb.usp.br).

<sup>2</sup>Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Laboratório de Malária, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG, 30190-002, Tel: (31) 3349-7772, Fax: (31) 3295-3115, Email: [luciano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:luciano@cpqrr.fiocruz.br).

Copyright: © 2012 [André L. da Costa-da-Silva, Ceres Maciel, Luciano A. Moreira, Margareth L. Capurro]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Considerações Iniciais

Doenças tropicais, causadas por patógenos transmitidos por insetos vetores, matam milhões de pessoas a cada ano e as estratégias atuais de controle destas doenças, como inseticidas e drogas não têm sido eficientes. Por este motivo, o uso de novos meios para o combate às doenças como dengue e malária é de extrema importância. Progressos no estudo de mosquitos vetores e suas interações com patógenos levaram os cientistas à idealização de um novo método de controle, no qual a manipulação genética dos mosquitos poderia torná-los vetores ineficientes. Neste capítulo, revisamos os avanços na introdução de genes exógenos na linhagem germinativa de mosquitos, desde a caracterização de promotores específicos de certos tecidos para utilização na direção da expressão de genes, até a identificação de produtos gênicos que bloqueiam o parasita ou impedem a replicação viral no vetor, bem como discutimos a geração de linhagens de mosquitos transgênicos, menos eficientes na transmissão dos patógenos causadores da malária e, mais recentemente também dos sorotipos do vírus dengue. Além disso, discutimos o aperfeiçoamento da técnica de esterilização de machos através da geração de linhagens transgênicas e os recentes avanços para a aplicação desta estratégia. Por enquanto, muitos progressos já foram obtidos e, embora mosquitos transgênicos voltados à supressão de populações estejam sendo liberados em campo para testes, será ainda necessário o aperfeiçoamento do método para que linhagens transgênicas que visam à substituição de populações, através da fixação de alelos refratários, possam ser introduzidas na natureza. Mas a perspectiva é que estes métodos em breve possibilitem uma ação eficiente na diminuição e controle da transmissão de doenças, sendo utilizados de forma integrada aos controles tradicionais.

## Introdução

Muitas doenças causadas por vírus, protozoários e helmintos são transmitidas aos humanos por mosquitos e respondem por mais de dois milhões de mortes anuais no mundo. Este número alarmante está relacionado diretamente com o crescimento populacional acelerado, aumento de áreas urbanizadas sem planejamento, falta de saneamento, desmatamento, deslocamento passivo de patógenos e vetores por longas distâncias com a movimentação humana, bem como a ocorrência de parasitas insensíveis às drogas e vetores resistentes aos inseticidas. Juntos, estes fatores contribuem decisivamente nas dificuldades mundiais de controle de importantes doenças transmitidas por vetores. Dentre elas, os exemplos mais marcantes são: a malária, transmitida por mosquitos anofelinos; a leishmaniose por flebotomíneos; e a febre amarela e a dengue, ambas transmitidas principalmente pelo culicídeo *Aedes aegypti*.

Historicamente, dois métodos são utilizados no controle de doenças humanas e veterinárias transmitidas por artrópodes: desenvolvimento e uso de vacinas para protegerem humanos e animais domésticos da infecção; e a eliminação dos vetores. Mesmo com esforços científicos, vacinas eficazes

contra malária, dengue e leishmaniose ainda não estão comercialmente disponíveis. Além disso, a eliminação dos vetores esbarra em problemas multifatoriais como extinção de programas de saúde pública que buscam controlar estes insetos e seleção de indivíduos resistentes aos pesticidas usados nas populações-alvo.

No caso de malária e dengue, métodos profiláticos no combate ainda se focam no bloqueio da transmissão pela redução das populações de mosquitos. A propagação do uso de inseticidas foi responsável pela eliminação da malária em vários países, sendo o método mais eficiente na prevenção da doença. Tanto que o uso de redes impregnadas com inseticidas protegendo camas, mostrou ser uma importante estratégia para diminuição da transmissão dessa doença na África. Estratégias de aplicação de inseticidas também foram massivamente utilizadas no controle de *Ae. aegypti*, por longos períodos, em diversas regiões tropicais e subtropicais. Estes programas estão sendo desencorajados, pois estudos demonstram que ocorre a diminuição da presença de anticorpos protetores nas populações de risco nos casos de malária, assim como seleções de populações resistentes aos inseticidas (WHO, 2006).

Recentemente, algumas das doenças transmitidas por artrópodes, as quais foram controladas no passado, estão ressurgindo nos locais originais de suas antigas distribuições e também estão emergindo em novas áreas geográficas. Em consequência, atualmente as taxas estimadas de morbidade e mortalidade associadas a estas doenças são atualmente preocupantes, sendo ainda favorecidas pela existência de bilhões de pessoas sob risco de infecção.

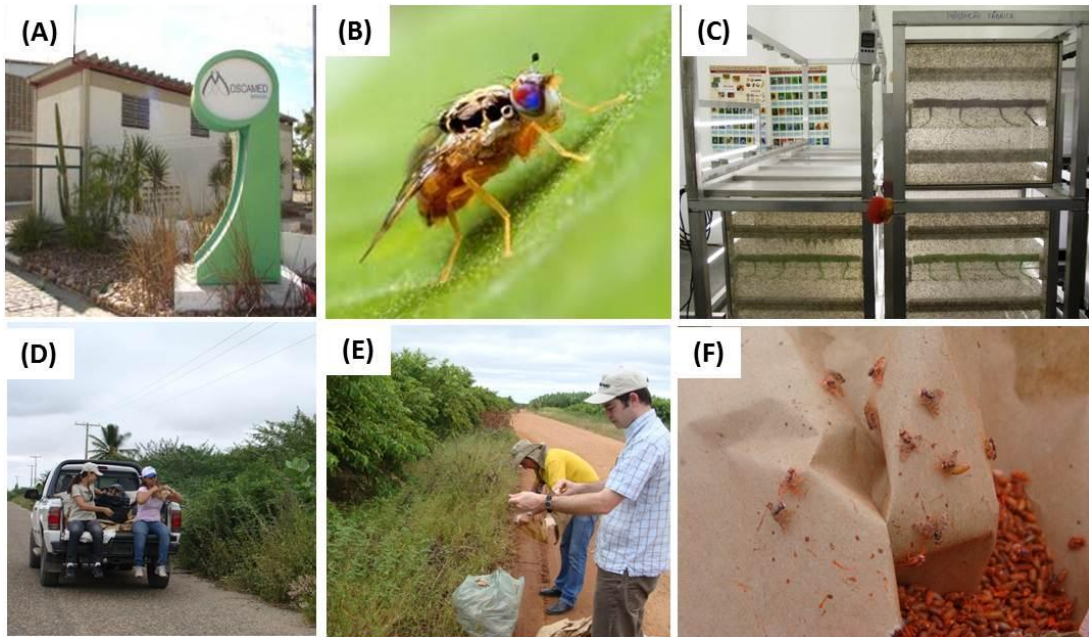
Desta forma, o aumento da importância destes patógenos na saúde pública, as falhas nos métodos convencionais de controle e a falta de alternativas frente à resistência dos vetores aos pesticidas e dos patógenos às drogas, demonstram a necessidade de estratégias novas e eficazes de controle para estas doenças.

Uma via alternativa no combate à transmissão de malária e dengue foi proposta há 15 anos. Este novo método consiste na manipulação genética de mosquitos vetores para impedir suas habilidades de se infectarem e transmitirem plasmódios e vírus da dengue. Há muitos aspectos metodológicos e éticos que devem ser tratados considerando esta estratégia. Neste capítulo, serão discutidas as formas de geração de mosquitos incapazes de transmitir certos patógenos e como propagar e controlar este fenótipo em populações naturais, bem como os aspectos éticos relacionados ao tema.

### **Métodos de Redução da Capacidade Vetorial de Mosquitos - Técnica do Inseto Estéril.**

A primeira idéia do uso de controle genético de mosquitos para combater uma doença surgiu há mais de 40 anos. Knippling propôs a liberação de machos estéreis para diminuir a transmissão ou a população de insetos (Knippling, 1959; Knippling e cols., 1968). Esta estratégia nomeada de Técnica do Inseto Estéril (do inglês – Sterile Insect Technique - SIT) mostrou resultados positivos com a eliminação da mosca varejeira *Cochliomya hominivorax* do sul dos E.U.A.,

México e América Central (Wyss, 2000). A técnica consiste na produção de machos estéreis pela irradiação por raios-X e liberação destes insetos em campo para competirem com machos selvagens, sendo que fêmeas copuladas por machos irradiados não produzem descendentes (Figuras 1 e 2). Esta metodologia foi testada com anofelinos em laboratório e mostrou resultados promissores, mas experimentos de campo indicaram menor eficiência (Andreasen e Curtis, 2005; Benedict e Robinson, 2003). Além disso, a separação de insetos machos por métodos físicos, os quais não são facilmente realizados para a maioria das espécies de vetores, incluindo mosquitos anofelinos (Alphey e Andreasen, 2002), competitividade reduzida de cópula dos machos estéreis comparados com os insetos selvagens (Benedict e Robinson, 2003) e ocorrência de espécies emergentes de anofelinos vetores de malária, com preferências ecológicas diferentes e isolamento reprodutivo pré-zigótico significativo (Stump e cols., 2005), constituem limitações desta técnica. Dada às dificuldades da SIT, o método de gerar um mosquito transgênico que impeça a transmissão de patógenos, através da substituição ou supressão de populações do inseto surge como mais uma estratégia alternativa para ser incorporada nos métodos tradicionais de controle.



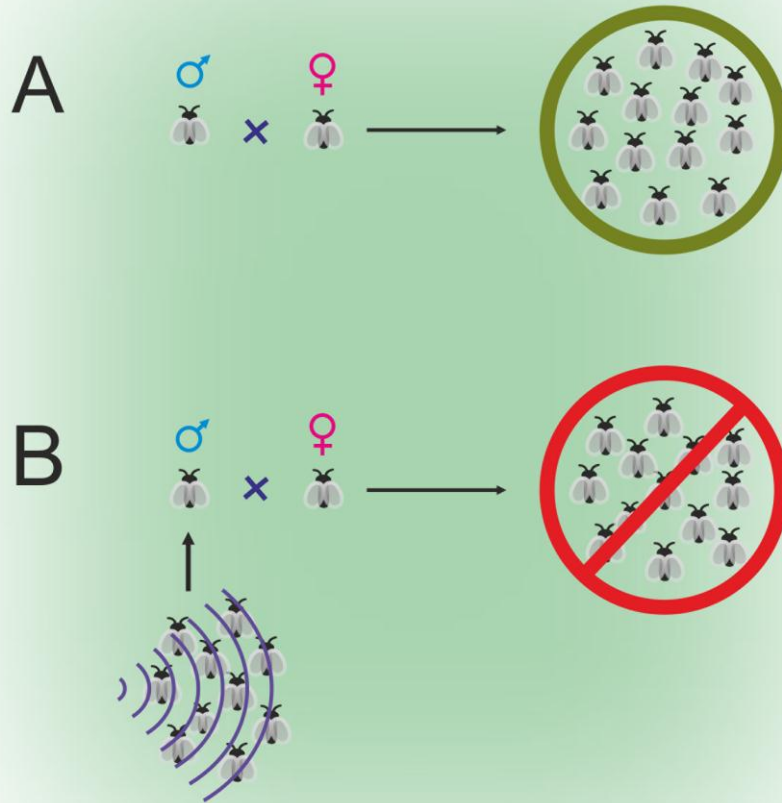
**Figura 1. Produção em massa de machos estéreis de *Ceratitís capitata*.** (A) imagem da biofábrica Moscamed; (B) macho estéril da mosca da fruta; (C) local de criação em massa de insetos estéreis; (D, E) liberação de machos; (F) imagem dos pacotes contendo machos estéreis antes da liberação.

## Transformação de Mosquitos.

Há quase três décadas atrás Rubin & Spradling (1982) publicaram a primeira demonstração de modificação genética em um inseto. Eles mostraram que o elemento P de transposição poderia ser utilizado para introduzir genes nas células germinativas de *Drosophila*. Infelizmente, após muitos anos de tentativas em outros sistemas concluiu-se que este elemento de transposição só pode ser utilizado para transformar moscas pertencentes ao gênero *Drosophila*. Isto resultou em atrasos consideráveis para a transformação de não-drosofilídeos. Na verdade, no primeiro relato de transformação de mosquitos, se utilizou o elemento P (Miller e cols., 1987), mas a análise dos insetos transformados indicou que a integração ocorreu por acaso, não estando relacionado ao elemento de transposição. É possível que os trabalhos publicados sobre a utilização do elemento P na transformação de *Ae. aegypti* (Morris e cols., 1989) e *Ae. triseriatus* (McGrane e cols., 1988) foram também devido ao mesmo evento não dependente do transposon. O fato é que somente 14 anos após o trabalho de Miller e cols. (1987), foi possível a obtenção da transformação estável de *Anopheles gambiae* (Grossman e cols., 2001).

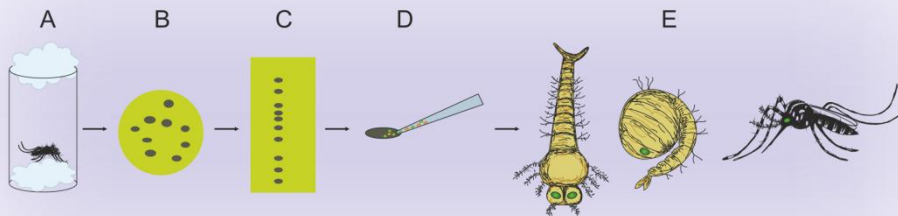
- **Ferramentas e passos necessários** - As ferramentas básicas necessárias à produção de um vetor transgênico refratário ao patógeno incluem: a identificação de sistemas eficientes de transformação e direção de transfecção, a busca de genes repórteres adequados, a caracterização de eficientes promotores tecido-estádio-específicos, a descoberta de genes efetores anti-patógenos apropriados e o desenvolvimento de técnicas eficientes de transformação (Figura 3).

A primeira questão que surge quando pensamos em mosquitos transgênicos é como encontrar uma ferramenta eficiente para introduzir um gene exógeno em mosquitos. Nas últimas décadas, diferentes técnicas estáveis e instáveis de transformação foram desenvolvidas e amplamente empregadas tais como: sistemas de expressão viral, elementos de transposição e endo-simbiontes.



**Figura 2. Supressão de população:** (A) Cruzamento de macho selvagem com fêmea selvagem, gerando descendentes; (B) Machos estéreis pela irradiação por raios-X liberados em campo para competirem com machos selvagens, sendo que fêmeas copuladas por machos irradiados não produzem descendentes.

A segunda barreira que deve ser superada na construção de um mosquito transgênico é como introduzir estes novos genes nos mosquitos. Até agora, o método mais eficiente é a microinjeção da construção gênica durante a formação dos embriões, uma técnica desenvolvida para drosofilídeos, mas que ainda consome muito tempo e apresenta baixa eficiência. Na literatura, existe um relato de utilização de biobalística (técnica que envolve o bombardeamento de partículas de DNA, sob alta pressão) em *Anopheles gambiae* (Mialhe e Miller, 1994), mas infelizmente esta técnica não se desenvolveu. Outro problema considerável é a identificação dos insetos transformados. Atualmente, diferentes marcadores para detecção das linhagens transgênicas estão disponíveis.



**Figura 3. Representação esquemática da microinjeção de embriões de *Aedes aegypti*:** (A) Montagem da postura forçada; (B) Papel filtro com ovos; (C) Ovos alinhados para a microinjeção; (D) Microinjeção dos ovos embrionados – círculo laranja (plasmídeo doador), círculo verde (plasmídeo auxiliar); (E) Larva, pupa e adulto transgênico de *Aedes aegypti*.

Finalmente, o transgene deve ser disseminado de forma eficiente em populações naturais. Existem dúvidas se estratégias baseadas somente em sistemas apresentando herança Mendeliana são funcionais, já que este método de introdução de genes em populações naturais requereria uma enorme quantidade de mosquitos para introdução e um grande número de gerações para a fixação do transgene na população. Então, mecanismos como elementos móveis de DNA ou outras formas de inserção de material genético, que se propagam de uma maneira não Mendeliana (ex. bactérias simbiotes), têm sido escolhidos para produção de mosquitos transgênicos (Kidwell e Ribeiro, 1992; Curtis e Sinkins, 1998).

Sistemas virais de tradução instável também têm sido utilizados quando um número relativamente grande de moléculas necessita ser selecionado, como na caracterização de moléculas efetoras anti-patógenos e para analisar,

por exemplo, se um gene isolado de mosquito está envolvido na condição da competência vetorial (Handler e James, 2000).

**- Elementos de transposição** - Elementos de transposição, ou elementos genéticos móveis, são componentes integrais de genomas eucarióticos. Os elementos usados para modificação genética dos insetos são replicados como DNA e integrados em cromossomos pela enzima transposase, a qual é codificada pelo próprio elemento móvel. Os elementos de transposição utilizam sequências de DNA capazes de reconhecerem sequências específicas do hospedeiro (no nosso caso de mosquitos), cortando naquele ponto de reconhecimento e inserindo-se repetidamente em diferentes locais dos cromossomos (para uma revisão, ver Atkinson e cols., 2001).

Através da engenharia genética foi possível retirar o gene codificador da transposase do elemento móvel e expressá-lo via um plasmídeo auxiliar (“helper”). Com isso, após a integração o transgene é fixado dentro do genoma do inseto. Este mecanismo de utilização de dois plasmídeos, sendo um carregando o gene que codifica a transposase e outro com as construções de marcação e da molécula efetora, é chamado de sistema de transformação bipartido.

Para mosquitos, os elementos de transposição utilizados com sucesso na transformação foram: *Hermes* da mosca doméstica (Warren e cols., 1994); *mariner* ou *Mos1* de *Drosophila mauritiana* (Medhora e cols., 1991); *Minos* da *D. hydei* (Franz & Savakis, 1991) e o *piggyBac* de *Trichoplusia ni* (Cary e cols., 1989) (ver exemplos na Tabela 1). Este último tem se mostrado um vetor “promíscuo” em um grande número de ordens de insetos, diferentes espécies de mosquitos e em até outros organismos mais distantes como em planárias (Gonzalez-Estevez e cols., 2003), camundongos (Ding e cols., 2005) e *Plasmodium falciparum* (Balu e cols., 2005).

Estes vetores têm vantagens e desvantagens: *Hermes*, por exemplo, tem um comportamento de transposição diferente em mosquitos, pois ao integrarse há também a inserção de sequências flanqueadoras do plasmídeo no genoma dos mosquitos (Jasinskiene e cols., 1998, 2000; Pinkerton e cols., 2000; Allen e cols., 2001); *piggyBac* se integra precisamente no genoma do inseto em sítios contendo a sequência TTAA (Cary e cols., 1989). Por causa da sua larga funcionalidade em muitas espécies de insetos e taxas de transformação relativamente altas (até 60% em Coleoptera, Berghammer e cols., 1999) e pela perfeita integração (Grossman e cols., 2000, 2001; Kokoza e cols., 2001, Nolan e cols., 2002), o *piggyBac* se mostra vantajoso sobre os demais elementos citados acima.



**Tabela 1. Principais trabalhos utilizando elementos de transposição na transformação de mosquitos.**

Elemento de transposição	Origem	Mosquito transformado	Referência
<i>Hermes</i>	<i>Musca domestica</i>	<i>Aedes aegypti</i>  <i>Culex quinquefasciatus</i>	Jasinskiene e cols., 1997; Kokoza e cols., 2000; Moreira e cols., 2000; Pinkerton e cols., 2000.  Allen e cols., 2001.
<i>mariner</i> ou <i>Mosl</i>	<i>Drosophila mauritiana</i>	<i>Ae. aegypti</i>	Coates e cols., 1998; Moreira e cols., 2000; Franz e cols., 2006.
<i>Minos</i>	<i>Drosophila hydei</i>	<i>Anopheles stephensi</i>	Catteruccia e cols., 2000 Lycett e cols., 2004.
<i>piggyBac</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Ae. aegypti</i>  <i>An. stephensi</i>  <i>An. gambiae</i>  <i>An. albimanus</i>  <i>Ae. fluviatilis</i>	Kokoza e cols., 2001  Ito e cols., 2002; Moreira et al, 2002; Nolan e cols., 2002.  Grossman e cols., 2001; Kim e cols., 2004.  Perera e cols., 2002.  Rodrigues e cols., 2006; 2008.

## Endossimbiontes

Um mecanismo alternativo para introduzir um gene efetor em uma população de vetores envolve o uso da bactéria simbiote *Wolbachia* na qual infecta uma variedade de insetos. Uma característica interessante da *Wolbachia* é a sua incompatibilidade citoplasmática. Somente quando um macho infectado com a bactéria copula com uma fêmea infectada há viabilidade dos ovos, e as bactérias são transmitidas via transovariana para a próxima geração (Werren e cols., 2008). Este efeito permite o aumento do sucesso reprodutivo e como consequência, promoveria uma rápida disseminação do transgene caso *Wolbachia* modificadas geneticamente fossem utilizadas para gerar mosquitos que bloqueiam a transmissão de parasitas. Entretanto, infelizmente ainda não se conseguiu transformar essa bactéria experimentalmente.

Mais recentemente a *Wolbachia* tem sido utilizada já a nível de campo como uma alternativa de controle de dengue. Uma cepa dessa bactéria originária de *Drosophila* (wMelPop) foi inserida em *Ae. aegypti*, que naturalmente não hospeda a *Wolbachia* (McMeniman e cols., 2009). Uma grande surpresa foi que mosquitos contendo a bactéria bloqueiam o vírus da dengue, o Chikungunya e também o parasito da malária aviária, *Plasmodium gallinaceum* (Moreira e cols., 2009), o que pode abrir importante possibilidade para controle de malária humana quando mosquitos anofelinos hospedarem essa bactéria. Experimentos de campo já se encontram em andamento na Austrália para testar a possibilidade de mosquitos infectados com *Wolbachia* serem utilizados no combate à dengue ([www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)).

Outra opção que vem sendo também testada em alguns laboratórios é a técnica de para-transgênese, que consiste na transformação de bactérias simbiotes para que estas expressem o gene de bloqueio contra o protozoário ou o vírus. Neste caso o mosquito se infectaria, de alguma forma, com a bactéria transformada e esta bloquearia o desenvolvimento da doença no inseto. Esta técnica vem sendo desenvolvida para o barbeiro *Rhodnius prolixus* (Dotson e cols., 2003) e mais recentemente a bactéria do gênero *Asaia* vem ganhando atenção como possível candidata à paratransgênese pois sua transformação foi estabelecida (Favia e cols., 2008; Crotti e cols., 2010).

## Vírus

A infecção de mosquitos com vírus começou com experimentos em culturas de células. Resultados positivos de infecção foram obtidos primeiramente com o vírus Sindbis (SIN) em uma variedade de células eucarióticas (Xiong e cols., 1989) e rapidamente tornou-se uma ferramenta para expressar fontes diferentes de proteínas em modelos eucarióticos. O vírus Sindbis do gênero *Alphavirus* e da família *Togaviridae* possui um genoma de RNA senso-positivo de 11.703 nucleotídeos e proteínas estruturais e não-estruturais codificadas por dois diferentes promotores.

O ciclo de infecção natural de Sindbis envolve pássaros e mosquitos do gênero *Culex* (Taylor e cols., 1955), sendo também capaz de infectar mosquitos do gênero *Aedes* e *Anopheles* (Hurlbult e Thomas, 1960). O RNA infectivo pode ser obtido por transcrição *in vitro* e dois tipos de vetor de expressão foram desenvolvidos: dsSIN (ds - do inglês double-subgenomic) TE/3'J, que possui um promotor interno duplicado pelo qual o transgene pode ser expresso; e o replicon SIN, no qual os genes das proteínas estruturais foram deletados e substituídos por material genético heterólogo de 6.000 pares de bases (Rice e cols., 1987). Vírions infectantes são produzidos diretamente pela injeção do RNA transcrito de TE/3' J em células eucarióticas competentes, enquanto que a produção do replicon SIN necessita de uma co-infecção de células com um vírus auxiliar expressando genes estruturais do vírus.

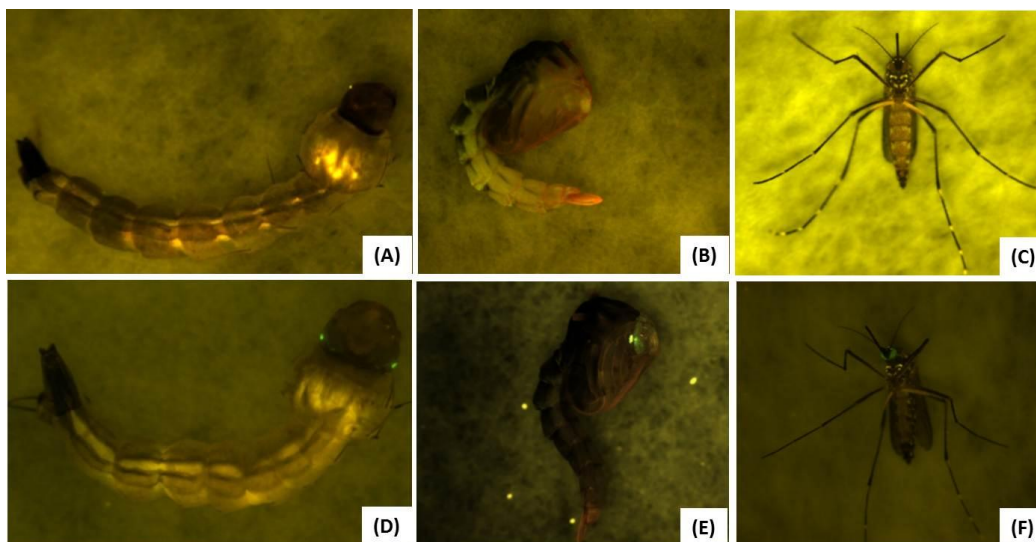
Com isso, a transfecção de insetos pelo sistema transiente de expressão SIN emergiu como uma ferramenta alternativa que pode ser largamente usada em laboratório para testes relativamente fáceis e eficientes de genes que impeçam a transmissão de patógenos. A maioria dos experimentos em mosquitos tem sido realizada em *Ae. aegypti*, objetivando demonstrar a eficiência de moléculas efetoras tais como RNAs anti-senso no bloqueio da transmissão de Dengue, Febre amarela e vírus LaCrosse (Powers e cols., 1996; Olson e cols., 1996). A mesma estratégia foi usada para caracterizar anticorpos recombinantes de cadeia-simples como moléculas alvo para bloquear a transmissão de malária utilizando o modelo de malária aviária *P. gallinaceum* infectando mosquitos *Ae. aegypti* (de Lara Capurro e cols., 2000). Os sistemas virais também foram usados para silenciar a expressão de genes endógenos e caracterizar rapidamente moléculas dos vetores *in vivo* (Johnson e cols., 1999). Sistemas de expressão viral, como Sindbis, contribuem para um melhor entendimento da biologia de vetores de doenças humanas e para caracterizar moléculas-alvo importantes com potencial de bloqueio da transmissão de patógenos.

### Como os Transgênicos são Detectados ?

Nos primeiros trabalhos de transformação de mosquitos foram utilizados genes de resistência aos inseticidas e antibióticos como marcadores (Miller e cols., 1987; McGrane e cols., 1988; Morris e cols., 1989). Posteriormente, concluiu-se que estes marcadores estariam gerando falso-positivos quando era realizado o rastreamento de transformados. O uso de genes para resgate da mutação responsável pela cor de olhos provou ser de grande sucesso em *Drosophila*. Uma grande descoberta foi que o gene cinnabar de *Drosophila*, que codifica a enzima quinurenina hidroxilase, poderia resgatar a mutação de olhos brancos em *Ae. aegypti* (Cornel e cols., 1997). Usando este marcador de cor de olhos Coates e cols. (1998, 1999) e Jasinskiene e cols. (1998) relataram pela primeira vez uma transformação estável em mosquitos, da espécie *Ae. aegypti*, utilizando os elementos de transposição *Hermes* e *Mariner*. Atualmente, este marcador é ainda empregado e, embora eficiente, ele só pode ser usado em organismos nos quais um mutante de cor de olhos e um clone do tipo selvagem esteja disponível, fato raro em mosquitos. Outro problema deste

marcador é que o fenótipo somente pode ser observado em estágio adulto dos mosquitos transformados.

Um grande avanço na técnica foi a utilização da proteína verde fluorescente (GFP), clonada de uma água-viva da espécie *Aequorea victoria*, como um marcador para transformação de insetos. A expressão de GFP sendo dirigida pelo promotor de actina de *Drosophila* foi utilizada pela primeira vez em *Ae. aegypti* (Pinkerton e cols., 2000). Além de ser universal, a GFP tem a vantagem de os transgênicos poderem ser visualizados em fases larvais. Construções gênicas do GFP dirigido pelos promotores da poliubiquitina (Handler & Harrell, 1999; Perera e cols., 2002) e pelo PAX olho-específico (Horn e cols., 2000; Kokoza e cols., 2001; Ito e cols., 2002; Moreira e cols., 2002) também foram testados. Dentre estes, o promotor específico de olhos é mais adequado, pois a expressão do GFP ocorre somente em tecidos neurais o que reduz os possíveis efeitos tóxicos desta proteína (ver Fig. 1). A GFP tem sido o marcador de maior preferência e além de *Ae. aegypti* (Pinkerton e cols., 2000; Kokoza e cols., 2001), já foi utilizado em *Culex quinquefasciatus* (Allen e cols., 2001), *An. stephensi* (Catteruccia e cols., 2000; Ito e cols., 2002; Moreira e cols., 2002), *An. gambiae* (Grossman e cols., 2001), *An. albimanus* (Perera e cols., 2002) e mais recentemente em *Ae. fluviatilis* (Rodrigues e cols., submetido). Este marcador teve sua expressão melhorada e ganhou uma letra a mais em seu nome (EGFP, o E significando *enhanced* ou melhorado) (Horn e Wimmer, 2000). Estes autores desenvolveram, na mesma linha do EGFP, outros marcadores fluorescentes como o DsRed (vermelho), o EYFP (amarelo), e o ECFP (azul), que podem ser utilizados em conjunto para, por exemplo, detectar a expressão dupla de genes de bloqueio (Figura 4).



**Figura 4. Expressão da Proteína Verde Fluorescente (EGFP) nos olhos de mosquitos *Ae. aegypti* transgênicos.** (A, B e C) larva, pupa e adultos não transgênicos, respectivamente. (D, E e F) larva, pupa e adulto transgênicos, respectivamente.

## Como Dirigir a Expressão de um Transgene ?

Para que um gene externo possa ser expresso é necessária a ação de uma sequência promotora. Quando possível, é vantajoso que o promotor dirija a expressão do transgene de uma forma específica a um tecido e num determinado momento, de acordo com o ciclo de vida do parasita dentro do mosquito vetor e o período desejado para a expressão da molécula efetora. Por exemplo, no caso do parasita da malária, como os gametócitos e os oocinetos estão no interior da luz do intestino, um promotor específico do intestino será mais adequado para secretar um produto gênico logo após o repasto sanguíneo. Por outro lado, para o bloqueio de esporozoítas seria interessante termos disponíveis promotores específicos do corpo gorduroso ou da glândula salivar do mosquito. Em teoria, promotores ubíquos, que estão ativos em todos os tecidos e a qualquer momento, deveriam ser úteis, apesar de termos que estar atentos a possíveis problemas de desempenho que essa expressão generalizada pode causar ao inseto.

Para bloquear esporozoítos nas glândulas salivares, Coates e cols. (1999) estudaram as supostas sequências dos promotores da Apirase e do tipo Maltase de *Ae. aegypti*, em mosquitos transgênicos. Embora tenham detectado especificidades temporal, de tecido e de sexo, a expressão induzida foi de certa forma fraca, o que o limita estes promotores na direção da expressão de transgenes anti-parasitas. Kokoza e cols. (2000) usaram o promotor da vitelogenina de *Ae. aegypti* para dirigirem uma forte expressão da defensina do mosquito (um peptídeo antimicrobiano) na hemolinfa de fêmeas transgênicas de *Ae. aegypti*. No intestino de mosquitos, Moreira e cols. (2000) demonstraram que ambos os promotores da carboxipeptidase de *An. gambiae* e de *Ae. aegypti* (Edwards e cols., 1997; Edwards e cols., 2000) puderam dirigir uma forte expressão induzida pelo repasto sanguíneo de um transgene em *A. aegypti*. A expressão foi específica do tecido, de tempo e do sexo (somente em fêmeas). Apesar de as espécies acima serem muito distantes evolutivamente (Service, 1993) a funcionalidade do promotor em ambas as espécies sugere uma forte conservação das sequências regulatórias da carboxipeptidase.

## Genes Anti-Patógenos

A descoberta e caracterização de um gene efetor para interferir no desenvolvimento do parasita/vírus no mosquito é essencial e prévio para geração de um inseto com capacidade vetorial reduzida. Embora haja vários genes candidatos disponíveis de diversas espécies, qualquer efeito deletério destes genes ao vetor alvo deve ser evitado.

Anticorpos de cadeia única (scFv) são moléculas potenciais que podem ser utilizadas na interferência de patógenos. Capurro e cols. (2000) mostraram que o scFv-N2 o qual que reconhece a proteína circunsporozoíta de *Plasmodium gallinaceum* (CSP), quando presente na hemolinfa de mosquitos *Aedes* infectados promovem o bloqueio de 99% da invasão das glândulas salivares pelos esporozoítas. Um outro candidato alternativo para o bloqueio da transmissão foi proposta por Yoshida e cols. (1999), com a utilização de scFv-

Pbs21, que reconhece a proteína 21 de oocinetos de *P.berghei*. A cadeia única se ligou aos oocinetos de *P. berghei* e bloqueou o desenvolvimento por pelo menos 93% destes oocinetos. Também Lal e cols. (2001), trabalhando com diferentes anticorpos monoclonais, contra o intestino dos mosquitos, descobriram que os mesmos apresentavam um largo espectro de atividade, bloqueando o desenvolvimento de ambos *P. falciparum* e *P. vivax* em diferentes espécies de mosquito. Além disto, os monoclonais reduziram a fecundidade e a sobrevivência das fêmeas, o que seria interessante, como os autores discutem, se alguém quiser utilizar estes anticorpos candidatos em vacinas de bloqueio de transmissão (Lal e cols., 2001).

Kokoza e cols. (2000) produziram linhagens transgênicas de *Ae. aegypti* que super-expressavam defensina endógena, dirigida pelo promotor da vitelogenina. Esta defensina foi ativa sobre bactérias e estável na hemolinfa do mosquito por quase três semanas após um único repasto sanguíneo. O efeito sob *Plasmodium* spp. não foi determinado.

Na tentativa de encontrar os ligantes e/ou receptores responsáveis pelo reconhecimento/invasão do intestino e das glândulas salivares do mosquito pelo parasita Ghosh e cols. (2001) rastream uma biblioteca de fagos. Com isso eles identificaram um peptídeo (SM1) que se liga especificamente aos epitélios do intestino e das glândulas salivares, mas não em outros tecidos do inseto. Além disto, quando eles testaram contra *P. berghei* em *An. stephensi*, o SM1 inibiu as invasões do intestino pelos oocinetos e dos esporozoítos nas glândulas salivares (89% a 100%). O próximo passo foi construir um gene híbrido para expressar um tetrâmero de SM1 em mosquitos transgênicos. Ito e cols. (2002) utilizaram o promotor da carboxipeptidase e seu peptídeo sinal (para ser secretado na luz do intestino do mosquito) para dirigir este tetrâmero em *An. stephensi*. Os mosquitos transformados realmente expressaram esse transgene e inibiram a formação de oocistos (69% a 95%) após se alimentarem em um camundongo infectado. O mais importante foi que os mosquitos transgênicos reduziram a capacidade de transmitirem o parasita para um camundongo sadio. A transmissão foi completamente bloqueada em dois de três experimentos e no terceiro, foi bastante reduzida. Este trabalho foi a primeira demonstração de que é possível geneticamente manipular mosquitos anofelinos com reduzida capacidade vetorial. Zieler e cols. (2001), trabalhando com diferentes fontes de fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>), descobriram que particularmente as PLA<sub>2</sub>s de veneno bloqueavam o desenvolvimento de *Plasmodium* no mosquito. O mecanismo de ação não está claro, mas provavelmente seja devido à capacidade das fosfolipases de se inserirem em membranas, o que mascararia os receptores existentes nas células epiteliais do mosquito, os quais o parasita utiliza para reconhecê-las e invadi-las. Usando um destes genes de bloqueio Moreira e cols. (2002) transformaram *An. stephensi* com uma construção similar à utilizada por Ito e cols. (2002), mas ao invés do SM1, colocaram a região codificadora da PLA<sub>2</sub> do veneno de abelha. Os autores detectaram o mRNA da PLA<sub>2</sub> especificamente em intestinos dos mosquitos transgênicos, o que era de se esperar com a utilização de um promotor específico daquele órgão. Foi possível detectar a proteína transgênica por análises de Western blot e de imunofluorescência. Além disto, quando os transgênicos se alimentaram de sangue de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* estes tinham cerca de 87% menos

ocistos em comparação com mosquitos não transformados. A transmissão do parasita para um camundongo sadio foi também bastante reduzida (Moreira e cols., 2002).

Visando o bloqueio do vírus da dengue Franz e cols. (2006) expressaram, em mosquitos *Ae. aegypti*, uma construção contendo uma sequência de RNA invertido contra a proteína pré-membrana do vírus tipo 2 (DEN-2). Com isto, via a expressão estável do RNAi (interferência por RNA), os vírus tiveram sua capacidade de infecção reduzida (pela menor formação do capsídeo viral) o que levou à menor infecção e transmissão do vírus da dengue pelos mosquitos.

A cascata de sinalização insulina/fator de crescimento 1 insulina-like (IIS) desempenha um papel crítico na regulação da imunidade inata e longevidade em uma ampla gama de organismos vertebrados e invertebrados. A IIS é iniciada através da ligação de peptídeos insulina-like (ILPS) ao receptor de insulina, levando a uma série de eventos de fosforilação que inclui a proteína Akt, chave na sinalização. Corby- Harris e cols. (2010) expressaram uma variante da Akt em mosquitos *Anopheles stephensi* e com o aumento dessa cascata de sinalização mostraram que os mosquitos tiveram redução na prevalência e intensidade de *Plasmodium falciparum* (em até 99%), além de redução na longevidade (até 20%).

O peptídeo sintético Vida3 (Arrighi e cols., 2002) foi recentemente expresso em mosquitos *Anopheles gambiae* utilizando o sistema de integrase do fago phiC31 que tem a vantagem de delimitar onde o transgene vai ser integrado (Nimmo e cols., 2006). A expressão do peptídeo possibilitou o bloqueio de até 85% de *Plasmodium yoelli nigeriensis* e proteção similar ocorreu para *P. falciparum*, apesar de apresentar inconsistência entre experimentos (Meredith e cols., 2011).

Infelizmente é muito difícil ocorrer o bloqueio completo com a expressão de somente uma molécula efetora. Para contornar esse problema Kokoza e cols. (2010) co-expressaram cecropina e defensina em mosquitos *Aedes aegypti*, mostrando haver ação cooperativa dos dois peptídeos antimicrobianos. Mosquitos infectados com *Plasmodium gallinaceum* tiveram redução significativa no número de oocistos e, além disto, não foi encontrado nenhum esporozoítio nas glândulas salivares. Houve também bloqueio completo de transmissão do parasito para galinhas sadias.

Já para arboviroses, uma estratégia diferente foi aplicada para um modelo de vírus em mosquitos *Aedes aegypti* (Sindbis) e pode ser aplicada para outras viroses como dengue e Chikungunya. Como os arbovírus são bloqueados naturalmente no mosquito vetor pelo mecanismo de RNAi, Khoo e cols. (2010) produziram mosquitos transgênicos que não tinham a atividade de RNAi e viram que os números de partículas virais foram significativamente reduzidos. Com isso confirmaram que o bloqueio, via RNAi ocorre no intestino do inseto.

Dentro da área de anticorpos, uma proposta inovadora de criar mosquitos que sejam “seringas voadoras” foi recentemente proposta por Matsuoka e cols. (2010). Os mosquitos serviriam para inocular a proteína protetora no homem via picada e com isso, as pessoas produziriam anticorpos contra a proteína, ficando assim resistentes ao parasito da malária. A idéia era

de expressar um fragmento da proteína circumsporozoíta (CSP, proteína majoritária da superfície do esporozoíta) de *Plasmodium* na glândula salivar de mosquitos *Anopheles stephensi* e a mesma seria secretada durante a picada do inseto. Apesar dos autores terem conseguido a expressão de CSP em uma das linhagens de mosquito transgênico, não foi possível conseguir a produção de anticorpos em camundongos mesmo após vários desafios e concluíram que possa ter sido devido a um problema de secreção da proteína na saliva.

A metodologia de utilização de anticorpos de cadeia única (*single chains*) foi recentemente utilizada para produzir moléculas de bloqueio ao *Plasmodium falciparum*. Neste caso, os anticorpos m4B7 e m2A10 foram ligados ao peptídeo antimicrobiano cecropina e o a expressão foi direcionada ao intestino dos mosquitos. Linhagens transgênicas expressando os anticorpos tiveram altos níveis de bloqueio ao *P. falciparum* (em até 97%) mas os autores reafirmam a necessidade de bloqueio completo (Isaacs e cols., 2011) para que a linhagens transgênicas refratárias possam ser utilizadas em campo para controle de patógenos (Figura 5).



**Figura 5. Representação esquemática da construção gênica.** BE: braço esquerdo do elemento de transposição; Seta laranja: promotor para dirigir a expressão do gene marcador; Retângulo verde: gene marcador; Seta azul: promotor para dirigir a expressão do gene anti-patógeno; Retângulo amarelo: gene anti-patógeno; BD: braço direito do elemento de transposição.

### Liberação de Insetos Carregando um Gene Letal Dominante

A geração de linhagens transgênicas de mosquitos através do método de microinjeção de ovos embrionados e utilização de elementos de transposição forneceu uma oportunidade para modernização e aperfeiçoamento da técnica do inseto estéril (SIT). Embora a idéia central de supressão de população de insetos tenha sido mantida, o processo de produção de mosquitos estéreis consiste em um sistema diferenciado, não mais baseado na irradiação e sim, pela introdução de um gene letal dominante repressível na linhagem transformada. Este sistema foi proposto por Thomas e



*cols.* (2000) e Heinrich & Scott (2000) e ambos os trabalhos desenvolveram este sistema em *Drosophila melanogaster*. Thomas e *cols.* (2000) nomearam esta variação do método SIT de “liberação de insetos carregando um gene letal dominante” (do inglês – Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene – RIDL).

De forma geral, o método RIDL baseia-se na inserção de um gene que codifica um fator de transcrição denominado proteína ativadora de transcrição tetraciclina-repressível (tTA). Quando o gene codificante é expresso, este fator atua na ativação da expressão de um segundo gene inserido na linhagem transformada, que produz um produto letal ao mosquito. Porém, a funcionalidade deste fator de transcrição expresso pode ser reprimida pela presença de tetraciclina, havendo assim a regulação condicional da ativação do gene letal (Thomas e *cols.*, 2000; Heinrich & Scott, 2000; revisado em Wilke *et al*, 2009). Além disso, a proteína tTA pode ser ativada sob a direção de promotor gênico sexo-específico, conferindo a letalidade condicional apenas para um determinado sexo do inseto alvo (Thomas e *cols.*, 2000).

No final da última década, o método RIDL foi adaptado para mosquitos e linhagens transgênicas baseadas neste sistema foram obtidas para a espécie *Aedes aegypti* (Phuc e *cols.*, 2007). Funcionalmente, o método RIDL permite que os mosquitos da linhagem transformada sejam criados sob a presença de tetraciclina, que inibe a expressão do gene letal e proporciona a sobrevivência até a fase adulta. Porém, proles geradas pelo cruzamento dos insetos transformados com os selvagens são inviáveis caso não haja tetraciclina no meio de desenvolvimento das fases larvais, para inibição da ativação do gene letal (Wilke *et al*, 2009).

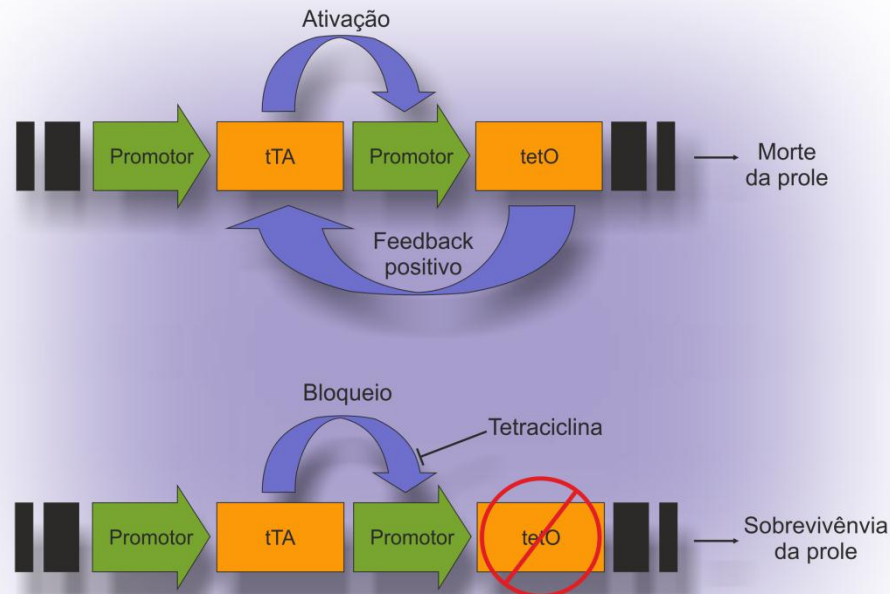
Esta estratégia genética de supressão de populações de mosquito utilizando o método RIDL pode ser aplicada através da criação e liberação em massa de machos transgênicos que carregam um gene letal dominante (Alphey e *cols.*, 2010). Os machos transgênicos liberados cruzam com as fêmeas selvagens, e a prole gerada é inviável, levando a população alvo de controle ao declínio (Alphey e *cols.*, 2010; Horn e Wimmer, 2003).

Atualmente, as linhagens transgênicas de *Aedes aegypti* voltadas à estratégia de supressão de populações constituem a alternativa genética mais concreta para o controle deste mosquito. Em contraposição às estratégias de substituição de populações naturais, o método RIDL não requer a introdução e fixação de alelos na população a ser suprimida (Phuc e *cols.*, 2007), fator positivo em relação aos aspectos legislativos para a regulamentação do uso destas linhagens em campo. Estes testes de liberação estão sendo executados em diversos países, e recentemente resultados promissores foram obtidos nas ilhas Caiman (Enserink, 2010) (Figura 6).

## **Do Laboratório para o Campo**

Uma vez que um mosquito transgênico refratário ao patógeno é obtido no laboratório, o próximo passo é introduzi-lo no meio ambiente para substituir a população de vetores suscetíveis a um patógeno específico. Para atingir este

objetivo, vários aspectos devem ser cuidadosamente investigados tanto nas populações selvagens quanto nas transgênicas.



**Figura 6. Representação esquemática do sistema tTA-tetO em *Aedes aegypti*.** (A) Ativação do sítio tetO e retroalimentação do sistema, causando a morte da prole; (B) Bloqueio do sistema na presença de tetraciclina, devido sua afinidade a tTA. (Thomas, Donnelly e cols. 2000).

Pesquisas recentes têm sido feitas sobre o desempenho dos mosquitos transgênicos, incluindo avaliações de longevidade e fertilidade e uso de populações mantidas em laboratório em relação aos insetos selvagens. A maioria destes estudos, revisados por Riehle (2003) mostraram um desempenho reduzido das linhagens transgênicas, quando comparadas com populações naturais. Por exemplo, a PLA<sub>2</sub> do veneno de abelhas, quando expressa em mosquitos, causa problemas de fertilidade das fêmeas, provavelmente devido à atividade enzimática desta molécula (Moreira e cols., 2004; Abraham e cols., 2005). Por isso, uma forma mutante desta enzima foi expressa em *Ae. fluviatilis*, para evitar problemas de desempenho na espécie transformada, embora mantendo o efeito de bloqueio ao plasmódio (Rodrigues e cols., 2008; Santos e cols., 2010). No caso do peptídeo SM1, expresso em *An. stephensi*, não houve redução detectável do desempenho, possivelmente porque essa proteína foi secretada pelas células, minimizando a toxicidade celular, além de ser uma molécula neutra no intestino do mosquito, evitando assim queda no desempenho dos insetos.

Catteruccia e cols. (2003) também descreveram em quatro 4 linhagens diferentes de mosquitos transgênicos, expressando proteínas repórteres fluorescentes pelo promotor de actina, um desempenho reduzido ao serem comparadas com mosquitos selvagens. Irvin *et al.* (2004) examinaram o impacto da transgênese no desempenho de *Ae. aegypti* transformado com o gene GFP e dois elementos de transposição *Hermes* e *Mos 1 ou mariner*. Os autores detectaram que os parâmetros demográficos diminuíram significativamente nos mosquitos transgênicos em relação às cepas de laboratório não transformadas. Eles sugerem que o desempenho reduzido possa ocorrer devido a diferentes aspectos dos vetores manipulados: depressão por endocruzamento, toxicidade de uma proteína exógena expressa em abundância (Liu *et al.*, 1999); integração aleatória de elementos de transposição, alterando genes importantes do vetor; e presença de repressor regulado negativamente na população transformada do vetor, a qual depois de várias gerações pode inibir gradativamente a transposição. Este último aspecto é de importância prática porque em tais casos os genes podem ser direcionados por uma única vez através da população.

A depressão por endocruzamento é característica de cepas de laboratório de mosquitos transgênicos, já que cada linhagem surge de um simples zigoto fertilizado contendo gametas transgênicos. Desta forma, esta característica pode também reduzir o desempenho dos mosquitos (Taylor *et al.*, 2001).

Ribeiro e Kidwell (1994) e Boete e Koella (2003) desenvolveram um modelo teórico sugerindo que a ausência absoluta de impacto no desempenho não deve ser essencial para introduzir genes na população natural. Os mesmos autores também sugeriram que qualquer liberação de mosquitos precisaria possuir uma refratoriedade próxima a 100% para se obter algum impacto na transmissão de malária. Então, para se obter tal capacidade bloqueadora, será necessário construir mosquitos transgênicos com múltiplos genes refratários, que provavelmente incorrerão em custos severos no seu desempenho final. Entretanto, há considerável falta de dados experimentais que corroborem ou desaproven estes modelos.

A população selvagem alvo deve também ser analisada, principalmente nos locais onde os mosquitos transgênicos forem liberados, de modo que estes organismos possam ser introduzidos sem afetar o ambiente natural circundante. Assim, pesquisas devem ser feitas para definir as populações naturais que serão alvos de intervenção genética, incluindo tamanho, características ecológicas, estrutura da população, padrões migratórios, número e distribuição de populações vetoras geneticamente distintas, etc. Por estes aspectos, vale enfatizar que na transmissão dos patógenos causadores de malária, a ecologia dos vetores é muito complexa em muitos locais. Por exemplo, os principais vetores africanos, *An. gambiae* e *An. funestus* são complexos de sete e nove (pelo menos) espécies, respectivamente, com comportamento e ecologia diferenciados. No Brasil temos o complexo *albitarsis*, que é formado por quatro espécies (*An. albitarsis* ss.; *An. marajoara*; *An. deaneorum* e uma quarta espécie (*An. albitarsis* "B") ainda não descrita (Li e Wilkerson, 2005)).

O comportamento de cópula de mosquitos é outro ponto a ser investigado já que no passado, o baixo sucesso do controle genético de

artrópodes vetores através da técnica do inseto estéril (SIT) foi causado pela baixa competência copulatória dos machos estéreis liberados (Benedict e Robinson, 2003).

Outro aspecto importante para ser averiguado é a biologia dos patógenos alvos de eliminação, principalmente com respeito à plasticidade genômica dos parasitas de malária (Gardner e cols., 2002) e dos atuais quatro sorotipos do vírus dengue. Por isso, estudos de epidemiologia molecular devem ser realizados também nas populações de patógenos, principalmente se o gene efector for baseado em alvos gênicos do parasita. Uma forma de amenizar este problema é a transformação dos mosquitos com moléculas efectoras múltiplas, mas mesmo assim, é importante enfatizar o potencial dos parasitas em escapar dos bloqueios.

Muitos fatores devem ser considerados sobre a eventual liberação de artrópodes vetores geneticamente modificados. Estes incluem potenciais perigos ambientais e riscos à saúde individual e pública. Portanto, estudos de laboratório, simulações-piloto em campo e informação precisa devem ser fornecidos à população, no menor espaço de tempo possível, visando difusão desta tecnologia com embasamento sólido, o que ajudará diminuir conflitos públicos na questão da aprovação desta abordagem de controle (Asner, 1990).

### **Considerações Finais.**

Vários anos de estudos foram necessários para que os cientistas encontrassem elementos de transposição satisfatórios e marcadores de transformação mais adequados. Todo este tempo gasto, englobou também a caracterização de promotores fortes e o desenvolvimento de técnicas eficientes de microinjeção. Agora, muitas ferramentas estão disponíveis e já foi possível demonstrar a obtenção de mosquitos com capacidade de transmissão alterada (Ito e cols. 2002; Moreira e cols. 2002; Kim e cols., 2004; Abraham e cols., 2005; Franz e cols., 2006). Recentemente conseguimos, pela primeira vez na América Latina, aplicar a técnica de transgênese para a espécie *Ae. fluviatilis*, o que abre este campo de estudo no Brasil, com nossas espécies vetores e sob nossas condições (Rodrigues e cols., 2006; 2008) (ver Figura 1). Com a possibilidade real de construção de mosquitos refratários a diversas infecções, outras doenças virais (como discutido por Enserink 2000) ou verminoses transmitidas por vetores poderão ser também controladas.

Muitas descobertas tecnológicas tais como a identificação de outros elementos de transposição mais eficientes e específicos, o encontro de marcadores de transformação com toxicidade cada vez mais reduzida, a caracterização de um número maior de promotores tecido-estágio específicos, com padrões variáveis de expressão, adequando-os na direção de moléculas efectoras com características distintas, o desenvolvimento de técnicas de microinjeção mais refinadas e eficazes, e a descoberta de diversos genes efetores anti-patógenos apropriados ainda serão necessários para um mosquito transgênico ideal. Muitos trabalhos necessitam ser realizados até que a possibilidade de liberação de insetos transgênicos voltados à substituição de populações no meio ambiente possa ser concretizada, para o bloqueio de

importantes doenças humanas. Já para o método RIDL, os resultados das liberações de mosquitos transgênicos realizadas até o momento fornecem uma perspectiva positiva para adoção da estratégia de supressão de populações em programas de controle, realisticamente em um futuro bem próximo.

Caso pensemos na pior hipótese, onde nenhum sucesso aplicável seja verdadeiramente obtido com a utilização de mosquitos transgênicos para o controle de doenças, esta técnica poderá ser extensivamente utilizada no estudo da relação entre parasitas e seus vetores, ampliando o conhecimento da interação entre estes organismos.

### Referências Bibliográficas.

- Allen, M.L., O'Brochta, D.A., Atkinson, P.W., Levesque, C.S., 2001. Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38(5), 701-10.
- Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G.G., Dame, D.A., Service, M.W., Dobson, S.L., 2010. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10(3), 295-311.
- Atkinson, P.W., Pinkerton, A.C., O'Brochta, D.A., 2001. Genetic transformation systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 317-346.
- Balu B, Shoue, D.A., Fraser, M.J. Jr., Adams, J.H., 2005. High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element piggyBac. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (45), 16391-16396.
- Berghammer, A.J., Klingler, M., Wimmer, E.A., 1999. A universal marker for transgenic insects. *Nature.* 402, 370-371.
- Breman, J.G., 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64 (supp), 1-11.
- Capurro, M. de L., Coleman J., Beerntsen, B.T., Myles, K.M., Olson, K.E., Rocha, E., Krettli, A.U., James, A.A., 2000. Virus-expressed, recombinant single chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 427-433.
- Cary, L. C., Goebel, M.J., Corsaro, B., Wang, H.G., Rosen, E., Fraser, M.J., 1989. Transposon mutagenesis of Baculoviruses: analysis of *Trichoplusiani* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156-169.
- Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T.G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos F.C., Crisanti, A., 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature,* 405, 959-962.

- Coates, C.J., Jasinskiene, N., Pott, G.B., James, A.A., 1999. Promoter-directed expression of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of Hermes-transformed *Aedes aegypti*. *Gene* 226, 317-325.
- Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., James, A.A., 1998. *Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3748-3751.
- Corby-Harris, V., Drexler, A., Watkins de Jong, L., Antonova, Y., Pakpou, R. N., Ziegler, R., Ramberg, F., Lewis, E.E., Brown, J.M., Luckhart, S., Riehle, M.A., 2010. Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS Pathog.* 6(7),1001-1003.
- Cornel, A.J., Benedict, M.Q., Rafferty, C.S., Howells, A.J., Collins, F.H., 1997. Transient expression of the *Drosophila melanogaster* cinnabar gene rescues eye color in the white eye (WE) strain of *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 27, 993-997.
- Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., Sacchi, L., Bourtzis, K., Mandrioli, M., Cherif, A., Bandi, C., Daffonchio, D., 2010. Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (21), 6963-6970.
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y., Xu, T., 2005. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 122(3), 473-483.
- Dotson, E.M., Plikaytis, B., Shinnick, T.M., Durvasula, R.V., Beard, C.B., 2003. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. *Infect. Genet. Evol.* 3(2),103-109.
- Edwards, M.J., Lemos, F.J., Donnelly-Doman M., Jacobs-Lorena, M., 1997. Rapid induction by a blood meal of a carboxypeptidase gene in the gut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 12: 1063-1072.
- Edwards, M.J., Moskalyk, L.A., Donnelly-Doman, M., Vlaskova, M., Noriega, F.G., Walker, V.K., Jacobs-Lorena, M., 2000. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Mol. Biol.* 9, 33-38.
- Enserink, M., 2000. New York's deadly virus may stage a comeback. *Science.* 287, 2129-2130.
- Enserink, M., 2010. GM mosquito trial alarms opponents, strains ties in Gates-funded project. *Science.* 330(6007), 1030-1031.
- Favia, G., Ricci, I., Marzorati, M., Negri, I., Alma, A., Sacchi, L., Bandi, C., Daffonchio, D., 2008. Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 627, 49-59.
- Franz A.W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z.N., Blair, C.D., Beaty, B.J., James, A.A., Olson, K.E., 2006. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(11), 4198-4203.

- Franz, G., Savakis, C.C., 1991. *Minos*, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc-1-like family of transposons. Nucl. Acids. Res. 19, 6646.
- FUNASA, 2002. Situação da Prevenção e Controle das Doenças Transmissíveis no Brasil. Ministério da Saúde, 45p.
- Gardner, M.J., Shallom, S.J., Carlton, J.M., Salzberg, S.L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, B., Jarrahi, B., Brenner, M., Parvizi, B., Tallon, L., Moazzez, A., Granger, D., Fujii, C., Hansen, C., Pederson, J., Feldblyum, T., Peterson, J., Suh, B., Angiuoli, S., Perteau, M., Allen, J., Selengut, J., White, O., Cummings, L.M., Smith, H.O., Adams, M.D., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Fraser, C.M., 2002. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. Nature. 419, 531-534.
- Ghosh, A., Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M., 2000. The journey of malaria in the mosquito: hopes for the new century. Parasitol. Today. 16,196-201.
- Ghosh, A.K., Ribolla, P.E., Jacobs-Lorena, M., 2001. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 13278-13281.
- Gonzalez-Estevez, C., Momose, T., Gehring, W.J., Salo, E., 2003. Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye specific GFP marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(24), 14046-14051.
- Grossman, G.L., Rafferty, C.S., Clayton, J.R., Stevens, T.K., Mukabayire, O., Benedict, M.Q., 2001. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the *piggyBac* transposable element. Insect Mol. Biol. 10, 597-604.
- Grossman, G.L., Rafferty, C.S., Fraser, M.J., Benedict, M.Q., 2000. The *piggyback* element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 909-914.
- Handler, A.M., Harrell II, R.A., 1999. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyback* transposon vector. Insect Mol. Biol. 8, 449-457.
- Handler, A.M., 2000. An introduction to the history and methodology of insect gene transfer. in: Handler, A.M., James, A.A. (Eds.), Insect Transgenesis: methods and applications. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-26.
- Heinrich, J.C., Scott, M.J., 2000. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(15), 8229-8232.
- Horn, C., Jaunich, B., Wimmer, E.A., 2000. Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. Dev. Genes Evol. 210, 623-629.
- Horn, C., Wimmer, E.A., 2003. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. Nat. Biotechnol. 21(1), 64-70.

- Isaacs, A.T., Li, F., Jasinskiene, N., Chen, X., Nirmala, X., Marinotti, O., Vinetz, J.M., James, A.A., 2011. Engineered Resistance to *Plasmodium falciparum* Development in Transgenic *Anopheles stephensi*. PLoS Pathog. 7(4), e1002017.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E.A., Jacobs-Lorena, M., 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. Nature. 417, 452-455.
- Jasinskiene, N., Coates, C.J., James, A.A., 2000. Structure of *Hermes* integrations in the germline of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect. Mol. Biol. 9, 11-18.
- Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Rafferty, C.S., James, A.A., Collins, F.H. 1998. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 3743-3747.
- Khoo, C.C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Franz, A.W., 2010. The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. BMC Microbiol. 10, 130.
- Kim, W., Koo, H., Richman, A.M., Seeley, D., Vizioli, J., Klocko, A.D., O'Brochta, D.A., 2004. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. J. Med. Entomol. 41(3), 447-455.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E.A., Raikhel, A.S., 2001. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyback* transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. Insect. Biochem. Mol. Biol. 31, 1137-1143.
- Kokoza, V., Ahmed A., Cho, W., Jasinskiene, N., James, A.A., Raikhel, A.S., 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 9144-9149.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Woon Shin, S., Okafor, N., Zou, Z., Raikhel, A.S., 2010. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107(18), 8111-8116.
- Lal, A.A., Patterson, P.S., Sacci, J.B., Vaughan, J.A., Paul, C., Collins, W.E., Wirtz, R.A., Azad, A.F., 2001. Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 5228-5233.
- Li C., Wilkerson, R.C., 2005. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100(5), 495-500.
- Lobo, N.F., Hua-Van, A., Li, X., Nolen, B.M., Fraser, M.J.Jr., 2002. 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.
- Lycett, G.J., Kafatos, F.C., Loukeris, T.G., 2004. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. *Genetics.* 167(4),1781-1790.
- Matsuoka, H., Ikezawa, T., Hirai, M., 2010. Production of a transgenic mosquito expressing circumsporozoite protein, a malarial protein, in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Acta Med. Okayama.* 64(4),233-241.
- McGrane, V., Carlson, J.O., Miller, B.R., Beaty, B.J., 1988. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 502-510.
- McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N., Fong, A.W., Sidhu, M., Wang, Y.F., O'Neill, S.L., 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science.* 323(5910), 141-144.
- Medhora, M., Maruyama, K., Hartl, D.L., 1991. Molecular and functional analysis of the mariner mutator element *Mos1* in *Drosophila*. *Genetics.*128, 311-318.
- Meredith, J.M., Basu, S., Nimmo, D.D., Larget-Thiery, I., Warr, E.L., Underhill, A., McArthur, C.C., Carter, V., Hurd, H., Bourgouin, C., Eggleston, P., 2011. Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic *Anopheles gambiae* significantly reduces *Plasmodium* infections. *PLoS One.* 6(1), e14587.
- Mialhe, E., Miller, L.H., 1994. Biolistic techniques for transfection of mosquito embryos (*Anopheles gambiae*). *Biotechniques.* 16(5), 924-931.
- Miller, L.H., Sakai, R.K., Romans, P., Gwadz, R.W., Kantoff, P., Coon, H.G., 1987. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science.* 237, 779-781.
- Moreira L.A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E.G., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F., Jacobs-Lorena, M., 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J. Biol. Chem.* 277, 40839-40843.
- Moreira, L.A., Edwards, M.J., Adhami, F., Jasinskiene, N., James, A.A., Jacobs-Lorena, M., 2000. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 10895-10898.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell.* 139(7),1268-1278.
- Kay, K.N., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell.* 139(7), 1268-1278.

- Morris, A.C., 1997. Microinjection of mosquito embryos, in: Crampton, J.M., Beard, C.B., Louis, C. (Eds.), *The molecular biology of insect vectors of disease*. Chapman & Hall, London, pp. 423-429.
- Morris, A.C., Eggleston, P., Crampton, J.M., 1989. Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. *Med. Vet. Entomol.* 3, 1-7.
- Nolan, T., Bower, T.M., Brown, A.E., Crisanti, A., Catteruccia, F., 2002. *PiggyBac* mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein dsRED as a selectable marker. *J. Biol. Chem.* 277, 8759-8762.
- Perera O.P., Harrell II, R.A., Handler, A.M., 2002. 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.* 11(4), 291-297.
- Pinkerton, A.C., Michel, K., O'Brochta, D.A., Atkinson, P.W., 2000. Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 9, 1-10.
- Phuc, H.K., Andreasen, M.H., Burton, R.S., Vass, C., Epton, M.J., Pape, G., Fu, G., Condon, K.C., Scaife, S., Donnelly, C.A., Coleman, P.G., White-Cooper, H., Alphey, L., 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 5, 11.
- Ramaiah, K.D., Das, P.K., Michael, E., Guyatt, H., 2000. The economic burden of lymphatic filariasis in India. *Parasitol. Today* 16, 251-253.
- Rodrigues, F.G., Oliveira, S.B., Rocha, B.C., Moreira, L.A., 2006. Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae) with the piggyback transposable element. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101, 755-757.
- Rodrigues, F.G., Santos, M.N., de Carvalho, T.X., Rocha, B.C., Riehle, M.A., Pimenta, P.F., Abraham, E.G., Jacobs-Lorena, M., Alves de Brito, C.F., Moreira, L.A., 2008. Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. *Insect Mol. Biol.* 17, 175-183.
- Rubin, G.M., Spradling, A.C., 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* 218, 348-353.
- Santos, M.N., Nogueira, P.M., Dias, F.B., Valle, D., Moreira, L.A., 2010. Fitness aspects of transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes expressing a *Plasmodium* blocking molecule. *Transgenic Res.*, 19, 1129-1135.
- Service, M.W., 1993. Mosquitoes (Culicidae), in: Lane, R.P., Crosskey, R.W. (Eds.), *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, London, pp. 120-240.
- Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J., Alphey, L.S., 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science.* 287(5462), 2474-2476.
- Warren, W.D., Atkinson, P.W., O'Brochta, P.W., 1994. The *Hermes* transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short

inverted repeat-type element of the *hobo*, *Ac*, and *Tam3 (hAT)* element family. *Genet. Res. Camb.* 64, 87-97.

Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741-751.

Wilke, A.B., Gomes, A.C., Natal, D., Marrelli, M.T., 2009. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. *Rev. Saude Publica.* 43(5), 869-874.

World Bank Report, 2001. Malaria at a Glance. [http://rbm.who.int/cmc\\_upload/0/000/014/813/Malaria at a glance1.htm](http://rbm.who.int/cmc_upload/0/000/014/813/Malaria_at_a_glance1.htm)

Yoshida, S., Matsuoka, H., Luo, E., Iwai, K., Arai, M., Sinden, R.E., Ishii, A., 1999. A single-chain antibody fragment specific for the *Plasmodium berghei* ookinete protein Pbs21 confers transmission blockade in the mosquito midgut. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104, 195-204.

Zieler, H., Keister, D.B., Dvorak, J.A., Ribeiro, J.M., 2001. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J. Exp. Biol.* 204, 4157-4167.