

**Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**“Análise de desempenho de mosquitos *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904)
transgênicos expressando a fosfolipase A₂ mutada do veneno de abelha”**

por

Maíra Neves Santos

Belo Horizonte

Abril/2008

TESE MDIP-CPqRR

M.N. SANTOS

2008

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

“Análise de desempenho de mosquitos *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) transgênicos expressando a fosfolipase A₂ mutada do veneno de abelha”

por

Maíra Neves Santos

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.**

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira

Belo Horizonte

Abril de 2008

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S237a

2008

Santos, Máira Neves.

Análise de desempenho de mosquitos *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) transgênicos expressando a fosfolipase A₂ mutada do veneno de abelhas / Máira Neves Santos. – Belo Horizonte, 2008.

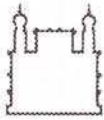
xiii, 84 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 61-69

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestra em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Malária aviária/transmissão 2. Aedes/crescimento & desenvolvimento 3. Mosquitos/genética 4. Animais Modificados Geneticamente/crescimento & desenvolvimento 5. Fosfolipases A₂/genética 6. Venenos de abelhas/genética I. Título. II. Moreira, Luciano Andrade (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

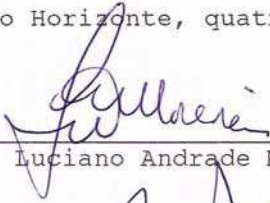
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da quinquagésima quarta defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Maíra Neves Santos, sob a orientação do Dr. Luciano Andrade Moreira.

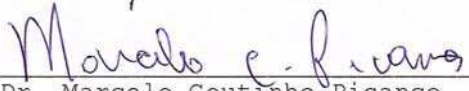
Aos quatro dias do mês de abril do ano de dois mil e oito, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da quinquagésima quarta dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A dissertação da aluna Maíra Neves Santos intitula-se "Análise de desempenho de mosquitos *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) transgênicos expressando a fosfolipase A2 mutada do veneno de abelha". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Luciano Andrade Moreira - CPqRR/Fiocruz (orientador e presidente da banca), Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo - CPqRR/Fiocruz (membro titular), Dr. Marcelo Coutinho Picanço - UFV(membro titular) e Dr. Edelberto Santos Dias - CPqRR/Fiocruz (membro suplente). Após argüir a aluna e considerar se a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada Aprovada. Uma vez encerrado o exame, eu, Luciano Andrade Moreira, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, quatro de abril de dois mil e oito.



Dr. Luciano Andrade Moreira



Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo



Dr. Marcelo Coutinho Picanço

Agradecimentos

Ao Dr. Luciano Andrade Moreira, pela confiança, paciência, ensinamentos e incentivo.

Aos Drs. Denise Valle e José Bento Pereira Lima (LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ), Marcelo Coutinho Picanço e Leandro Bacci (UFV) e Me. Marcelo Carvalho de Resende (FUNASA), colaboradores deste projeto, por toda disponibilidade, acolhimento, conhecimento transmitido e boa-vontade que a mim foram dispensados.

Aos Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo e Me. Marcelo Carvalho de Resende pela grande contribuição na qualificação desta dissertação.

Aos Drs. Marcelo Gustavo Lorenzo, Marcelo Coutinho Picanço e Edelberto Santos Dias, por aceitarem participar desta banca.

À Dra. Flávia Guimarães Rodrigues, pela realização da sua tese de doutorado que deu origem a este trabalho e pela contribuição na revisão do trabalho de qualificação.

À Dra. Ana Paula Madureira Rebouças, pela contribuição na análise estatística.

À Dra. Liléia Diotaiuti e à toda equipe do LATEC/IRR/FIOCRUZ, pela cessão do uso da sala de inseticida, material e reagentes, em especial à Grasielle Pessoa, que tanto se dispôs em ajudar em tudo que precisei, por todas as conversas, troca de conhecimentos e de angústias também!

À toda a equipe do LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ, pelo acolhimento, treinamento, disponibilidade e amizade, em especial àqueles que me treinaram: Bianca, Isabella, Priscila, Ademir e Diogo.

Ao Thiago Mourão Borba e à Paula Monalisa Nogueira, meus “filhotes”, pela incomensurável ajuda, sem vocês não teria conseguido!!!

À todo o pessoal do LAMAL/IRR/FIOCRUZ, pelo constante aprendizado, pela convivência, que, sem dúvida, não poderia ter sido melhor, pelo altruísmo, e

principalmente pelos grandes amigos que fiz. Deixo aqui um agradecimento especial e carinhoso à dupla Flávia Rodrigues e Sabrina, colegas e amigas que me receberam tão bem, com quem tanto aprendi desde que entrei no LAMAL, com quem tantas coisas dividi, certamente tudo foi mais fácil em grande parte devido a vocês!

À Paloma (Franga!) pela incomensurável ajuda na separação das larvas para os bioensaios. Se não fosse você, hoje certamente eu ainda estaria montando os experimentos e com LER!

À Isabela Cerávolo que me enviou muitos artigos enquanto eu estava escrevendo a dissertação em casa. Muito obrigada pela amizade, boa-vontade, paciência e desculpe por encher a sua caixa de emails!!!

A todos os colegas e amigos do IRR, principalmente da turma de pós-graduação 2006, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que tenha sido com uma conversa ou um sorriso de bom-dia.

Aos meus amigos da UFMG, da graduação e do Departamento de Parasitologia (especialmente do Lab. de Culicídeos), todos vocês são muito especiais para mim!

A todos os meus amigos, pela paciência e entendimento de tempos sem nenhum telefonema! Desculpem-me, mas nem por isso esqueço ninguém!!!

Ao meu namorado, Alexander, que certamente foi o 'rei da paciência', por tantos feriados e finais de semana em que me ouvia dizer, pelo telefone: "Estou no René", "Estou escrevendo", por tanto me ouvir falar sobre o final do mestrado, e pela viagem de carnaval que não pude fazer este ano... obrigada por não desistir de mim!!!

À minha família, em especial minha mãe Marilda, meu pai Ismael, e minha irmã Maitê, pelo amor, carinho, incentivo, amizade, e principalmente entendimento das vezes em que tive que abdicar da companhia de vocês para me ocupar com qualquer coisa que fosse relacionada ao mestrado. Muito obrigada por tudo!!!

Sumário

Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
Introdução.....	14
1.1 Situação epidemiológica da malária.....	14
1.2 O ciclo do parasita.....	15
1.3 Mosquitos transmissores da malária.....	15
1.4 Controle de mosquitos vetores de doenças.....	16
1.4.1 Controle químico e resistência a inseticidas.....	16
1.4.1.1 Mecanismos de resistência a inseticidas.....	18
1.4.2 Controle por manipulação genética.....	19
1.4.3 Análise de efeito sobre desempenho adaptativo.....	20
Justificativa.....	26
Objetivos.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
Material e Métodos.....	28
4.1 Criação de mosquitos.....	28
4.2 Longevidade.....	29
4.3 Fecundidade e fertilidade.....	29
4.4 Razão sexual e proporção de transgenia.....	30
4.5 Análise de susceptibilidade/resistência a inseticidas.....	32
4.5.1 Ensaios biológicos para verificação de susceptibilidade de formas imaturas ao Temefós.....	32
Relação dose-resposta de Temefós para larvas.....	32
4.5.2 Ensaios bioquímicos para quantificação da atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas.....	33
4.5.2.1 Acetilcolinesterase.....	33
4.5.2.2 Oxidases de Função Mista.....	34
4.5.2.3 Alfa e beta esterases.....	35
4.5.2.4 PNPA esterase.....	35

4.5.2.5	Glutathione S-transferase.....	35
4.5.2.6	Dosagem de proteínas dos mosquitos.....	36
4.6	Análises estatísticas.....	36
	Resultados.....	37
5.1	Longevidade.....	37
5.2	Fecundidade e fertilidade.....	39
5.3	Razão sexual e proporção de transgenia.....	40
5.4	Ensaio biológico para verificação de susceptibilidade de formas imaturas ao Temefós.....	44
5.5	Ensaio bioquímico para quantificação da atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas.....	44
	Discussão.....	49
	Conclusões.....	60
	Referências bibliográficas.....	61
	Anexos.....	70

Lista de figuras

Figura 1 – Detalhes do experimento de fecundidade/fertilidade.....	30
Figura 2 – <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos e não-transgênicos.....	31
Figura 3 – Longevidade de fêmeas.....	37
Figura 4 – Longevidade de machos.....	38
Figura 5 – Número médio de ovos produzidos por fêmeas de <i>Ae. fluviatilis</i> das diferentes linhagens.....	39
Figura 6 – Razão sexual da linhagem 4T.....	41
Figura 7 – Razão sexual da linhagem 9T.....	41
Figura 8 – Proporção de transgenia da linhagem 4T.....	42
Figura 9 – Proporção de transgenia da linhagem 9T.....	42
Figura 10 – Razão sexual de transgênicos da linhagem 4T.....	43
Figura 11 – Razão sexual de transgênicos da linhagem 9T.....	43
Figura 12 – Análise da atividade da enzima alfa-esterase das linhagens de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	45
Figura 13 – Análise da atividade da enzima beta-esterase das linhagens de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	45
Figura 14 – Análise da atividade da enzima pnpa-esterase das linhagens de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	46
Figura 15 – Análise da atividade da enzima glutational-s-transferase das linhagens de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	46
Figura 16 – Análise da atividade da enzima oxidase de função mista das linhagens de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	47
Figura 17 – Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase das linhagens de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos.....	47

Lista de tabelas

Tabela 1 – Longevidade média de fêmeas de <i>Ae. fluviatilis</i> das diferentes linhagens, em dias	38
Tabela 2 – Longevidade média de machos de <i>Ae. fluviatilis</i> das diferentes linhagens, em dias	38
Tabela 3 – Número de ovos postos, larvas, pupas e adultos emergidos de <i>Ae. fluviatilis</i>	40
Tabela 4 – CL ₅₀ , CL ₉₅ , RR ₅₀ , RR ₉₅ e inclinação (média ± erro-padrão) das curvas concentração-mortalidade de Temefós das linhagens de mosquitos transgênicos e selvagens.....	44
Tabela 5 – Atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas de <i>Ae. fluviatilis</i> transgênicos e selvagens.....	48

Lista de abreviaturas

ACE – Acetilcolinesterase

AChE – Atividade total de Acetilcolinesterase

AChI – Atividade de Acetilcolinesterase na presença de inibidor

AgAper1 - Região promotora da proteína 1 da matriz peritrófica de *An. gambiae*

BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina sérica bovina)

CDC – Centers for Disease Control (Centros para o controle de doenças)

CDNB – 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno

CL – Concentração letal

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DsRed - Red fluorescent protein (proteína vermelha fluorescente)

DTNB – Ácido 5,5 ditiobis (2-nitro-benzóico)

L/E – Luz / Escuro

EGFP – Enhanced green fluorescent protein (proteína verde fluorescente melhorada)

Est – Esterase

Est α – Alfa esterase

Est β – Beta esterase

Est PNPA – PNPA esterase

GFP – Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)

GSH – L-glutathiona reduzida

GST – Glutathiona-s-transferase

GTEPO - Gerência de Entomologia e Pesquisa Operacional

IC – Intervalo de Confiança

IGR – Insect Growth Regulator (Regulador do crescimento de insetos)

Linh - Linhagem

MFO – Oxidases de Função Mista

MS – Ministério da Saúde

Monox - Monoxigenase

n – Tamanho amostral

PLA₂ - Proteína Fosfolipase A₂

PLA₂m – Proteína fosfolipase A₂ mutada

PNCD – Programa Nacional de Controle da Dengue

PNCM - Programa Nacional de Controle da Malária

PNPA – 4-nitrofenil acetato

perc – Percentil

RIDL – Release of Insects Carrying a Dominant Lethal (Soltura de insetos carregando um [gene] letal dominante)

RR – Razão de Resistência

SAEG – Sistema para Análises Estatísticas

SIT – Sterile Insect Technique (Técnica do inseto estéril)

SM1 – Peptídeo sintético que se liga ao intestino e glândula salivar de mosquito

TMBZ – 3,3,5,5 dihidrocloro de tetrametil benzidina

RESUMO

A manipulação genética de insetos é uma alternativa às formas usuais de interferência, como por exemplo, o uso de inseticidas. Utilizando esta ferramenta podemos inserir, em insetos, genes que possuem a capacidade de bloquear parasitas. Estudos mostraram que a proteína fosfolipase A₂ (PLA₂) de venenos animais inibia a formação de oocistos de espécies de *Plasmodium*, se tornando uma ótima candidata para expressão em mosquitos transgênicos a fim de reduzir a transmissão do parasita. Contudo, ao expressar a PLA₂ em mosquitos, observou-se que o desempenho biológico dos insetos foi prejudicado. A fim de contornar esse problema foram realizadas mutações no sítio ativo da enzima inativando-a, sem alterar sua capacidade de bloqueio de desenvolvimento de parasitas. Essa molécula de bloqueio (PLA₂m) foi expressa em *Aedes fluviatilis*, vetor em laboratório do parasita causador da malária de aves. Ensaio prévios de avaliação de inibição do parasita e caracterização molecular das linhagens transgênicas (4T, 8T, 9T e 10T) não confirmaram se a PLA₂m prejudicava o desempenho dos mosquitos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho biológico destes mosquitos. Fêmeas da linhagem 8T apresentaram longevidade significativamente maior que o controle; em machos, a longevidade das linhagens 8T, 9T e 10T foi maior que a do controle. A fecundidade das fêmeas transgênicas foi igual à das fêmeas do grupo controle, porém a fertilidade das linhagens 4T, 8T e 10T foi menor (em porcentagem) que a do controle. A frequência do transgene se manteve alta por várias gerações, mostrando que o mosquito transgênico se mantém persistente. Houve desvios de razão sexual nos transgênicos, quase sempre para maior proporção de machos. Não houve diferença significativa na susceptibilidade ao inseticida organofosforado Temefós entre as linhagens transgênicas e controle. Com relação à atividade das enzimas que detoxificam inseticidas, apenas a linhagem 4T apresentou atividade de acetilcolinesterase parcialmente alterada em relação ao controle. Entretanto, as outras linhagens mantiveram-se sensíveis. Para a alfa, beta e PNPA esterases, oxidases de função mista e glutathione S-transferase, todas as linhagens transgênicas mantiveram-se sensíveis. Podemos concluir que a PLA₂m não interferiu nos parâmetros biológicos avaliados nos mosquitos transgênicos. Estes resultados a colocam como uma forte candidata para ser expressa em mosquitos anofelinos vetores de parasitas da malária humana.

ABSTRACT

The genetic manipulation of insects may be an alternative to usual control methods, as the insecticide application. By this technique, we can insert parasite blocking genes that reduce or block transmission by vectors. Previous studies have shown that animal venom phospholipase A₂ (PLA₂) proteins could inhibit *Plasmodium* oocyst formation, making them ideal candidates to be expressed in transgenic mosquitoes to reduce parasite transmission. However, when these mosquitoes expressed the bee venom protein PLA₂, it indeed inhibited the parasites significantly, but also decreased the fitness of mosquitoes. To overcome this problem, a mutation in the PLA₂ gene active site was performed, inactivating the enzyme (mPLA₂), although maintaining its blocking ability. We obtained four transgenic *Aedes fluviatilis* lines expressing the. Parasite inhibition assays and molecular characterization were performed with these mosquitoes, but whether mPLA₂ expression impaired their fitness could not be confirmed. This work aimed to study the fitness of the mPLA₂ transgenic mosquitoes and their susceptibility to insecticides. We found that the longevity of 8T females was higher than that of control females. Besides the 8T, 9T and 10T males also showed similar alterations, whereas there were none observed for the other lines. Female fecundity was not altered, but fertility of some lines was lower (in percentage) than in controls. The transgene frequency was kept high for many generations, showing that transgenic mosquitoes are stable. Moreover, there were deviations on the sexual ratio of transgenic lineages, often with a higher proportion of males. No significant differences on organophosphate (Temephos) susceptibility were found between transgenic and control lines. The quantification of the activity of insecticide detoxifying enzymes showed no significant differences, whereas line 4T showed partial altered activity in comparison to the control; all other lines were maintained in the category of susceptible population to this enzyme. For the alpha, beta and PNPA esterases, mixed function oxidases and glutathione S-transferase, all the transgenic lines were characterized as susceptible. We can conclude that the mPLA₂ does not interfere with the fitness of transgenic mosquitoes, being therefore a strong candidate to be expressed in anopheline mosquitoes, vectors that transmit human malaria parasites.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Situação epidemiológica da malária

A malária é a doença tropical mais importante, e está distribuída no globo nas regiões tropicais e subtropicais. Apresenta uma alta morbidade e mortalidade, especialmente entre crianças e mulheres grávidas. Viajantes e imigrantes contribuem com casos importados, que são crescentes em áreas não-endêmicas. Com a disseminação de cepas de parasitas resistentes a drogas e linhagens de mosquitos resistentes a inseticidas, o seu tratamento e controle se tornaram mais difíceis (WHO, 2007). A infecção é causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Quatro espécies de *Plasmodium* são conhecidas por parasitar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo que no Brasil existem apenas as três primeiras.

A malária ocorre em 100 países, principalmente nas áreas pobres de continentes como Ásia, América Latina e África. Neste último estão concentrados mais de 90% dos casos conhecidos (WHO, 2004). Mais de 40% da população mundial está sob risco de infecção, sendo que aproximadamente 273 milhões de pessoas são infectadas e mais de um milhão morrem anualmente. No Brasil, 99,5% dos casos de transmissão de malária concentram-se na Amazônia Legal. A maioria dos casos de malária no Brasil são causados pelo *P. vivax*. Da década de 1970 até 1999 houve um aumento no número de casos na Amazônia. Já de 1999 a 2002, os casos nesta região se reduziram significativamente. Em 2003, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) para melhorar o atendimento à população. Apesar dos esforços, a partir daquele mesmo ano, o número de casos da doença voltou a crescer, ocorrendo uma diminuição no ano de 2006. Anualmente, a notificação de casos é maior no período pós-chuvas, devido às boas condições criadas para surgimento de criadouros de mosquitos. Nos últimos anos, houve uma urbanização na transmissão da malária devido a ocupação desordenada de cidades na Amazônia Legal e também a certas atividades praticadas pelos habitantes, como por exemplo, o desmatamento e a piscicultura. Em contrapartida, também houve uma melhora na rede de diagnóstico laboratorial, o que provavelmente contribuiu para o tratamento mais rápido e adequado dos pacientes (MS, 2007).

1.2– O ciclo do parasita

Os plasmódios possuem dois tipos de reprodução: uma assexuada, que se passa no hospedeiro vertebrado e é chamada de esquizogonia, e uma sexuada, que ocorre no hospedeiro invertebrado e é conhecida como esporogonia.

A partir da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* são inoculados de 20 a 123 esporozoítos sob a pele do hospedeiro vertebrado (Amino *et al.*, 2006; Medica & Sinnis, 2005). Estes parasitas na corrente sanguínea dirigem-se para o fígado, onde se multiplicam. Neste local ocorre a liberação de merozoítos, fase conhecida como pré-eritrocítica e clinicamente silenciosa. *P. vivax* e *P. ovale* possuem formas conhecidas como “hipnozoítos” que ficam latentes no fígado por tempo indeterminado e são responsáveis pelas recaídas (Cogswell, 1992; Collins & Jeffery, 2005).

A fase eritrocítica, que é responsável pelas manifestações clínicas da doença, inicia quando os merozoítos se aderem à superfície do eritrócito. Esta é seguida de uma reorientação apical e de formação de uma junção irreversível, chamada vacúolo parasitóforo (Deepak *et al.*, 2004) onde ocorre um processo de maturação que dá origem a novos merozoítos. Em aproximadamente 48 horas um único parasita dá origem a 16 a 32 novos parasitas, que irão continuar o ciclo eritrocítico (Glushakova, 2007) até se diferenciarem em gametócitos masculino e feminino. Essas formas que circulam na corrente sanguínea, são fonte de infecção dos anofelinos que picarem o indivíduo infectado (MS, 2006).

No interior do mosquito, o zigoto se forma e depois transforma-se em oocineto (forma móvel), que atravessa a matriz peritrófica, invade a parede do intestino (Baton & Ranford-Cartwright, 2004) e transforma-se em oocisto, que se prende na lâmina basal do epitélio intestinal. Cada oocisto dará origem a milhares de esporozoítos, que serão levados passivamente pela hemolinfa. Alcançando a glândula salivar, os parasitas poderão ser inoculados quando o mosquito fizer um novo repasto sanguíneo (MS, 2006).

1.3– Mosquitos transmissores da malária

Os mosquitos incriminados como transmissores primários da malária humana no Brasil pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* (*Anopheles darlingi*, *An. aquasalis* e *An. albitarsis*) e *Kerteszia* (*An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus*). *An. darlingi* é

o principal transmissor de malária no Brasil e está amplamente distribuído na América do Sul. No Brasil, esta espécie não é encontrada nas áreas secas do Nordeste, no extremo Sul (abaixo da foz do Rio Iguaçu) e nas áreas de elevada altitude. Na Amazônia, área endêmica de malária no Brasil, esta espécie de vetor de malária é a que mais rapidamente se beneficia das alterações ambientais feitas pelo homem (plantações, pastagens e garimpos no lugar de florestas). Desta forma, *An. darlingi* é deslocado de seu habitat natural silvestre para estes novos ambientes, favorecendo o aumento de sua densidade populacional (Cônoli & Lourenço-Oliveira, 1998).

Em laboratório, podemos estudar a malária em diferentes modelos, como *P. berghei* infectando *An. stephensi*, *An. albimanus* ou *An. gambiae* (Amino *et al.*, 2006; Frischknecht *et al.*, 2006) e *P. gallinaceum* na infecção de *Aedes aegypti* ou *Ae. fluviatilis* (Shahabuddin *et al.*, 1996; de Camargo *et al.*, 1983).

Um modelo experimental muito utilizado em laboratório é o da malária aviária, com o mosquito *Ae. fluviatilis* sendo infectado por *Plasmodium gallinaceum* e infectando aves domésticas (galinhas). Com este modelo é possível obter considerável quantidade de esporozoítos infectantes além de ser seguro, pois o mosquito não se infecta com plasmódios que transmitem a malária humana nem tampouco pode ser vetor dos vírus da dengue e da febre amarela. Estes mosquitos são encontrados em ambientes silvestres, semi-silvestres, suburbanos e urbanos, visitando com freqüência o ambiente peridomiciliar. Seus criadouros preferenciais são recipientes artificiais, tanto os abandonados pelo homem a céu aberto e preenchidos pelas águas das chuvas, como aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico, de maneira semelhante ao observado para *Ae. aegypti* (Cônoli & Lourenço-Oliveira, 1998).

1.4– Controle de mosquitos vetores de doenças

1.4.1 – Controle químico e resistência a inseticidas

A descoberta de inseticidas sintéticos ocorreu na década de 1940 e revolucionou a metodologia de controle de mosquitos vetores de doenças. Estes inseticidas permitiam matar praticamente qualquer tipo de praga, tanto de importância agrícola quanto de saúde pública. Assim, as espécies praga foram controladas ou quase erradicadas na maioria dos países desenvolvidos. O impacto do advento do DDT

(dicloro-difenil-tricloroetano) foi grande para malária e outras doenças, conseguindo-se obter controle efetivo. Os produtos clorados começaram a ser primordialmente utilizados em 1947 e continuaram sendo utilizados por mais de 40 anos, mas a partir da década de 70 foram banidos dos Estados Unidos e reduzidos em outros países, devido a problemas toxicológicos e contaminação ambiental. Apesar disso, os clorados ainda hoje possuem um papel importante no controle de pragas (Casida & Quistad, 1998).

Os organofosforados foram descobertos em 1937, com o início de seu uso em 1965. Embora não sejam tóxicos para as plantas, eles têm alta toxicidade em mamíferos, inclusive o homem. Os metilcarbamatos foram descobertos nos anos 40 e começaram a ser utilizados em 1969. Os piretróides adquiriram status de agentes de controle de pestes na agricultura no começo dos anos 70, sendo largamente utilizados a partir de 1979. Os esforços para eliminar os indivíduos que se mostraram tolerantes após aplicações de inseticida levaram ao crescente aumento das doses e eventualmente à seleção de populações resistentes. O melhor procedimento é minimizar a pressão de seleção e preservar os recursos finitos de compostos novos e úteis por “gerenciamento de resistência”. O uso cuidadosamente planejado de inseticidas pode diminuir, mas não necessariamente resolver o problema da resistência (Casida & Quistad, 1998).

O tratamento químico domiciliar foi a principal medida de intervenção na estratégia de erradicação e, ainda hoje é um importante instrumento de controle de vetores (MS, 2006). O controle químico ou biológico de larvas de mosquitos envolve a aplicação de agentes de controle em corpos d'água. Em vista disso, podem ocorrer problemas de contaminação de organismos aquáticos e até do homem, que pode consumir água dessas fontes (Walker & Lynch, 2007).

O desenvolvimento de resistência à piretróides em *An. gambiae* é importante dada à ênfase que a Organização Mundial de Saúde (WHO) e outras organizações têm dado à utilização de cortinados impregnados com piretróides para o controle da malária (Hemingway & Ranson 2000).

Comparando populações de *Ae. aegypti* do estado de São Paulo e da região nordeste, foi observado que a maioria das populações do nordeste é mais resistente à organofosforados, enquanto que a maioria das populações do estado de São Paulo foram mais resistentes à piretróides. A introdução de piretróides foi realizada em São Paulo, em 1989, 10 anos antes do que em qualquer lugar do Brasil (Macoris *et al.*, 2007).

Uma alternativa ao uso de inseticidas cuja ação é tóxica é o uso de reguladores de crescimento de insetos (IGRs). Estes compostos são análogos do hormônio juvenil e funcionam através da inibição da emergência de adultos (Hangartner *et al.*, 1976).

Populações de *Ae. aegypti* do nordeste, norte e sudeste do Brasil resistentes ou com resistência incipiente a Temefós foram avaliadas quanto à sua susceptibilidade ao IGR Methoprene. Observou-se que três enzimas relacionadas à resistência a inseticidas estavam alteradas e que todas as populações possuíam ao menos uma leve resistência ao regulador de crescimento (Braga *et al.*, 2005).

1.4.1.1 – Mecanismos de resistência a inseticidas

Os fatores que induzem resistência a inseticidas são diversos e o mecanismo em questão depende da pressão de seleção prevalente e do modo de ação do inseticida em uso. Estes mecanismos podem ser, basicamente, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (Brogdon & McAllister, 1998; WHO, 2008). Uma das principais formas de resistência bioquímica é a detoxificação mediada por enzimas, que ocorre quando níveis aumentados ou atividades modificadas de esterases, oxidases ou glutathione S-transferases impedem que o inseticida alcance seu sítio de ação. Este tipo de resistência é comumente identificado no aumento de seus metabólitos característicos (WHO, 2008). Talvez os mecanismos mais comuns de resistência em insetos sejam os níveis ou atividades modificadas de esterases que metabolizam um amplo espectro de inseticidas (Brogdon & McAllister, 1998).

A acetilcolinesterase, que normalmente possui a função de catalisar a hidrólise da acetilcolina no espaço sináptico, permitindo que o neurônio retorne ao seu estado de repouso após ativação, também foi descoberta como estando envolvida no metabolismo de inseticidas das classes dos carbamatos e organofosforados; as oxidases no metabolismo de piretróides e organoclorados, e as esterases estão envolvidas frequentemente no metabolismo de organofosforados, carbamatos e, em menor extensão de piretróides (Brogdon & MacAllister, 1998; Hemingway & Ranson, 2000).

Alguns dos métodos pelos quais podemos detectar a resistência a inseticidas são os ensaios biológicos e ensaios bioquímicos (WHO, 2008).

1.4.2 – Controle por manipulação genética

O controle por manipulação genética de insetos é uma alternativa às formas atuais de controle, como por exemplo, o uso de inseticidas. Uma das técnicas existentes é a conhecida como SIT (*Sterile Insect Technique*), em que insetos irradiados tornam-se estéreis e são liberados para acasalamento com insetos não-modificados. Esta técnica pode ser utilizada juntamente à conhecida como RIDL (*Release of Insects Carrying a Dominant Lethal*). Este sistema é constituído por dois componentes: um gene que expressa uma proteína ativadora da transcrição, que é reprimido com tetraciclina (tTa), e um elemento promotor que ativa a expressão de um gene letal (tRe). Na ausência de tetraciclina, tTa se liga ao tRe levando a expressão do gene letal (tRe). Assim, a interrupção no fornecimento de tetraciclina para o inseto a ser liberado resulta na morte da fêmea. O acasalamento do macho RIDL liberado com a fêmea selvagem resulta na morte da progênie feminina e assim conduz à redução populacional. O RIDL tem sido desenvolvido em *Drosophila* (Thomas *et al.*, 2000) e está sendo adaptado para *Aedes* (Touré *et al.*, 2004).

A inserção de genes em um organismo, ou transgenia, tem sido utilizada para responder algumas questões científicas e também para aplicações práticas, tais como, desenvolver plantas geneticamente modificadas resistentes a pragas e a doenças (Prins, 2003). Além disso, esta técnica tem sido utilizada para transformar insetos transmissores de doenças de importância médica e torná-los refratários aos parasitas que transmitem (Ito *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2004).

Vários mecanismos que permitem a inserção de genes em insetos têm sido utilizados, e isto inclui os elementos de transposição, que são elementos genéticos que podem se mover para novos locais nos cromossomos. Um plasmídeo auxiliador, ou *helper*, é necessário, pois contém a enzima transposase, que é específica de cada elemento e essencial para a integração. Algumas das formas de introduzir estes vetores contendo os genes de interesse em um organismo são microinjeção de embriões, biobalística ou eletroporação (Atkinson *et al.*, 2001).

Alguns elementos de transposição já foram utilizados com sucesso para transformação de insetos. É o caso dos elementos *P* (*Drosophila melanogaster*, Rubin & Spradling, 1982), *mariner* (*Ae. Aegypti*, Coates *et al.*, 1998), *Hermes* (*A. aegypti*, Jasinskiene *et al.*, 1998) e *piggyBac* (*D. melanogaster*, *Anastrepha suspensa*, Handler & Harrell, 1999; 2001); *Bactrocera dorsalis*, Handler & McCombs,

(2000); *An. gambiae*, Grossman *et al.*, (2000); *Pectinophora gossypiella*, Peloquin *et al.*, (2000); *An. stephensi*, Moreira *et al.*, (2002) e *Ae. fluviatilis*, Rodrigues *et al.*, (2006). Este último elemento também foi utilizado em organismos de grupos diversos, como planárias (Gonzalez-Estevéz *et al.*, 2003), camundongos (Ding *et al.*, 2005), *P. falciparum* (Balu *et al.*, 2005) e crustáceos (Pavlopoulos & Averof, 2005).

Normalmente, para facilidade da detecção de organismos transgênicos transformados com estes elementos de transposição, utilizam-se marcadores que emitem fluorescência sob irradiação de luz ultravioleta. Um marcador bastante utilizado é a GFP (*Green Fluorescent Protein*), que emite fluorescência verde. Esta proteína foi melhorada e assim criada uma variante que produz 35 vezes mais brilho que a primeira, e que foi denominada EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Zhang *et al.*, 1996).

Foi descoberto que a proteína fosfolipase A₂ (PLA₂) de veneno de animais (como serpentes, abelhas) inibia a formação de oocistos de *P. gallinaceum* e *P. falciparum*. Observou-se que a inibição ocorria mesmo quando era adicionado à proteína um inibidor químico irreversível do sítio ativo da enzima, o brometo de p-bromofenacil, o que indicou que a atividade hidrolítica da enzima não é necessária ao efeito antiparasítico. Experimentos alimentando mosquitos com sangue contendo plasmódio na presença da PLA₂ sugeriram que essa enzima atua associando-se à superfície do intestino, impedindo assim a adesão do oocineto ao mesmo (Zieler *et al.*, 2001). A partir deste momento, o gene desta proteína tornou-se um ótimo candidato para ser utilizado na transgenia de mosquitos. Logo, Moreira e colaboradores (2002) obtiveram mosquitos *An. stephensi* transgênicos expressando a PLA₂. A redução de oocistos de *P. berghei* foi de 87% em média.

1.4.3 – Análise de efeito sobre desempenho adaptativo

A avaliação de desempenho (*fitness*) possui dois grandes componentes: a sobrevivência e a reprodução, e podem ser medidas em diversos parâmetros, tais como fecundidade, fertilidade, produtividade de biomassa larval, taxa de desenvolvimento, emergência de adultos, razão de machos e competitividade por acasalamento. Fatores adicionais que podem reduzir o *fitness* são condições de criação, endocruzamento e hibridização com mosquitos de origens genéticas diferentes (Marrelli *et al.*, 2006).

Normalmente, o custo de desempenho ocorre mais em transgênicos contendo promotores que dirigem a expressão de proteínas para todas as células e menos naqueles quando os promotores dirigem a expressão de proteínas para células específicas. Este custo pode ocorrer também devido à interrupção de um gene essencial (Lyman *et al.*, 1996).

A longevidade de adultos influencia o número de ciclos gonotróficos e assim o potencial para a transmissão de patógenos (Menge *et al.*, 2005). A nutrição afeta a longevidade. O repasto sanguíneo, além do desenvolvimento dos ovários, também aumenta a longevidade de fêmeas, e isso foi observado no estudo de Cònsoli (1982) para *Ae. fluviatilis*. A ingestão de carboidratos também é essencial, pois deles são feitos os acúmulos de glicogênio e triglicérides, também essenciais para o aumento da sobrevivência. Oviposição tardia não é relacionada com a idade e não afeta a longevidade (Cònsoli, 1982).

Diversos trabalhos estudaram as consequências de mudanças genéticas em insetos, ou mesmo compararam mudanças entre linhagens da mesma espécie (por exemplo, uma linhagem suscetível e outra resistente a inseticidas). Estes estudos de avaliação de desempenho são muito importantes antes que um mosquito transgênico (carregando um gene de bloqueio) seja liberado em campo, pois para isto, é necessária a comprovação de que este mosquito transgênico seja competitivo o suficiente com a população local para garantir uma dispersão satisfatória de seus transgenes.

Grech *et al.* (2007) se perguntaram se as condições ambientais experimentadas pelas linhagens parentais influenciavam no desempenho da prole. Grupos de larvas de *An. stephensi* foram mantidos em condições de abundância ou escassez de comida. Não houve diferença entre as proles que foram criadas sob o mesmo tratamento, mas larvas que receberam pouca comida apresentaram longevidade menor que larvas que receberam muita comida, mesmo que seus pais fossem criados sob as mesmas condições.

Duas linhagens de *An. gambiae*, uma altamente suscetível e outra resistente à *P. yoelli nigeriensis* foram comparadas à linhagem Keele, que foi obtida pelo intercruzamento de quatro linhagens de *An. gambiae* sensu stricto, para avaliar se havia um custo naquelas linhagens que eram refratárias ao parasita. Vários grupos foram comparados para avaliação da longevidade: mosquitos resistentes, suscetíveis e controle; não-alimentados com sangue, alimentados com sangue e alimentados com sangue contendo parasitas; machos e fêmeas. A seleção para

susceptibilidade ou resistência não afetou significativamente a sobrevivência geral de machos e fêmeas em nenhum grupo quando comparada com a do controle. Ainda, isso foi independente deles serem ou não alimentados com sangue, ou com sangue contendo parasitas (Hurd *et al.*, 2005). Também foi avaliada a consequência da resistência de mosquitos aos parasitas da malária. Foi observado que apesar da falta de parasitas, as linhagens resistentes não produziram mais descendentes que as susceptíveis quando alimentadas no mesmo camundongo infectado. Pelo contrário, uma linhagem resistente infectada/estressada produziu menos larvas que uma linhagem susceptível, o que negou a hipótese nula de que mosquitos refratários deveriam produzir mais descendentes porque eles não sofreriam redução de fecundidade induzida por parasitas (Hurd *et al.*, 2005).

Ng'habi *et al.* (2005) verificaram o efeito da densidade de larvas sobre a sobrevivência. A sobrevivência média foi de 21, 25 e 26 dias, nos tratamentos de baixa, média e alta densidade de larvas, respectivamente. A sobrevivência média em baixa densidade de larvas foi significativamente menor do que em média e alta densidade, sendo que entre esses dois tratamentos não houve diferença significativa.

Em outro estudo, comparando uma linhagem de *An. funestus* resistente a piretróides e outra susceptível, não foi observada diferença significativa na longevidade de nenhum dos dois sexos (Okoye *et al.*, 2007).

Andreasen & Curtis (2005) irradiaram *An. stephensi* e *An. gambiae* machos com raios gama para esterilização (Técnica do Inseto Estéril ou SIT). Feito isto, primeiramente avaliaram a taxa de esterilidade de ovos. A porcentagem de eclosão dos ovos (fertilidade) variou de 0,4 a 1,92% após o acasalamento de fêmeas com machos irradiados. Por outro lado, após o acasalamento de fêmeas com machos não-irradiados esta porcentagem variou entre 82,1 e 91,7%.

Os efeitos da infecção natural por *P. falciparum* na fecundidade e mortalidade de *An. gambiae s.l.* foram avaliados em trabalho realizado no norte da Tanzânia. Para isto, mosquitos foram coletados no intradomicílio e as fêmeas ingurgitadas foram separadas e alimentadas com sacarose 10%. Seis dias depois, estas foram dissecadas e o desenvolvimento dos folículos terminais determinado. Ovos maduros no estágio V foram contados. Fêmeas infectadas produziram significativamente menos ovos que fêmeas não-infectadas. Porém, quando a categoria “infectado” foi separada em duas (infectado por oocistos e infectado por esporozoítos), apenas a categoria “infectado por oocistos” apresentou menor fecundidade que os mosquitos não-infectados (Hogg & Hurd, 1997).

Duas linhagens de *An. gambiae* de origens geográficas distintas foram utilizadas para simular a introdução de novos alelos no ambiente, como ocorreria se houvesse a introdução de mosquitos transgênicos na natureza. O desempenho desta dinâmica de simulação foi avaliado por vinte gerações. Foi visto que com o passar do tempo, a performance das gerações melhorou, até a décima geração. Após esta, a performance começa a decair novamente (Menge *et al.*, 2005).

Catteruccia e colaboradores (2003) analisaram a capacidade de competição entre mosquitos *An. stephensi* transgênicos e selvagens. Desta forma, pela análise da prole, pôde-se descobrir qual das duas populações atingiu maior sucesso nos acasalamentos. Mosquitos transgênicos e selvagens foram misturados na mesma gaiola, e foi visto que para todas as populações, a frequência do alelo transgênico decaiu em poucas gerações. Foi realizada análise de integração do gene em duas linhagens com a mesma construção e observou-se que em uma delas o transposon interrompeu uma seqüência codificadora de um gene não-essencial.

Assim como no trabalho acima, Irvin e colaboradores (2004), também analisaram o desempenho de *Ae. aegypti* transgênicos. A longevidade de todos os estádios, a fecundidade e a emergência de larvas transgênicas foram alteradas para todas as linhagens, e em duas delas a longevidade de adultos foi menor. Neste contexto, os autores concluíram que os mosquitos transgênicos estudados têm seu desempenho adaptativo diminuído com relação aos selvagens, e que há sérios custos de desempenho associados com a transgenia.

A mosca *Cochliomyia hominivorax* foi transformada e não se observou nenhum problema de desempenho em relação a moscas não-transformadas. Curiosamente, em uma colônia de transgênicos houve maior taxa de emergência de adultos e em cinco linhagens foram observadas maiores médias de peso de pupas (Allen *et al.*, 2004).

Em um outro estudo, mosquitos transgênicos resistentes à malária que expressavam o peptídeo SM1 foram infectados com *P. berghei*. O desempenho dos mosquitos foi avaliado após a infecção e notou-se que nesta situação, os transgênicos apresentavam melhor desempenho quando comparados aos selvagens. Além disso, os transgênicos gradualmente substituíram os não-transgênicos quando mantidos na mesma gaiola alimentados com sangue de camundongo que continha parasitas produtores de gametócitos (Marrelli *et al.*, 2007).

Anofelinos que expressavam genes anti-*Plasmodium* também foram avaliados, e observou-se que aqueles que expressavam um gene de bloqueio (SM1) não tiveram redução de desempenho. Por outro lado, insetos que expressavam o gene da PLA₂ apresentaram um desempenho reduzido, e o alelo transgênico praticamente desaparecia na quinta geração (Moreira *et al.*, 2004).

Mais tarde, utilizando estas mesmas linhagens de mosquitos transgênicos, e mais outra linhagem que também expressava a PLA₂, porém dirigida por um promotor diferente, foi observado que em ambas as linhagens que expressavam o gene da PLA₂ houve dano nas células epiteliais do intestino, pois apresentavam aparência anormal com grandes vacúolos. Na linhagem que expressava a PLA₂ dirigida pelo promotor *AgAper1*, além dos vacúolos anormais, foram observadas células mortas no lúmen, possivelmente esfoliadas do epitélio intestinal. Já para a linhagem SM1, aquela em que não foi observado custo de desempenho no trabalho de Moreira *et al.* (2004), a ultraestrutura do epitélio intestinal era normal e indistinguível daquela dos mosquitos selvagens. Assim, estas observações sugeriram que a proteína PLA₂ danifica as células epiteliais intestinais, e provavelmente o dano nestas células impede ou diminui a captação de nutrientes, resultando numa menor fecundidade (Abraham *et al.*, 2005).

As mesmas moléculas efectoras anti-*Plasmodium*, PLA₂ e SM1, foram utilizadas posteriormente para introdução em bactérias *Escherichia coli*, porém foram realizadas mutações no sítio ativo da PLA₂, pois provavelmente seria tóxica para as bactérias. As bactérias produziram as proteínas em suas membranas e foram adicionadas à alimentação sanguínea de *An. stephensi*. Ambas as moléculas inibiram significativamente o desenvolvimento de *P. berghei*, e, como esperado, a PLA₂m não causou danos à bactéria e nem ao mosquito (Riehle *et al.*, 2007).

Em alguns estudos supracitados, foram observados desempenhos alterados dos transgênicos em alguns parâmetros, como menor fecundidade e longevidade, e até extinção de transgênicos (Irvin *et al.*, 2004; Cateruccia *et al.*, 2003). A diferença entre estes dois trabalhos e o trabalho de Moreira *et al.* (2004), é que nos dois primeiros os transgênicos foram mantidos em homozigose, e no terceiro os transgênicos foram mantidos em heterozigose (acasalando os mosquitos transgênicos com selvagens em todas as gerações). Na heterozigose, podemos fazer comparações mais seguras entre o desempenho de uma linhagem transgênica com uma selvagem, pois o *background* genético de ambas é o mesmo. O desempenho diminuído dessas linhagens transgênicas homozigotas pode ser devido

ao próprio produto do transgene, ou pela posição de inserção do gene, ou ainda, por consequência do chamado “efeito carona” (ou *hitchhiking*), no qual ocorre fixação de genes deletérios recessivos próximo ao ponto de inserção do transgene. O fato daquelas linhagens transgênicas portadoras do gene SM1 não apresentarem redução do desempenho sugere que a transgenia por si só não é sempre deletéria (Marrelli *et al.*, 2006).

Em 2006, o nosso grupo obteve mosquitos *Ae. fluviatilis* transgênicos expressando também a mesma forma mutada da PLA₂, a PLA₂m, tornando-a inativa (Rodrigues *et al.*, 2006; 2008). Após ensaios de inibição do parasita e caracterização molecular, faziam-se necessários estudos de desempenho destes mosquitos, para avaliar se esta PLA₂m realmente não causava danos aos mesmos, como a PLA₂. Diante desta necessidade, o presente trabalho foi iniciado.

2 – JUSTIFICATIVA

A malária é a doença tropical mais importante, e tendo em vista as dificuldades encontradas para o seu controle, justifica-se a realização de estudos que possam levar ao desenvolvimento de métodos de controle que permitam a redução da transmissão destes parasitas pelos vetores.

A manipulação genética de vetores tem sido realizada a fim de bloquear ou reduzir a transmissibilidade de parasitas pelos mesmos. Neste contexto, Rodrigues *et al.* (2006; 2008) transformaram *Aedes fluviatilis* inserindo o gene da PLA₂m em embriões. Com estes mosquitos transgênicos foram realizados estudos moleculares e de inibição do parasita, porém não haviam sido realizados estudos comparativos para avaliar o desempenho adaptativo. Mesmo sendo um modelo em malária de aves, estes estudos são importantes e necessários para uma futura transformação de vetores da malária humana com a mesma construção de DNA, assim disponibilizando ferramentas para que possam ser feitas inferências acerca do desempenho destes mosquitos.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Geral

Analisar o desempenho adaptativo de linhagens transgênicas de *Ae. fluviatilis*, que expressam a proteína fosfolipase A₂ mutada de veneno de abelhas, em comparação com a linhagem selvagem.

3.2 – Específicos

- Comparar a longevidade dos mosquitos transgênicos em relação aos selvagens;
- Comparar a fecundidade e fertilidade dos mosquitos transgênicos em relação aos selvagens;
- Verificar a estabilidade das linhagens transgênicas, ao longo das gerações;
- Verificar a razão sexual dos mosquitos transgênicos ao longo das gerações;
- Verificar a susceptibilidade a inseticidas de formas imaturas dos mosquitos transgênicos em relação aos selvagens;
- Quantificar a atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas, comparando as linhagens transgênicas com a selvagem.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

Nosso trabalho se iniciou a partir de quatro linhagens transgênicas de *Ae. fluviatilis* expressando um gene de bloqueio ao *Plasmodium* spp., a fosfolipase A_2 mutada do veneno de abelhas (PLA_{2m}) (Rodrigues *et al.*, 2008).

4.1 – Criação de mosquitos

A colônia de *Ae. fluviatilis* selvagem e as quatro linhagens de mosquitos transgênicos (4T, 8T, 9T e 10T, Rodrigues *et al.*, 2008) foram mantidas no insetário do Laboratório de Malária, IRR, a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $80\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 L/E. Para realização de todos os experimentos de desempenho adaptativo foram utilizados mosquitos transgênicos heterozigotos. Para tanto, em todas as gerações, acasalamos sempre machos transgênicos com fêmeas selvagens ou fêmeas transgênicas com machos selvagens. Os mosquitos foram alimentados com sacarose 10% e as fêmeas realizaram repasto sanguíneo semanalmente em camundongos da linhagem Swiss Webster anestesiados com 5mg de Thiopentax (Tiopental sódico), por via intraperitoneal. Três dias após a alimentação com sangue, um recipiente escuro de 6 cm de diâmetro, contendo água, foi colocado no interior das gaiolas para permitir que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. Após 48h, os recipientes foram retirados das gaiolas e seu conteúdo foi transferido para bandejas plásticas (30cm x 20cm) contendo água desclorada. A alimentação das larvas foi realizada com ração para peixes (Goldfish Colour®). As pupas foram coletadas diariamente com auxílio de uma pipeta plástica, colocadas em copo plástico com capacidade para 100 mL e os copos acondicionados em gaiolas de papelão (capacidade para 5L, Barripel) para emergência dos adultos. Mosquitos transgênicos foram separados antes da realização dos experimentos mediante o uso de estereomicroscópio de fluorescência, com o qual era detectada a expressão do gene marcador de transgenia (EGFP).

Tendo em vista fatores relatados anteriormente, todos os experimentos realizados neste estudo foram com a utilização de mosquitos transgênicos heterozigotos.

4.2 – Longevidade

Estes experimentos foram realizados para comparar o tempo de sobrevivência de mosquitos adultos das linhagens transgênicas e selvagens. Nos quatro experimentos independentes realizados com fêmeas foram utilizadas, no total, 71 fêmeas no controle (selvagens) e nas linhagens 4T e 9T, e 50 fêmeas nas linhagens 8T e 10T. Já para os machos, em três experimentos independentes foram utilizados 68 mosquitos no controle (selvagens) e nas linhagens 4T e 9T, e 57 adultos nas linhagens 8T e 10T.

Machos e fêmeas adultos das linhagens transgênicas de um dia de idade foram coletados. Os indivíduos da mesma linhagem foram colocados juntos em gaiolas identificadas, e os mosquitos selvagens foram utilizados como controle. O sexo e a quantidade utilizados foram sempre os mesmos para todas as linhagens em cada experimento. Sacarose 10% foi oferecida continuamente para alimentação. Os mosquitos mortos eram retirados diariamente das gaiolas e a mortalidade era registrada até que não restasse nenhum mosquito. Foram realizados quatro e três experimentos independentes utilizando fêmeas e machos, respectivamente.

4.3 – Fecundidade e fertilidade

Estes experimentos foram realizados para verificar se há diferença entre o número de ovos produzidos e de larvas emergidas entre os mosquitos transgênicos e selvagens.

Foram realizados quatro experimentos independentes utilizando: 55 fêmeas do controle (selvagens), 36 fêmeas da linhagem 4T, 54 fêmeas da linhagem 8T, 40 fêmeas da linhagem 9T e 50 fêmeas da linhagem 10T.

De três a sete dias após a emergência, fêmeas transgênicas das diferentes linhagens foram alimentadas com sangue de camundongo. Quatro dias após a alimentação, foram anestesiadas sob gelo e colocadas individualmente em placas de Petri plásticas (5,5 cm de diâmetro) identificadas, contendo um disco de papel de filtro no fundo. Em alguns experimentos, as asas das fêmeas foram retiradas para maior indução da oviposição. Após a colocação das fêmeas no interior das placas, o papel de filtro foi umedecido com 700 µl de água para induzir a oviposição. As placas fechadas contendo as fêmeas foram acondicionadas em uma bandeja plástica (34 X 48 cm), e cobertas com papel-toalha para criar um ambiente escuro.

As bandejas foram vedadas com plástico para evitar que as placas se molhassem e acondicionadas em uma incubadora tipo BOD com temperatura de $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24h. No dia seguinte, as fêmeas foram retiradas das placas (Figura 1A) e os ovos depositados no papel-filtro foram contados sob estereomicroscópio (Figura 1B). Os ovos foram colocados em potes plásticos com capacidade para 250 ou 500 mL com água e ração para eclosão. Cinco dias depois, as larvas foram contadas. As pupas foram coletadas diariamente e acondicionadas em gaiolas de plástico, identificadas de acordo com a fêmea progenitora e a linhagem da prole. Assim que todos os adultos emergiam, estes eram contados e sexados.

Em um dos experimentos, 23 fêmeas (de todas as linhagens, inclusive da selvagem) que não haviam realizado postura foram deixadas nas placas por mais 24h para posterior dissecação e visualização dos ovários. Passado este tempo, os ovos foram contados, e aquelas fêmeas que, ainda assim, não realizaram postura, foram dissecadas para verificação da presença de ovos nos ovários.

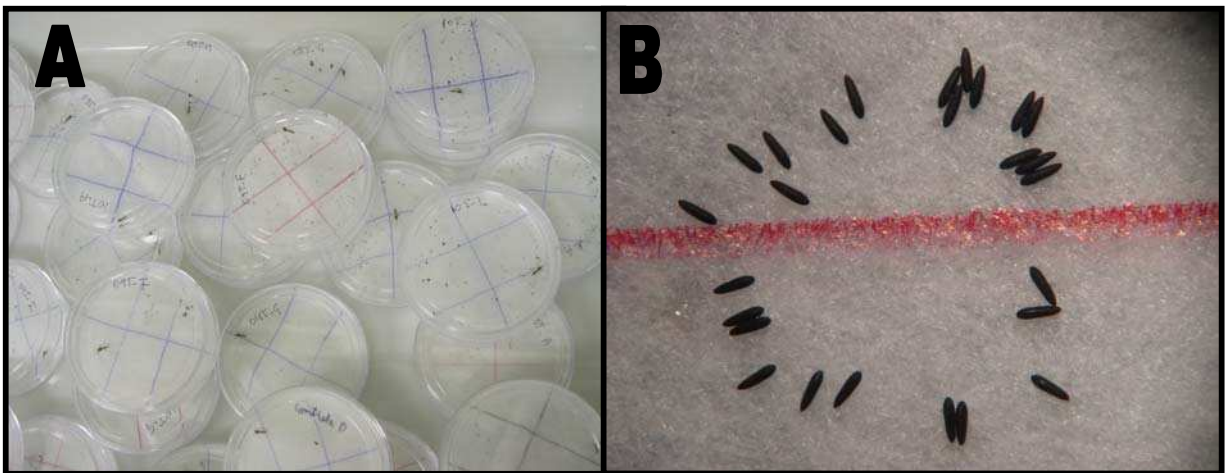


Figura 1 – Detalhes do experimento de fecundidade/fertilidade. A: placas com fêmeas alimentadas de sangue, confinadas, que realizaram postura forçada sobre papel de filtro umedecido com água. B: ovos de *Ae. fluviatilis* em papel de filtro.

4.4 – Razão sexual e proporção de transgenia

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de testar se há desvio na proporção de machos e fêmeas nas linhagens de mosquitos transgênicos, que esperamos ser de 50% (Clements, 2000). Além disto, visou-se verificar se a partir da segunda geração, as populações entravam em equilíbrio, ou seja, se havia estabilidade na população transgênica de laboratório. Para isto acompanhamos seis

gerações sucessivas iniciadas com mosquitos transgênicos heterozigotos que acasalaram com mosquitos selvagens, em duas linhagens.

A proporção esperada de transgênicos e selvagens, na primeira geração, é de aproximadamente 50%, a partir de parentais transgênicos heterozigotos e selvagens. A partir da segunda geração, as proporções esperadas são de 56% de selvagens e 44% de transgênicos, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Falconer & Mackay, 1996), já que o alelo transgênico é dominante.

Mosquitos transgênicos foram acasalados com mosquitos selvagens a fim de obter uma prole heterozigota. Da prole de cada linhagem foram separadas cem larvas ao acaso para experimentação. Estas cem larvas previamente separadas eram colocadas em bandejas de criação, devidamente identificadas. As pupas eram posteriormente coletadas, e após a emergência de todas elas, o número de adultos quantificado. Os adultos foram separados de acordo com o sexo e a proporção de indivíduos transgênicos foi verificada sob lupa de fluorescência (Figura 2). O restante das larvas era utilizado para obter novas gerações. Destas, após emergência de adultos, foram separados cinquenta adultos machos e cinquenta adultos fêmeas, sem verificação de transgenia. Sete dias após a emergência de todos os adultos, as fêmeas foram alimentadas com sangue de camundongo e os ovos produzidos por elas foram coletados para dar início à próxima geração, e assim sucessivamente. Esses experimentos foram repetidos por seis gerações.

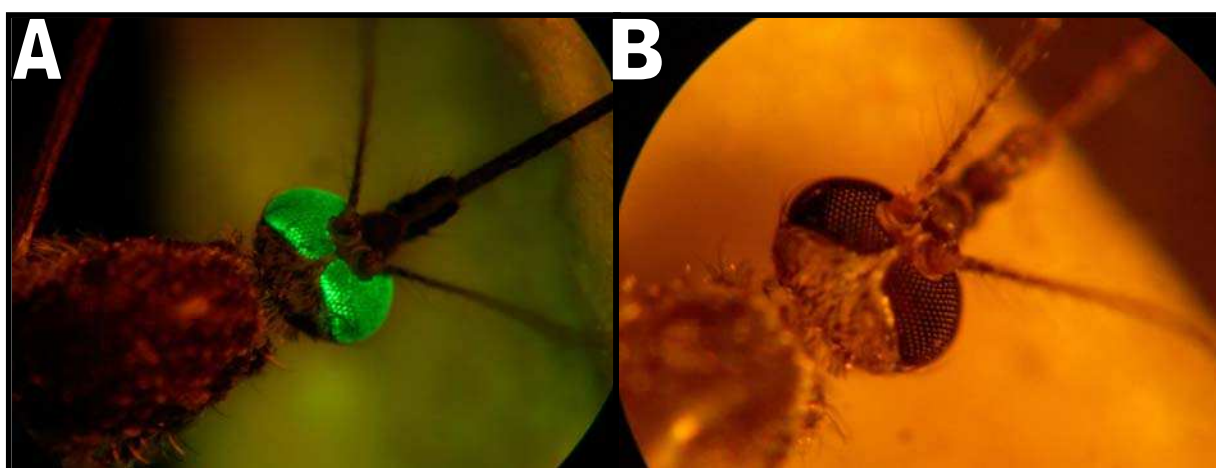


Figura 2 – *Ae. fluviatilis* visualizados sob microscópio de fluorescência para detecção de transgenia. A: Mosquito transgênico expressando o gene marcador EGFP. B – Mosquito selvagem. Aumento de 40X.

4.5 – Análise de susceptibilidade/resistência a inseticidas

4.5.1 – Ensaio biológico para verificação de susceptibilidade de formas imaturas a Temefós

Os bioensaios foram realizados de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) / IOC – FIOCRUZ, que foram adaptados a partir da metodologia preconizada pela OMS e o CDC.

Relação dose-resposta de Temefós para larvas

Em ensaios biológicos de resistência a inseticidas, é comum a utilização das notações de CLs. A CL_{50} é a concentração letal que mata 50% da população testada e a CL_{95} é a concentração letal que mata 95% da mesma população. Estas CLs são calculadas por um programa (no nosso caso, SAEG) após a entrada de dados de mortalidades da população em várias doses utilizadas do inseticida. Através das mesmas podemos calcular as RR_{50} e RR_{95} (razão de resistência 50% e razão de resistência 95%) que nos mostram se populações testadas são mais resistentes que a nossa população de referência. Neste trabalho, o objetivo foi verificar se as linhagens transgênicas possuíam diferenças de susceptibilidade ao organofosforado em relação à linhagem selvagem. Devemos enfatizar que esta linhagem selvagem, que é a nossa população de referência, não é uma população conhecida como sendo padrão de referência de susceptibilidade a inseticidas.

Larvas de terceiro estágio de linhagens transgênicas e selvagens foram separadas para a realização dos bioensaios. Utilizamos quatro réplicas avaliadas com 20 larvas cada uma, totalizando 80 larvas expostas a cada dose.

As larvas foram colocadas em copos de plástico com capacidade para 200 mL, sendo adicionados 99,5 mL de água e 500 μ L de solução de inseticida em cada um (etanol + Temefós a 0,1 mg/L). Dentro deste volume de solução de inseticida, as doses utilizadas variaram de acordo com a quantidade de etanol (solvente) e Temefós colocadas. Nos ensaios-controle foram colocados 99,5 mL de água e 500 μ L de etanol. As larvas ficaram expostas continuamente ao produto por 24h, e após este período, a mortalidade foi registrada. O critério utilizado foi considerar mortas as larvas que apresentaram atividade locomotora alterada ou inexistente.

4.5.2 – Ensaio bioquímico para quantificação da atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas

Os testes bioquímicos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) / IOC – FIOCRUZ. Utilizamos *Aedes fluviatilis* selvagens adultos como controle, e todas as linhagens transgênicas foram testadas (4T, 8T, 9T e 10T). Foram dosadas as atividades das enzimas acetilcolinesterase (ACE), monooxigenase (MFO), alfa-esterase (EST α), beta-esterase (EST β), PNPA-esterase (EST PNPA) e Glutathione S-Transferase (GST).

Fêmeas adultas de um dia de idade, não alimentadas, foram congeladas a -70°C até o seu uso. O protocolo utilizado foi o descrito por Valle *et al.* (2006). Cada mosquito foi colocado individualmente em tubo de microcentrífuga (1,5 mL) contendo 30 μL de água Milli-Q. Os insetos foram macerados utilizando-se um pistilo plástico e um homogeneizador elétrico. Subsequentemente, um volume de 270 μL de água foi adicionado aos tubos. De cada amostra, foram separadas quatro alíquotas de 25 μL para dosagem de ACE, e duas alíquotas de 20 μL para quantificação de MFO. O volume restante foi centrifugado a 12000 g por 60s. Cerca de 130 a 150 μL do sobrenadante de cada amostra centrifugada foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços. Estas amostras foram pipetadas em duplicatas, de acordo com o volume necessário, nas placas de cada enzima quantificada (EST α , EST β , EST PNPA e GST) e também na dosagem de proteínas totais.

Todas as enzimas ditas relacionadas à resistência, ou seja, que possuem uma função secundária de metabolização de inseticidas foram testadas. A acetilcolinesterase está envolvida na metabolização de carbamatos e organofosforados, as esterases com organofosforados e piretróides e as oxidases com organoclorados e piretróides (Brogdon & McAllister 1998). As glutathione S-transferases estão prioritariamente envolvidas na metabolização de organofosforados, porém também já foi relatado o envolvimento destas enzimas na resistência à piretróides e organoclorados (Wei *et al.* 2001; Ranson *et al.* 1997; Vontas *et al.* 2001; Lumjuan *et al.* 2005).

Estes ensaios bioquímicos foram realizados para verificarmos se a presença dos transgenes poderia modificar o grau de resistência / susceptibilidade a inseticidas.

Para cada enzima analisada, obteve-se um tamanho amostral final diferente, devido à retirada das amostras que apresentaram desvio-padrão maior que 30%

entre as duplicatas. A dosagem do total de proteínas de cada mosquito foi realizada a cada dia de experimento para a correção de todos os valores de atividades das enzimas relacionadas com a resistência metabólica. Curvas-padrão de citocromo C, alfa-naftol e beta-naftol foram realizadas para obter fatores de conversão que são utilizados para cálculo final dos valores de atividades das enzimas MFO, EST α e EST β , respectivamente. Estas curvas-padrão são feitas ao início de cada rodada de monitoramentos no LAFICAVE, portanto, os fatores de conversão utilizados já haviam sido medidos.

Os perfis foram comparados com o controle selvagem. Feito isto, a porcentagem de indivíduos com atividade enzimática acima do percentil 99 do controle foi analisada em todas as linhagens, para cada enzima. Atividades são classificadas como inalteradas, se esta taxa é menor que 15%, parcialmente alteradas, se a taxa está entre 15 e 50%, e alterada se está acima de 50%.

4.5.2.1 – Acetilcolinesterase

Para o teste de ACE, como foi dito anteriormente, foram distribuídos 25 μ L de homogenato em duplicata, em duas placas. Uma recebeu o nome de “AChE” e a outra de “AChI”. Na placa AChI mediu-se a atividade desta enzima na presença de Propoxur, que é um carbamato inibidor da acetilcolinesterase, a fim de quantificar a porcentagem de inibição da atividade enzimática. Para ambas as placas, foram adicionados, em cada poço, 145 μ L de Triton / sódio fosfato e 10 μ L de DTNB / sódio fosfato. Na placa de AChE, adicionou-se 25 μ L da solução de AChE (0,0087g de iodeto de acetilcolina e 3 mL de água) e na placa de AChI, adicionou-se a solução de AChI (igual a anterior com adição da solução de 6 μ L de propoxur 0,1 M em acetona). A leitura das duas placas foi feita após uma hora em espectrofotômetro na absorvância de 405nm.

4.5.2.2 – Oxidases de Função Mista

A medida de MFO é feita de modo indireto, pela quantificação do grupamento heme. Foram distribuídos 20 μ L de homogenato de mosquitos não-centrifugado em cada poço da placa. Três poços contendo cada um 20 μ L de solução de citocromo C (que contém heme) a 0,01 mg/mL foram utilizados como controle positivo. Em cada poço foram adicionados 60 μ L de tampão fosfato de potássio, 200 μ L de solução

TMBZ / sódio acetato (6 mL TMBZ a 0,2% em metanol + 18 mL de tampão acetato de sódio a 250 mM pH 5,0) e 25 μ L de H₂O₂ a 3%. A placa foi incubada por 90 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura foi feita em espectrofotômetro na absorvância de 650nm.

4.5.2.3 – Alfa e beta esterases

Diferentes substratos foram utilizados para quantificação das esterases. O procedimento e os reagentes para ambas as placas são os mesmos, com exceção do substrato e do controle positivo. Para alfa-esterase foram utilizados alfa-naftol como controle positivo e alfa-naftil acetato/ sódio fosfato como substrato, e para beta-esterase, beta-naftol como controle positivo e beta-naftil acetato/Na fosfato como substrato. Após a distribuição de 10 μ L do homogenato, em duplicata, nas placas, e da colocação de 10 μ L do controle positivo a 0,5 μ g/ μ L em três poços, foram adicionados, em todos os poços, 200 μ L do substrato. As placas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e, depois foram adicionados 50 μ L de Fast Blue (Sigma). Após outra incubação por cinco minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorvância a 570nm.

4.5.2.4 – PNPA esterase

Para medir esterase “PNPA”, após a distribuição de 10 μ L de homogenato, em duplicata na placa, foram adicionados 200 μ L de solução PNPA / sódio fosfato (250 μ L 100 mM de PNPA em acetonitrila + 24,75 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) e a leitura (cinética) foi feita por dois minutos, a intervalos de quinze segundos, da absorvância a 405 nm.

4.5.2.5 – Glutathione S-transferase

Após a distribuição de 15 μ L de homogenato, em duplicata, nos poços da placa para medição de Glutathione-S-transferase, foram adicionados 195 μ L de solução glutathione reduzida/cloro-dinitrobenzeno (20 mL de GSH a 10 mM + 1 mL de CDNB a 21 mM), e a leitura (cinética) foi realizada por vinte minutos a intervalos de um minuto, da absorvância a 340 nm.

4.5.2.6 – Dosagem de proteínas dos mosquitos

Para a dosagem de proteínas totais, distribuimos 10 μL de homogenato, em duplicata, em uma placa, e 10 μL (três poços) de controle positivo, que nesse caso, foi BSA a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em todos os poços foram adicionados 300 μL do reativo (Bio-Rad) a 1:5 e foram contados de três a cinco minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 620 nm. Concomitantemente, também foi feita a curva-padrão de BSA, que é necessária para o cálculo do fator de conversão que é utilizado para transformar os valores obtidos em μg de proteína. Em uma placa, foram adicionados, em duplicatas: 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 μL de BSA a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, completando-se o volume com água para 10 μL . Procedeu-se exatamente da mesma maneira da dosagem de proteínas para realização do teste e leitura.

4.6 - Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos de longevidade e fecundidade foram analisados com os testes estatísticos Kruskal Wallis para análise geral e Mann Whitney U para análise par a par, com $p < 0,05$ como critério de significância. Os resultados dos experimentos de razão sexual e proporção de transgenia acompanhados ao longo de gerações foram analisados com o teste qui-quadrado (5% de probabilidade). Os resultados dos bioensaios de susceptibilidade a inseticidas foram submetidos à análise de Probit e teste t para comparação das concentrações letais.

5 - RESULTADOS

5.1 – Longevidade

Na análise geral, não houve diferença significativa para fêmeas, porém na análise par a par, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre o controle e a linhagem 8T, sendo a longevidade da linhagem 8T maior que a longevidade do controle ($p < 0,05$).

Já para machos, houve diferença estatisticamente significativa na análise geral ($p < 0,01$). Nas análises par a par, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre o controle e a linhagem 8T ($p < 0,01$), entre o controle e a 9T ($p < 0,01$) e também em relação a 10T ($p < 0,001$). Já entre a linhagem 4T e o controle as medias foram iguais. Em todas as comparações par a par em que houve diferença, a longevidade dos transgênicos foi maior que a longevidade do controle (Figura 5).

Estas análises podem ser visualizadas em conjunto (junção de todos os experimentos), verificando-se o número de mosquitos sobreviventes por dia (Figuras 4 e 5), ou separadamente, com os valores de média e desvio-padrão (Tabelas 1 e 2).

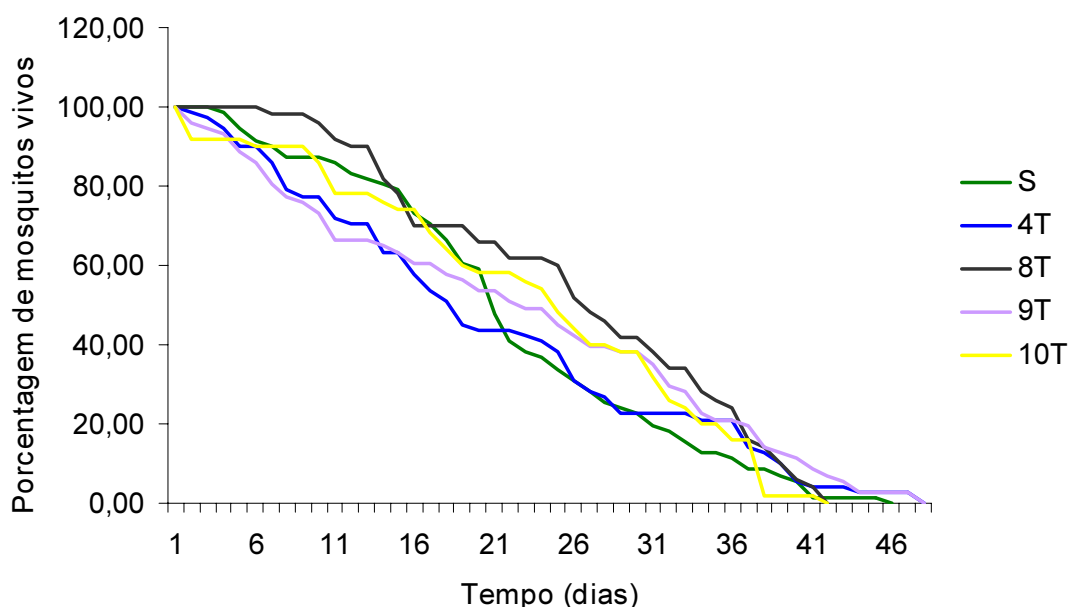


Figura 3 – Longevidade de fêmeas. Número de fêmeas adultas vivas, de mosquitos selvagens e de linhagens transgênicas, em função do número de dias. Fêmeas de um dia de idade foram agrupadas e a mortalidade foi registrada diariamente até que não restassem mais fêmeas nas gaiolas. Foram realizados 4 experimentos independentes.

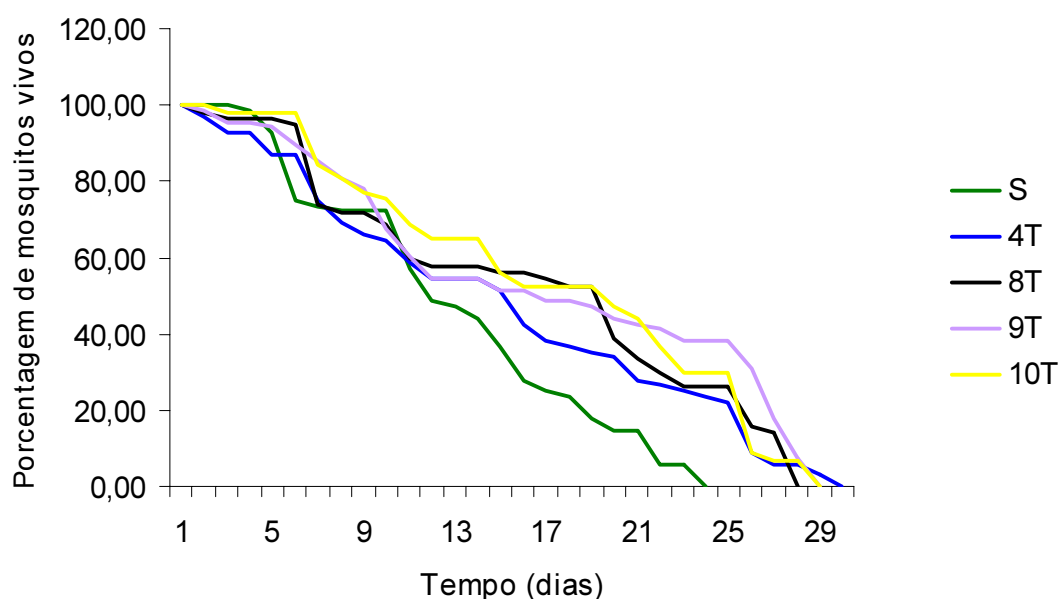


Figura 4 – Longevidade de machos. Número de machos adultos vivos, de mosquitos selvagens e de linhagens transgênicas, em função do número de dias. Machos de um dia de idade foram agrupados e a mortalidade foi registrada diariamente até que não restassem mais machos nas gaiolas. Foram realizados 3 experimentos independentes.

Tabela 1 – Longevidade média de fêmeas de *Ae. fluviatilis* das diferentes linhagens, em dias (\pm erro-padrão)

Experimento	Linhagens				
	S	4T	8T	9T	10T
1	27,07 \pm 2,44	33,93 \pm 3,17	27,47 \pm 2,57	31,07 \pm 3,33	21 \pm 2,82
2	29,78 \pm 1,75	23,78 \pm 2,21	30,78 \pm 2,02	31,61 \pm 2,48	32,33 \pm 1,34
3	11,76 \pm 1,45	13,52 \pm 1,57	n/d	12,81 \pm 1,92	n/d
4	19,06 \pm 0,98	12,35 \pm 2,09	17,82 \pm 1,87	14,12 \pm 2,31	13,77 \pm 2,04

n/d = não-determinado

Tabela 2 – Longevidade média de machos de *Ae. fluviatilis* das diferentes linhagens, em dias (\pm erro-padrão)

Experimento	Linhagens				
	S	4T	8T	9T	10T
1	14,58 \pm 0,85	18,16 \pm 1,2	19,23 \pm 1,02	21,86 \pm 1,03	19,63 \pm 1,04
2	11,54 \pm 0,62	10,9 \pm 1,62	n/d	8,64 \pm 0,87	n/d
3	5,64 \pm 0,96	5,57 \pm 0,57	5,43 \pm 0,45	6,43 \pm 0,57	8,14 \pm 0,82

n/d = não-determinado

5.2 - Fecundidade e fertilidade

Das 23 fêmeas que foram mantidas confinadas nas placas por 24h além do tempo do experimento, foi verificado que 12 fêmeas haviam realizado posturas (3 selvagens, 1 da linhagem 4T, 1 da 8T, 4 da 9T e 3 da 10T). O número de ovos (e consequentemente larvas, pupas e adultos) postos pelas fêmeas que ovipositaram com 48h foi também incluído nas análises realizadas (Figura 6 e Tabela 3). Aquelas que não ovipositaram (3 selvagens, 2 da linhagem 4T, 5 da 8T e 1 da 9T) tiveram seus ovários dissecados para verificar a presença de ovos; destas, 1 fêmea selvagem, 2 da linhagem 4T e 5 da linhagem 8T tinham ovos armazenados em seus ovários.

Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e nenhuma das linhagens transgênicas para o número de ovos ($p=0,29$) (Figura 6).

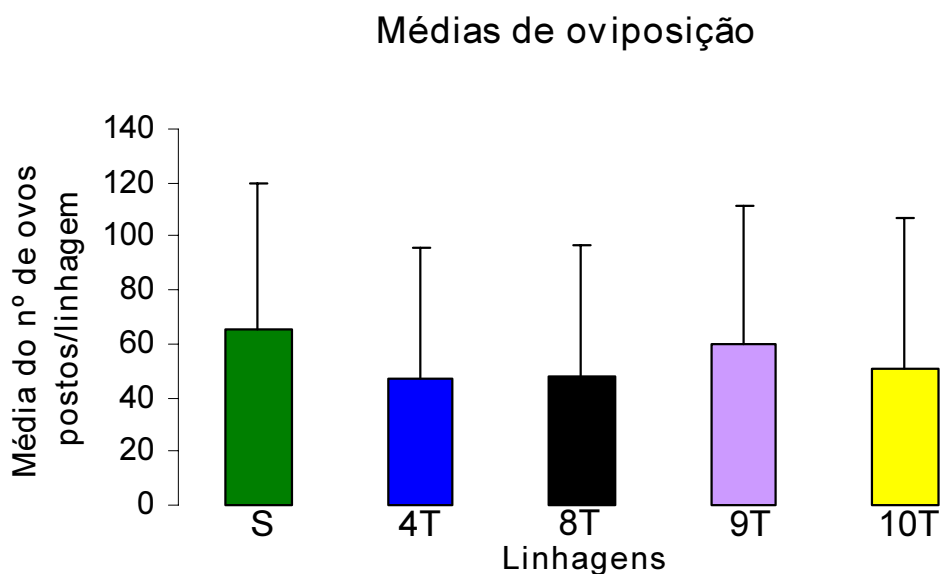


Figura 5 – Número médio (e desvio-padrão) de ovos produzidos por fêmeas de *Ae. fluviatilis* das diferentes linhagens

Tabela 3 – Número de ovos postos, larvas, pupas e adultos emergidos de *Ae. fluviatilis*

Linhagem	Ovos	Larvas	Pupas	Adultos		Taxa de emergência [†]
				Fêmeas	Machos	
Selvagem	64,9	40,8	37,6	17,1	16,0	62,78%
4T	46,6	25,4	23,2	10,8	10,9	54,38%
8T	47,4	20,5	17,0	7,6	6,9	43,19%
9T	59,7	37,4	33,3	15,0	14,9	62,97%
10T	50,4	15,1	12,7	6,0	5,1	30,01%

[†] = (nº de larvas/nº ovos *100)

Fêmeas alimentadas com sangue foram confinadas em placas de Petri contendo um disco de papel-filtro úmido no fundo 4 dias após a alimentação. Estas fêmeas foram retiradas das placas após 24h e seus ovos foram contados. Estes ovos foram colocados para eclosão, e as larvas, pupas e adultos foram contados. Após a emergência os adultos foram sexados.

5.3 – Razão sexual e proporção de transgenia

Na análise da razão sexual de seis gerações da linhagem 4T, verificou-se que apenas na quinta geração, a proporção de machos e fêmeas desviou-se do esperado, havendo um total de 38% de machos e 62% de fêmeas. Já na linhagem 9T, as proporções desviaram-se nas primeira (69% de machos e 31% de fêmeas), terceira (64% de machos e 36% de fêmeas) e sexta gerações (60% de machos e 40% de fêmeas) (Figuras 7 e 8).

Na análise da proporção de transgenia de seis gerações da linhagem 4T, verificou-se que as proporções desviaram-se do esperado nas seguintes gerações: segunda (57% de transgênicos e 43% de selvagens), terceira (59% de transgênicos e 41% de selvagens) e quarta (55% de transgênicos e 45% de selvagens). Já na linhagem 9T, verificou-se que as proporções desviaram-se nas gerações: primeira (64% de transgênicos e 36% de selvagens), segunda (68% de transgênicos e 32% de selvagens), terceira (idem à segunda), quarta (55% de transgênicos e 45% de selvagens) e sexta (62% de transgênicos e 38% de selvagens) (Figuras 9 e 10). As gerações 1, 5 e 6 na linhagem 4T, e 5 na linhagem 9T mostraram-se em equilíbrio.

Nas análises em que consideramos apenas os mosquitos transgênicos, e verificamos a razão sexual dos mesmos, foi observado que, na linhagem 4T, as proporções esperadas desviaram-se na primeira (60% de fêmeas e 40% de machos) e na quinta (37% de fêmeas e 63% de machos) gerações. Já na linhagem 9T, as

proporções esperadas desviaram-se na primeira (25% de fêmeas e 75% de machos), segunda (30% de fêmeas e 70% de machos), terceira (26% de fêmeas e 74% de machos) e quinta gerações (33% de fêmeas e 67% de machos) (Figuras 11 e 12).

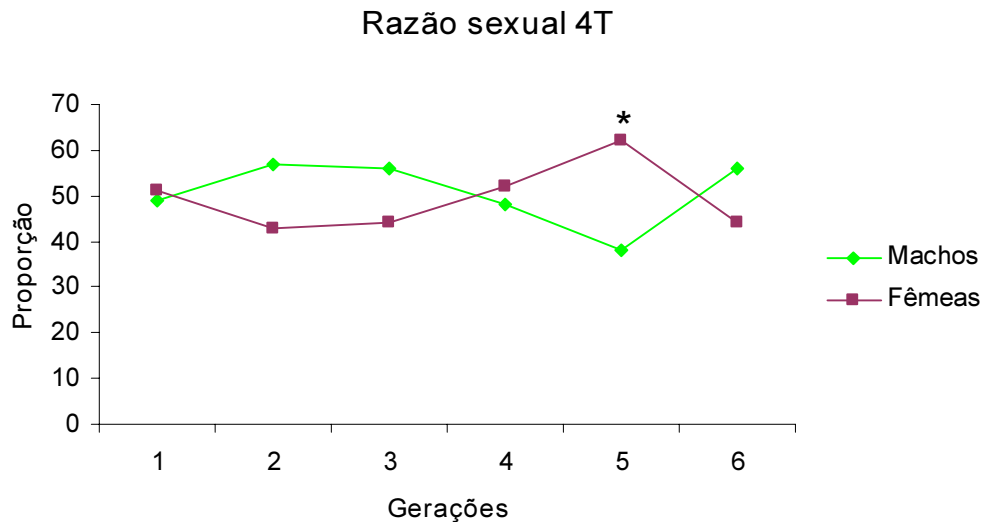


Figura 6 – Razão sexual da linhagem 4T. As gerações marcadas com asterisco desviaram-se da proporção esperada de acordo com o teste de qui-quadrado (probabilidade). Foram acompanhadas seis gerações iniciadas por acasalamentos de mosquitos transgênicos heterozigotos com selvagens. Com larvas foram amostradas em cada geração para verificação do sexo.

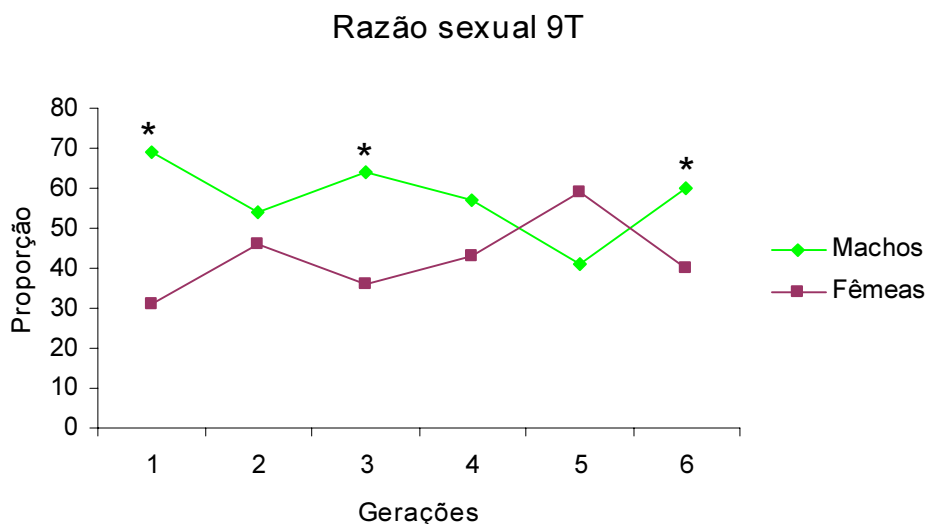


Figura 7 – Razão sexual da linhagem 9T. As gerações marcadas com asterisco desviaram-se da proporção esperada de acordo com o teste de qui-quadrado (probabilidade). Foram acompanhadas seis gerações iniciadas por acasalamentos de mosquitos transgênicos heterozigotos com selvagens. Com larvas foram amostradas em cada geração para verificação do sexo.

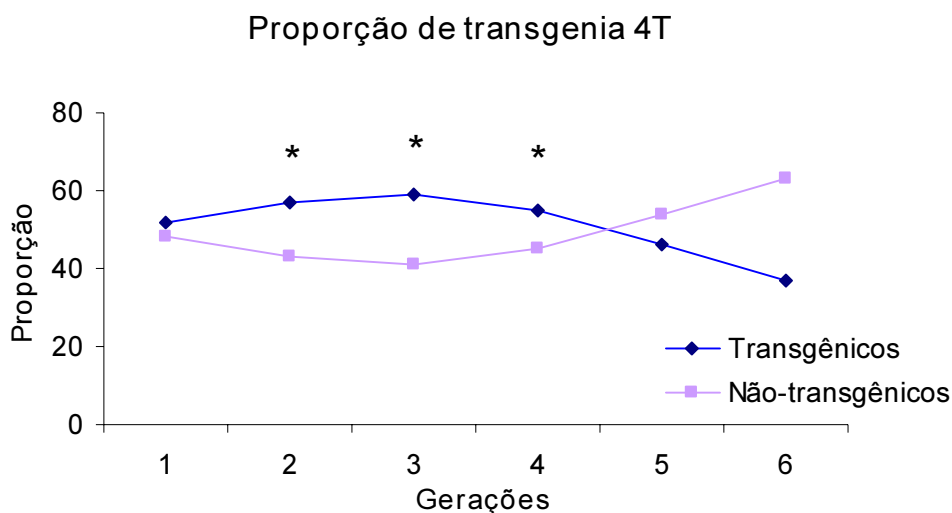


Figura 8 – Proporção de transgenia da linhagem 4T. As gerações marcadas com asterisco desviaram-se da proporção esperada de acordo com o teste de qui-quadrado (probabilidade). Foram acompanhadas seis gerações iniciadas por acasalamentos de mosquitos transgênicos heterozigotos com selvagens. Cem larvas foram amostradas em cada geração para verificação de transgenia.

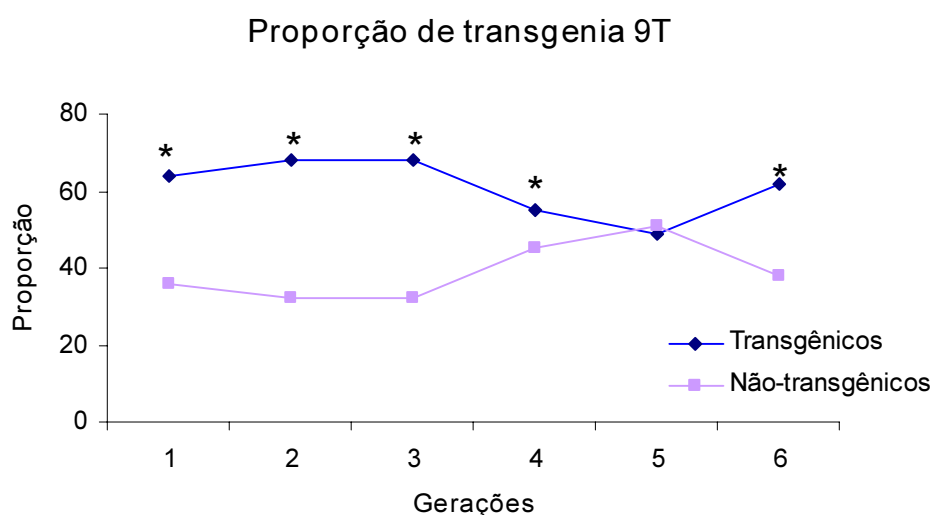


Figura 9 – Proporção de transgenia da linhagem 9T. As gerações marcadas com asterisco desviaram-se da proporção esperada de acordo com o teste de qui-quadrado (probabilidade). Foram acompanhadas seis gerações iniciadas por acasalamentos de mosquitos transgênicos heterozigotos com selvagens. Cem larvas foram amostradas em cada geração para verificação de transgenia.

Razão sexual de transgênicos 4T

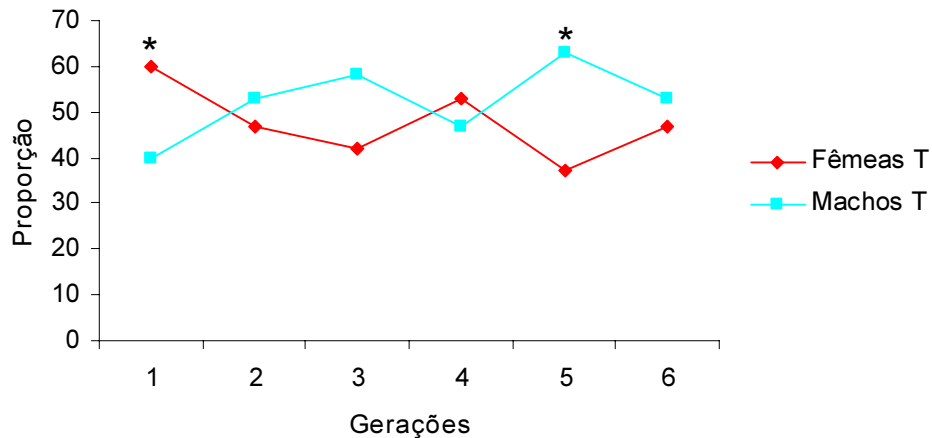


Figura 10 – Razão sexual de transgênicos da linhagem 4T. As gerações marcadas com asterisco desviaram-se da proporção esperada de acordo com o teste de qui-quadrado (probabilidade). Foram acompanhadas seis gerações iniciadas por acasalamentos de mosquitos transgênicos heterozigotos com selvagens. Cem larvas foram amostradas em cada geração para verificação de transgenia, e dos mosquitos sabidamente transgênicos, foi verificada a razão sexual.

Razão sexual de transgênicos 9T

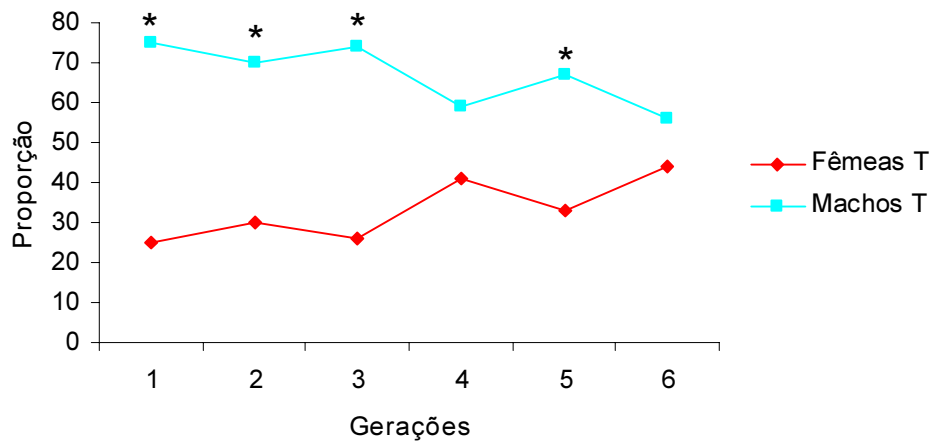


Figura 11 – Razão sexual de transgênicos da linhagem 9T. As gerações marcadas com asterisco desviaram-se da proporção esperada de acordo com o teste de qui-quadrado. Foram acompanhadas seis gerações iniciadas por acasalamentos de mosquitos transgênicos heterozigotos com selvagens. Cem larvas foram amostradas em cada geração para verificação de transgenia, e dos mosquitos sabidamente transgênicos, foi verificada a razão sexual.

5.4 - Ensaio biológico para verificação de susceptibilidade de formas imaturas ao Temefós

Os valores calculados para as CL_{50} e CL_{95} de Temefós para a linhagem de nossa referência (selvagens) foram 0,0097 e 0,0269 ng de i.a./100 mL, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as CLs das linhagens transgênicas em relação ao controle (teste t).

Os valores calculados para as RR_{50} foram de 1,4 para todas as linhagens transgênicas e, para as RR_{95} os valores foram de 0,7 para 4T, 8T e 9T e 0,9 para 10T. (Tabela 4)

Todas as linhagens transgênicas apresentaram inclinação maior que a linhagem selvagem, o que significa que as linhagens transgênicas são mais homogêneas (menor variabilidade genética) que a linhagem selvagem. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 – CL_{50} , CL_{95} , RR_{50} , RR_{95} e inclinação (média \pm erro-padrão) das curvas concentração-mortalidade de Temefós das linhagens de mosquitos transgênicos e selvagens

Linhagens	CL_{50}^*	CL_{95}^*	RR_{50}	RR_{95}	Inclinação ^a
S	0,0097 (0,0088-0,0106)	0,0269 (0,0240-0,0313)	1,0	1,0	3,7016 \pm 1,1421
4T	0,0131 (0,0127-0,0135)	0,0188 (0,0178-0,0200)	1,4	0,7	10,6157 \pm 0,0982
8T	0,0140 (0,0136-0,0144)	0,0185 (0,0178-0,0196)	1,4	0,7	13,6711 \pm 0,0562
9T	0,0131 (0,0127-0,0134)	0,0180 (0,0173-0,0191)	1,4	0,7	11,8127 \pm 0,0999
10T	0,0134 (0,0126-0,0141)	0,0241 (0,0224-0,0264)	1,4	0,9	6,4202 \pm 0,2979

^a= coeficiente angular da reta dose-resposta

* IC_{95} = Intervalo de confiança das CL_{50} e CL_{95} a 95% de probabilidade (em ng de i.a./100 mL)

Larvas L3 foram adicionadas a copos plásticos contendo 100 mL de solução de Temefós. Foram utilizadas várias doses e para cada uma, havia 4 copos contendo 20 larvas cada um. As larvas foram mantidas em contato com o inseticida por 24h e após este período, a mortalidade foi registrada. O critério de mortalidade utilizado foi ausência ou alteração dos movimentos das larvas.

5.5 - Ensaio bioquímico para quantificação da atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas

Foi observado que, para alfa-esterase (Figura 13), beta-esterase (Figura 14), pnpa-esterase (Figura 15), glutatona-s-transferase (Figura 16), oxidase de função mista (Figura 17) e acetilcolinesterase (Figura 18), os perfis de atividade foram

bastante parecidos, o que sugeriu não haver diferença de susceptibilidade a inseticidas entre as linhagens transgênicas quando comparadas ao controle. Isto foi confirmado pelos ensaios com Temefós. A quantidade de indivíduos analisados por linhagem está representada em cada gráfico.

Depois de calculado o percentil 99 dos valores de atividade para cada enzima dos mosquitos selvagens, foi construída a Tabela 5, que mostra a porcentagem de indivíduos com atividade de enzimas acima do percentil 99 do controle. Apenas a linhagem 4T, com relação à atividade de acetilcolinesterase, apresentou taxa acima de 15%, que é considerada atividade parcialmente alterada.

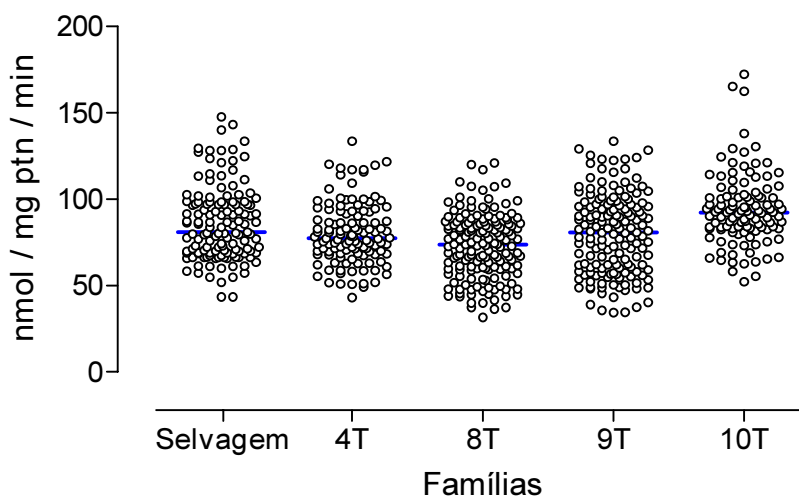


Figura 12 – Análise da atividade da enzima alfa-esterase das linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos. n=número de mosquitos.

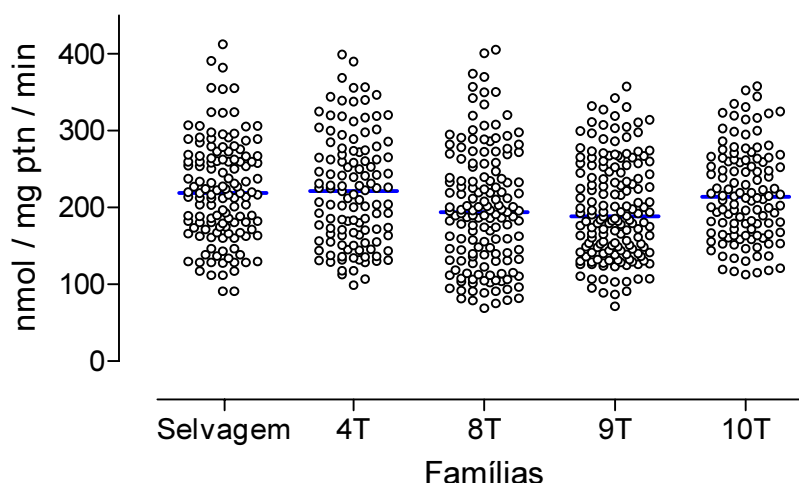


Figura 13 – Análise da atividade da enzima beta-esterase das linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos. n=número de mosquitos.

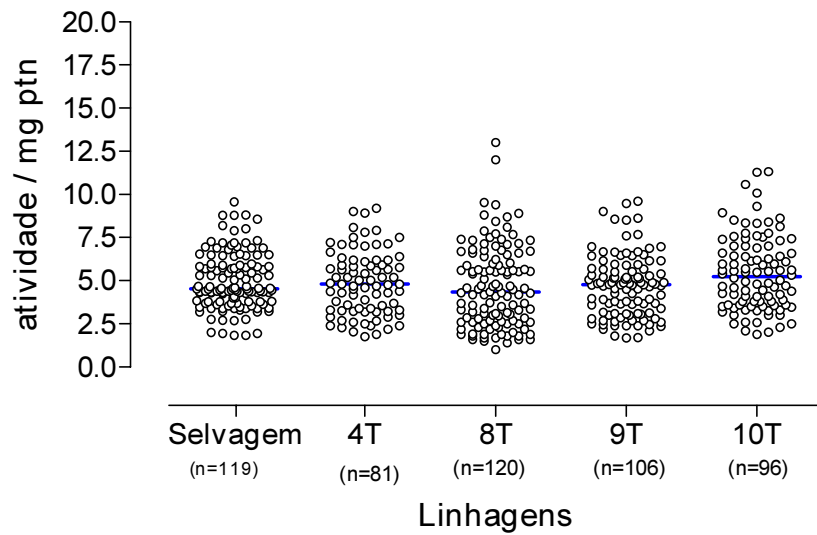


Figura 14 – Análise da atividade da enzima pnpa-esterase das linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos. n=número de mosquitos.

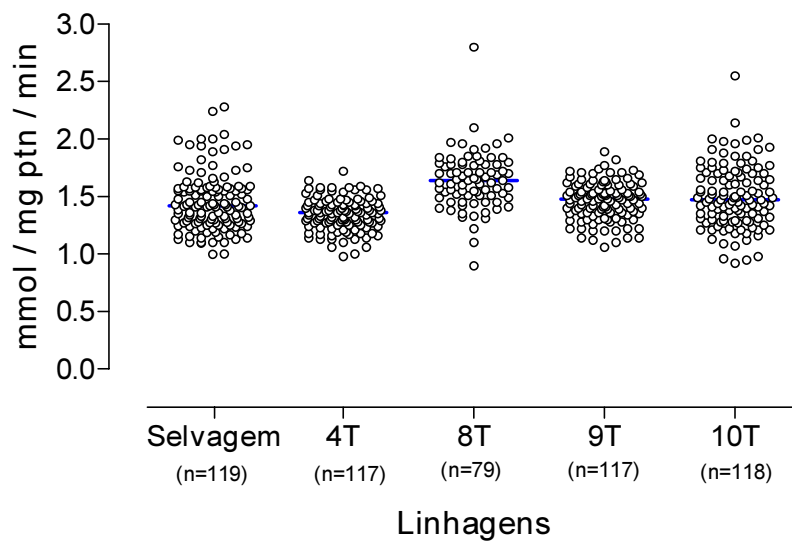


Figura 15 – Análise da atividade da enzima glutationa-s-transferase das linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos. n=número de mosquitos.

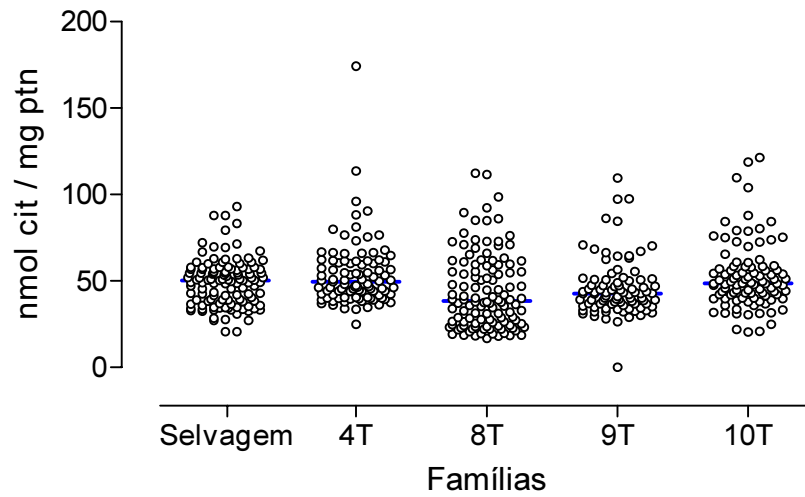


Figura 16 – Análise da atividade da enzima oxidase de função mista das linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos. n=número de mosquitos.

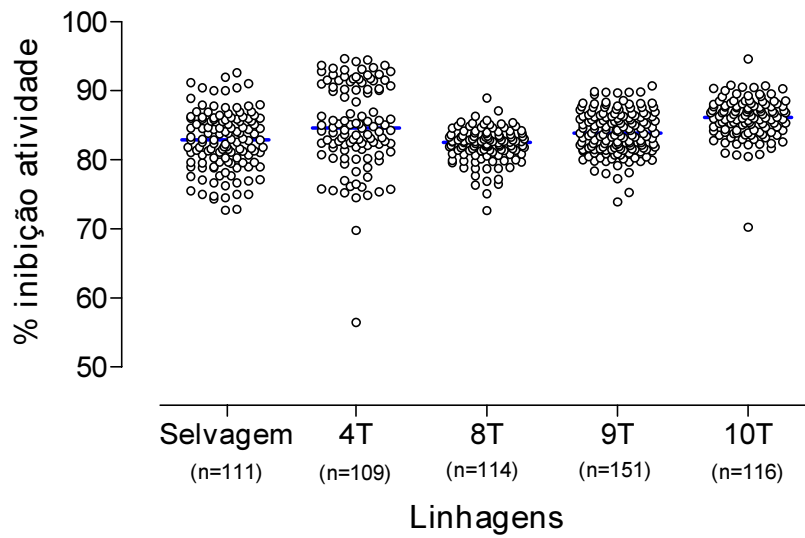


Figura 17 – Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase das linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos. n=número de mosquitos.

Tabela 5 – Atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas de *Ae. fluviatilis* transgênicos e selvagens.

Populações		Ace (%atividade)			Monox		
		n	media	perc 99%	n	media	perc 99%
CONTROLE		125	82,8	91,8	119	49,2	88
		taxa >perc 99%			taxa >perc 99%		
LINHAGEM	4T	109	84,9	16	95	53,9	5
	8T	114	82,2	0	116	44,0	4
	9T	151	84,0	0	89	45,8	3
	10T	116	86,0	1	96	52,6	4
Populações		Est α			Est β		
		n	media	perc 99%	n	media	perc 99%
CONTROLE		133	85,88	142,3	131	222,08	388,3
		taxa >perc 99%			taxa >perc 99%		
LINHAGEM	4T	118	80,2	0	117	222,3	2
	8T	158	72,9	0	147	198,0	1
	9T	155	79,9	0	158	198,0	0
	10T	111	94,0	3	116	218,1	0
Populações		pnpa-Est			GST		
		n	media	perc 99%	n	media	perc 99%
CONTROLE		125	4,97	8,8	132	1,45	2,2
		taxa >perc 99%			taxa >perc 99%		
LINHAGEM	4T	81	4,9	4	117	1,3	0
	8T	120	4,7	4	79	1,6	1
	9T	106	4,7	3	117	1,5	0
	10T	96	5,4	6	118	1,5	1

Legenda:

% de indivíduos acima do percentil 99 do controle:

0-15: Sensível
15-50: Parcialmente resistente
50-100: Resistente

Ace - Acetilcolinesterase

Monox – Monoxigenase

Est α – Alfa esterase

n – número de indivíduos avaliados

Est β – Beta esterase

pnpa-Est – PNPA esterase

GST – Glutathiona-s-transferase

perc 99- Percentil 99

6 – DISCUSSÃO

Como pudemos observar no trabalho em geral, a mutação da molécula de bloqueio (PLA₂), que inativou a enzima, foi suficiente para abolir os efeitos deletérios da atividade desta proteína ao desempenho biológico de *Ae. fluviatilis*, em relação aos parâmetros estudados.

No presente trabalho, foi observado que não houve custo de desempenho adaptativo para nenhuma das linhagens transgênicas, em ambos os sexos, em relação aos selvagens para longevidade (Figuras 4 e 5, Tabelas 1 e 2). Pelo contrário, a longevidade de fêmeas da linhagem 8T foi maior que a do controle, e a longevidade de machos das linhagens 8T, 9T e 10T também foram maiores que a do controle. Cònsoli (1982) testou várias dietas de carboidratos, com ou sem repasto sanguíneo, para verificar o efeito da alimentação sobre a longevidade de *Ae. fluviatilis*. Foi observado que com sacarose, na concentração de 10% (a mesma dieta utilizada em nosso laboratório), a longevidade de machos foi, em média, de 22,3 dias, enquanto a das fêmeas foi de 27 dias, de maneira coincidente com a longevidade observada em nossos resultados.

Em um trabalho comparando o desempenho de três linhagens transgênicas de *Ae. aegypti* (chamadas de EGFP, autoHermes e pBacMOS) derivadas de uma mesma linhagem não-transgênica, que foi utilizada como controle (Orlando), foi observado que a longevidade de Orlando e EGFP foram maiores que pBacMOS, e a longevidade da linhagem autoHermes, na comparação par a par, foi estatisticamente igual à todas as outras (Irvin *et al.*, 2004), o que nos sugere que o custo adaptativo não é causado necessariamente pela transgenia, mas sim por efeitos que certos promotores e/ou genes podem causar. Por isso utilizamos a PLA_{2m}, com a inativação da atividade hidrolítica da enzima, ou seja, se a transgenia por si só não altera o desempenho, e se utilizamos um gene que também não é prejudicial, provavelmente não haverá custo no desempenho dos mosquitos transgênicos.

Em outro estudo, comparando uma linhagem de *An. funestus* resistente e outra susceptível a piretróides, foi avaliada a longevidade. Porém, o modo como estes experimentos foram realizados diferiu bastante dos nossos: 50 fêmeas e 50 machos foram colocados na mesma gaiola (nos nossos experimentos de longevidade, machos e fêmeas permaneciam separados), repasto sanguíneo foi oferecido às fêmeas de dois em dois dias, o que já se sabe aumentar a longevidade (no nosso estudo, foi oferecida apenas sacarose 10%), e os adultos, quando morriam, eram

retirados das gaiolas diariamente e sexados. Não foram observadas diferenças na longevidade entre as linhagens resistentes e susceptíveis à piretróides, e nem entre os sexos (Okoye *et al.*, 2007). Este resultado é contrastante com o que é observado frequentemente: a longevidade de machos costuma ser menor que a longevidade de fêmeas. Em estudo comparando a longevidade de machos e fêmeas utilizando vários carboidratos para nutrição, foi visto que a longevidade dos machos foi de, no máximo, 69 dias, enquanto nas fêmeas (sem repasto sanguíneo) foi de até 94 dias (Cônoli, 1982). Nos nossos resultados, não comparamos estatisticamente a longevidade entre machos e fêmeas, porém as médias podem ser visualmente comparadas (Tabelas 1 e 2) e sugerem diferenças semelhantes.

No presente trabalho, o segundo parâmetro medido foi fecundidade/fertilidade. Vimos que não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens transgênicas e o controle para fecundidade. Já em relação à fertilidade, a linhagem 9T apresentou fertilidade similar à do controle, entretanto as fertilidades de 4T, 8T e 10T foram menores que a do controle (Figura 6 e Tabela 3).

Os ovários das fêmeas desenvolvem-se até certo estágio, e na ausência de repasto sanguíneo, param o desenvolvimento (diapausa ovariana) até que esta refeição seja disponível, quando o desenvolvimento continua. Os ovos são produzidos pelas fêmeas sem a fertilização dos mesmos. Apenas no momento em que há contração do oviduto, que estimula a oviposição, e os ovos passam pelo oviduto comum, é que acontece a fertilização, com a penetração, na micrópila do ovo, dos espermatozoides que estavam armazenados na espermateca (Cônoli & Lourenço-Oliveira, 1998).

Avaliando características reprodutivas de *Ae. fluviatilis* em laboratório, Cônoli *et al.* (1983) avaliaram a produção de ovos, ou fecundidade. Porém esta avaliação foi realizada em todos os ciclos gonotróficos, até a morte das fêmeas, diferentemente do nosso estudo, em que foi avaliada apenas a primeira oviposição relativa à primeira alimentação sanguínea. Na análise dos autores, a média foi de 455 ± 241 ovos/fêmea, em $7,3 \pm 3,2$ repastos/fêmea. Se dividirmos a média do número de ovos pela média do número de repastos, teremos um valor semelhante ao obtido no nosso controle, relativo a um repasto sanguíneo (Tabela 3). A fertilidade também foi avaliada. Foi visto que a fertilidade declina mais rapidamente que a fecundidade, portanto deve haver um ou mais fatores afetando os espermatozoides armazenados na espermateca. Porém, apesar da utilização da mesma espécie, não podemos comparar estes dados com as nossas populações, devido ao fato de termos

analisado apenas a primeira oviposição de cada fêmea, e não todos os ciclos gonotróficos, como foi observado por Cónsoli *et al.* (1983). Em relação ao alto desvio-padrão da fecundidade, foi especulado pelos autores que se a fecundidade é controlada geneticamente, o alto desvio-padrão provavelmente reflete a heterogeneidade da colônia de *Ae. fluviatilis*.

Vários são os fatores que influenciam a capacidade reprodutiva de fêmeas de mosquitos (fecundidade e fertilidade), que são: tamanho do corpo materno, condição nutricional, tamanho do ovo, idade fisiológica e volume e qualidade da refeição sanguínea (Clements, 2000). Devido às condições do desenvolvimento larval afetarem o tamanho do corpo do adulto (que determina o número de ovariolos no ovário), estas condições afetam, conseqüentemente, a fecundidade. Normalmente, fêmeas grandes ingerem mais que duas vezes mais sangue que fêmeas pequenas, e sua produção de ovos é quase quatro vezes maior (Clements, 2000).

Em estudo comparando o desempenho de mosquitos transgênicos com não-transgênicos, foi observado que a fecundidade dos transgênicos foi significativamente menor que a dos não-transgênicos, em especial para a linhagem EGFP (Irvin *et al.*, 2004). Neste mesmo trabalho, como foi citado anteriormente, a mesma linhagem não apresentou custo de desempenho para longevidade, o que mostra que, em um transgênico, pode haver um pior desempenho em um parâmetro e melhor em outro, o que poderia formar uma “balança de equilíbrio”, de um efeito positivo anulando um efeito negativo. Outro trabalho que comparou o desempenho de mosquitos transgênicos com não-transgênicos, porém após repasto sanguíneo contendo parasitas, resultou em maior fecundidade dos mosquitos transgênicos após este tipo de alimentação (Marrelli *et al.*, 2007).

Foi observado que *An. stephensi* que expressava o gene SM1 não mostrou diferença em relação ao controle (não-transgênico), já aqueles que expressavam a PLA₂ apresentaram menor fecundidade (Moreira *et al.*, 2004). A fecundidade de *An. stephensi* carregando a PLA₂ sofreu uma redução significativa de cerca de 73%. Comparando o presente trabalho, utilizando *Ae. fluviatilis* e a PLA₂m, pudemos observar que a fecundidade não foi reduzida significativamente nas linhagens transgênicas, sugerindo que esta molécula (PLA₂m) não deva estar causando danos ao epitélio intestinal dos mosquitos, como a PLA₂ ativa causou em estudos anteriores (Abraham *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2004).

No trabalho mencionado anteriormente em que foram comparadas duas linhagens, uma resistente e outra susceptível à piretróides, observou-se que não

houve diferença estatisticamente significativa também para o número de ovos postos entre elas. A média de ovos postos foi de 80 por fêmea resistente e 73 para a sensível. A porcentagem de larvas emergidas (fertilidade) da linhagem resistente foi significativamente maior que a da sensível. Os autores sugerem que os fatores que controlam a resistência à piretróides em *An. funestus* do sul da África não causam redução no desempenho, mas também não necessariamente sugerem que a linhagem resistente apresente um desempenho melhor que a sensível (Okoye *et al.*, 2007).

O terceiro parâmetro analisado em nosso trabalho foi razão sexual e razão de transgenia. Discutindo a probabilidade da razão sexual de mosquitos anofelinos tropicais no *pool* de acasalamento, Cuéllar (1973) afirma que para a população-alvo, quando ambos os sexos têm probabilidades similares de sobrevivência de adultos diariamente, uma estimativa da população total de um sexo é suficiente para avaliar o outro, pelo fato dos ovos apresentarem razão sexual de 1:1 e a mortalidade durante os estádios aquáticos ser a mesma em ambos os sexos. Em nosso trabalho, na análise da razão sexual de seis gerações das linhagens 4T e 9T, verificou-se desvios da proporção esperada apenas na quinta geração, as proporções de machos e fêmeas desviaram-se do esperado, que é 50%. Já na linhagem 9T, as proporções desviaram-se nas primeira, terceira e sexta gerações. Nas análises em que tomamos apenas os mosquitos transgênicos, e verificamos a razão sexual dos mesmos, foi observado que, na linhagem 4T, as proporções esperadas (também de 50% cada) desviaram-se nas primeira e quinta gerações. Já na linhagem 9T, as proporções esperadas desviaram-se nas primeira, segunda, terceira e quinta gerações (Figuras 11 e 12).

Estudos relacionados à cor do olho sugeriram que a determinação sexual é controlada por um fator localizado no cromossomo que também carrega pares de alelos homólogos normais (Clements, 2000). Análises de cruzamentos entre uma linhagem de *Cx. pipiens* de olhos brancos e a linhagem selvagem sugeriram que o sexo é determinado por um único par de genes, com machos dominando sobre fêmeas, sendo então as fêmeas *mm* e os machos *Mm*. Após este estudo, um outro sobre translocação de heterozigotos também em *Cx. pipiens* mostrou que o menor par de cromossomos carregava o fator sexual e os genes ligados ao sexo. Assumindo segregação igual dos cromossomos sexuais pareados, um cruzamento entre um indivíduo homozigoto recessivo e um heterozigoto irá produzir uma razão sexual de 1:1. Essa razão sexual é frequentemente encontrada em linhagens de

Culex pipiens, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*. Foi pontuado que a determinação do sexo é um caso de polimorfismo balanceado e que forças seletivas irão se opor partindo da proporção ótima de machos e fêmeas que é geralmente, mas não necessariamente sempre, igual. Alguns mecanismos genéticos que modificam a razão sexual têm sido descritos em mosquitos, como o gene *Distorter*, dominante, que está ligado ao fator determinante masculino *M*, ou os dois genes não-alélicos recessivos letais, *l* e *k*, um perto e outro completamente ligado ao locus sexual (Clements, 2000).

A bactéria *Wolbachia* infecta grande variedade de nematódeos e artrópodes, especialmente insetos. Em artrópodes, um dos efeitos freqüentes que a infecção por esta bactéria causa é a distorção da razão sexual (Pfarr & Hoerauf, 2007). Apesar disso, em um estudo de infecção de *Ae. aegypti* por *Wolbachia*, não houve desvio significativo da proporção 1:1, e não foi observada diferença significativa nas razões sexuais dos descendentes (Ruang-Areerate & Kittayapong, 2006).

Analisando o desempenho biológico de várias linhagens de *Ae. aegypti* transgênicas, transformadas com diferentes elementos de transposição, por 4 gerações consecutivas, foram observadas razões sexuais variando de 0 a 80% de fêmeas produzidas em cada geração (Irvin *et al.*, 2004). Esta variação foi grande, assim como no presente trabalho, mas que não chegou a tais extremos. Em outro trabalho que foi analisada a razão sexual, oito linhagens transgênicas de *Cochliomyia hominivorax* foram comparadas com sua linhagem parental não-transgênica para avaliação de desempenho. A análise da razão de machos das linhagens não diferiu do controle, ficando todas as linhagens em torno de 50% (Allen *et al.*, 2004).

Como já foi dito anteriormente, a proporção esperada de transgênicos, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, é de 50% na primeira geração, e 44% a partir da segunda geração (Falconer & Mckay, 1996). Novamente no presente trabalho, na análise da proporção de transgenia de seis gerações da linhagem 4T, verificou-se que as proporções desviaram-se do esperado nas gerações: segunda, terceira e quarta. Já na linhagem 9T, verificou-se que as proporções desviaram-se nas gerações primeira, segunda, terceira, quarta e sexta. As gerações 1, 5 e 6 na linhagem 4T, e 5 na linhagem 9T mostraram-se em equilíbrio. Percebe-se que em todas as gerações em que o equilíbrio de Hardy-Weinberg não foi confirmado, houve uma maior proporção de transgênicos que a esperada, podendo conferir assim uma “vantagem” para os mosquitos transgênicos nestas gerações (por exemplo, no caso

da liberação dos mesmos na natureza, a chance da dispersão do transgene seria maior).

Foi realizado um estudo para avaliar o impacto da manipulação genética no desempenho de *An. stephensi*. Números iguais de mosquitos transgênicos e não-transgênicos foram misturados na mesma gaiola, e a frequência de transgênicos foi avaliada por várias gerações. Em todas as linhagens analisadas, o alelo transgênico decaiu rapidamente até a extinção (Catteruccia *et al.*, 2003). Em estudo já comentado anteriormente, o desempenho de duas linhagens transgênicas carregando os genes anti-Plasmodium SM1 e PLA₂ foi avaliado. Observou-se que para a linhagem SM1 a proporção de transgênicos se manteve dentro da esperada, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, já para a linhagem PLA₂, a proporção de transgênicos caiu até a extinção, em cinco gerações sucessivas analisadas (Moreira *et al.*, 2004).

Já no trabalho de Marrelli *et al.* (2007), em que as linhagens de *An. stephensi* transgênicas SM1 e o controle eram constantemente alimentadas com sangue contendo *P. berghei*, a frequência dos mosquitos transgênicos chegou a alcançar 70% na nona geração e permaneceu relativamente constante após esta. Segundo artigo recente de Lambrechts *et al.* (2008), estes resultados devem ser vistos com cautela se a intenção é utilizar estes mosquitos transgênicos para controle da malária, pois apesar da vantagem evolucionária conferida pelo transgene (já que a infecção pelo parasita traz um custo no desempenho do mosquito), um custo concomitante evita a invasão do mesmo em toda a população. Este custo seria devido à sobredominância, ou seja, há um custo associado em ser homozigoto para o transgene, e então o heterozigoto teria melhor desempenho que o homozigoto transgênico ou a linhagem selvagem. Foi usada modelagem de genética de populações simples para investigar a dinâmica de dispersão dos genes nas populações de mosquitos de gaiolas. Quando o modelo foi comparado às observações empíricas, a melhor simulação de modelagem de desempenho indicou 50% de vantagem pela transgenia (homozigotos ou heterozigotos) sobre os selvagens, quando alimentados em sangue contendo parasitas, e um custo independente de 35% para ser homozigoto para o transgene (Marrelli *et al.*, 2007). Lambrechts *et al.* (2008) concluem que para a dispersão destes genes na natureza, o custo de desempenho da transgenia e a eficácia do mecanismo de direção dos genes serão cruciais mais que qualquer vantagem evolucionária.

O quarto parâmetro avaliado foi a susceptibilidade a inseticidas de mosquitos transgênicos, comparando-os com a linhagem selvagem. A idéia de incluirmos este tipo de estudo na avaliação de desempenho de mosquitos transgênicos é pioneira, e surgiu devido à possibilidade existente do transgene integrar-se, por exemplo, em uma área promotora aumentando a expressão de enzimas detoxificativas, ou interrompendo um gene ligado ao metabolismo de inseticidas (genes das próprias enzimas detoxificativas), já que o transposon pode se integrar aleatoriamente no genoma dos mosquitos. Este fenômeno é conhecido como “efeito de posição” (*position effect*), ou seja, o efeito da mudança de posição de genes relativos a outro que altera a expressão dos mesmos (Raffel & Muller, 1940), ou ainda, a alteração, por rearranjo cromossomal, da posição relativa de um gene em respeito à sua vizinhança (Lewis, 1945). Mosquitos transgênicos podem, devido à integração, serem mais suscetíveis ou resistentes a certos inseticidas, pelos mecanismos apontados acima e com isso, dificultar ou facilitar a sua implementação em campo.

Na literatura, há pouquíssimos estudos utilizando a espécie *Ae. fluviatilis* em geral, inclusive estudos em relação a inseticidas. Um estudo foi realizado em campo e em laboratório para avaliar a ação de K-Othrine (Decamethrin NRDC 161) (Roussel-Uclaf), um piretróide, no controle de *Ae. fluviatilis* e *Cx. fatigans*. Para *Ae. fluviatilis*, foi utilizada a dosagem de 0,2g/m² do produto para aplicação em domicílio, por pulverização das paredes. Insetos desta espécie invadem o domicílio entre 18 e 20h, picam os moradores que estão parados, com a luz acesa ou apagada e, após a hematofagia, pousam nas paredes, descansam cerca de meia hora e saem (Neves *et al.*, 1981). Após o tratamento, o que foi observado é que os mosquitos desapareceram das casas por 31 a 33 dias. Findo este tempo, os insetos ressurgiram aos poucos até que voltassem à população normal em 60 dias. Testes de campo com diluição do produto em água limpa e poluída (testes com larvas), mostraram boa eficiência do mesmo por cerca de até 79 dias, na dosagem de 2,5mg do pó comercial por litro d'água. Em laboratório, a eficiência do produto em água limpa (mortalidade de 100% das larvas) foi até na suspensão de 0,25µg/mL, e em água poluída, a dose eficiente foi de 2,5µg/mL. Em laboratório, a mortalidade de 100% de adultos se deu após contato de 30 minutos em papéis impregnados com uma suspensão contendo 0,25mg/mL do pó comercial (Neves *et al.*, 1981).

Nos nossos ensaios biológicos para verificar a susceptibilidade ao organofosforado Temefós, encontramos as CL₅₀ e CL₉₅ de *Ae. fluviatilis* selvagens e comparamos com as CL₅₀ e CL₉₅ das linhagens transgênicas. Todas as CLs são

expressas em ng de ingrediente ativo/100mL de solução, o que é de ordem de grandeza muito baixa. Um trabalho analisando a resistência de *Ae. aegypti* à organofosforados, utilizando uma cepa de Cuba e quatro da Venezuela, e a conhecida cepa referência de susceptibilidade, *Ae. aegypti* Rockefeller, mostrou CL_{50} da linhagem Rockefeller para o inseticida Temefós sendo de 0,0127 mg/L, que seria o mesmo de dizer 0,0127 μ g/mL, ou ainda, 12,7 μ g/100mL, assim nota-se quão menor a nossa ordem de grandeza se encontra. Todas as outras cepas apresentaram CL_{50} ainda maiores que a linhagem-referência (Bisset *et al.*, 2001). Nos nossos experimentos, de acordo com o teste t, não houve diferença significativa entre as CLs do controle e das linhagens transgênicas (Tabela 4).

A intensidade de resistência refere-se a diferenças de susceptibilidade a um pesticida entre as linhagens susceptível e resistente de um determinado organismo. Essa intensidade é medida através das Razões de Resistência (RRs). Estas são calculadas através da divisão da CL da população-teste pela CL correspondente da população de referência (Bisset *et al.*, 2001).

No presente trabalho, as RR_{50} de todas as linhagens transgênicas foram maiores que a RR_{50} da linhagem selvagem, e as RR_{95} das linhagens transgênicas foram todas menores que a RR_{95} da linhagem selvagem (Tabela 4). Em estudos de resistência que utilizam populações de campo, comparadas a uma população referência de susceptibilidade, a menor inclinação da curva dose-resposta indica que uma população é mais heterogênea geneticamente, e uma maior inclinação indica que uma população é mais homogênea. Talvez este conceito não se aplique ao nosso estudo, pois todas as populações utilizadas são de laboratório, tanto a controle (“selvagem”), que está colonizada há muitos anos no laboratório, sem entrada de mosquitos da natureza, como as transgênicas, diferentemente dos trabalhos realizados com a utilização deste conceito, que normalmente utilizam populações de campo para teste. Todavia utilizaremos aqui a inclinação para ajudar na comparação das CLs obtidas. Neste trabalho, podemos observar que a linhagem selvagem apresentou a menor inclinação, enquanto que a inclinação de todas as linhagens transgênicas foram maiores que o do controle, na seguinte ordem: 10T, 4T, 9T e 8T. Assim, podemos correlacionar o fato das RR_{50} e as RR_{95} de todas as linhagens transgênicas terem sido maiores e menores, respectivamente, que as RR_{50} e RR_{95} do controle, pois esta última população é mais heterogênea que as transgênicas na susceptibilidade ao Temefós, ou seja, para matar 100% do controle, é necessária a utilização de uma maior quantidade de doses de inseticida do que

seria necessária para matar 100% da população de quaisquer das linhagens transgênicas. Levando em consideração que o cálculo das RRs é feito através da divisão da CL da população testada pela CL do controle, observamos que a CL_{50} do controle é menor que as CL_{50} das linhagens transgênicas, e a CL_{95} do controle é maior que a CL_{95} das linhagens transgênicas, apresentando um maior intervalo entre mínima e a máxima CL que o intervalo das linhagens transgênicas.

Continuando no mesmo parâmetro, porém analisando a atividade de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas, pudemos observar que para todas as enzimas testadas (alfa-esterase, beta-esterase, acetilcolinesterase, PNPA esterase, glutathione S-transferase, oxidases de função mista) o perfil de atividade (ou inibição de atividade) de todas as linhagens em relação ao controle foram bastante parecidos. A análise que é feita para estes ensaios bioquímicos, na comparação de uma linhagem de referência com populações-teste, é o cálculo do percentil 99. Após calcularmos o percentil 99 de todas as enzimas da linhagem selvagem, verificamos qual a porcentagem de indivíduos das linhagens transgênicas apresentando atividade acima daquele valor. Se esta porcentagem estiver entre 0 e 15, a população é considerada sensível; se estiver entre 15 e 50 é considerada parcialmente resistente, ou com atividade da enzima alterada; se estiver entre 50 e 100, a população é considerada resistente. Relembrando, novamente, que esta análise é utilizada quando a população de referência é realmente uma referência de susceptibilidade a inseticidas. Portanto, nossos resultados devem ser vistos com cautela, porque todas as classificações que obtivemos das populações foram realizadas com base no nosso controle, a população de *Ae. fluviatilis* não-transgênicos. Resumindo, os nossos resultados não dizem se nossas linhagens são ou não resistentes a inseticidas, mas sim, se elas possuem diferenças em relação à linhagem da qual elas foram originadas.

Pelo cálculo do percentil 99, observamos que para acetilcolinesterase, a linhagem 4T apresentou atividade alterada dessa enzima. Porém a categorização da linhagem 4T para esta enzima em “parcialmente resistente”, ou atividade alterada da enzima, deve ser analisada cuidadosamente, afinal, esta taxa ficou em 16%, que é apenas um percentual acima da categoria em que se enquadram as linhagens sensíveis, ou “sem alteração de atividade enzimática”. Como esta linhagem não apresentou diferenças significativas em relação ao controle nos ensaios biológicos, e acetilcolinesterase está envolvida em metabolização de organofosforados (Hemingway & Ranson, 2000), podemos especular que a alteração da atividade

desta enzima em 4T é praticamente nula, notando-se pelo seu valor da taxa acima do percentil 99 do controle.

No Brasil, devido à observação de incipiente resistência de *Ae. aegypti* à inseticidas, e o grande aumento do número de casos de dengue, foi formado um grupo de monitoramento, o MoReNAa – Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Ae. aegypti* a Inseticidas, em 1999, sob a coordenação da Gerência de Entomologia e Pesquisa Operacional (GTEPO) da Funasa. Alguns laboratórios foram agregados com a proposta de realizar ensaios biológicos e bioquímicos para avaliar o grau de resistência de populações de campo. Entre 1999 e 2000, populações de *Ae. aegypti* de 67 municípios do país foram avaliadas, tendo sido detectada resistência a Temefós principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste. Esta rede está agora incorporada ao PNCD, ou Programa Nacional de Controle da Dengue. Atualmente, todos os laboratórios envolvidos realizam ensaios de susceptibilidade a Temefós (dose-diagnóstica e dose-resposta. Alguns realizam ensaios com adultos de susceptibilidade a outros organofosforados e piretróides, e também ensaios bioquímicos para detecção dos mecanismos de resistência. Entre 1999 e 2000, foi verificada resistência à Temefós nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Assim, foram definidas novas estratégias de controle para *Ae. aegypti* nestas regiões (Braga & Valle, 2007).

Tendo em vista tudo que foi relatado acima, pudemos verificar que nossa hipótese de que a PLA₂ mutada não afetaria o desempenho de mosquitos transgênicos foi confirmada, diferentemente do que ocorria quando se utilizava a PLA₂ em construções de mosquitos transgênicos sem a mutação (Moreira *et al.*, 2004). Seria interessante, para melhorar ainda mais o desempenho de mosquitos transgênicos, a descoberta de genes que prolongassem a longevidade, ou mais, que aumentassem a capacidade reprodutiva destes mosquitos, assim, numa futura liberação destes mosquitos transgênicos na natureza, a dispersão dos transgenes se tornaria maior e mais facilitada. De agora em diante, estamos mais seguros para utilizar a mesma construção de DNA que foi utilizada para transformar *Ae. fluviatilis* em mosquitos vetores da malária humana, como por exemplo, o *An. aquasalis*, e com estes mosquitos testar a capacidade de bloqueio dos mesmos aos *P. falciparum* ou *P. vivax*.

Estamos cientes de que muitos estudos necessitam ser realizados antes que algum grupo possa utilizar mosquitos transgênicos dentro de um programa multidisciplinar de controle da malária. Trabalhos multidisciplinares de campo

precisam ser idealizados, aumentando-se a proximidade ao ambiente natural que os mosquitos enfrentarão. Apesar de muito ainda ser necessário esperamos ter contribuído de alguma forma dentro de todo esse complexo processo.

7 – CONCLUSÕES

- A longevidade de fêmeas *Ae. fluviatilis* da linhagem 8T é maior que de fêmeas selvagens, enquanto que para as demais linhagens a longevidade é igual.
- A longevidade de machos *Ae. fluviatilis* das linhagens 8T, 9T e 10T são maiores que de machos não-transgênicos, enquanto que a longevidade de 4T é igual.
- A fecundidade das fêmeas transgênicas é igual à das fêmeas selvagens.
- A fertilidade de fêmeas transgênicas da linhagem 9T é igual à do controle, enquanto que as fertilidades de 4T, 8T e 10T são menores que a do controle.
- Há desvios para um maior número de mosquitos transgênicos, em algumas gerações, nas linhagens 4T e 9T.
- Há desvios na razão sexual, em algumas gerações, nas linhagens 4T e 9T.
- A susceptibilidade ao Temefós é igual para todas as linhagens de *Ae. fluviatilis* transgênicos em relação aos mosquitos selvagens, apesar de os selvagens serem mais heterogêneos .
- A linhagem 4T possui atividade de acetilcolinesterase parcialmente alterada, em relação ao controle. Para esta mesma enzima, não há alteração em nenhuma das outras linhagens.
- Não há alteração de atividade em nenhuma das linhagens, em relação ao controle, para nenhuma das outras enzimas relacionadas à resistência a inseticidas.
- A mutação da molécula de bloqueio (PLA₂), que inativou a enzima, foi suficiente para abolir os efeitos deletérios da atividade dessa proteína ao desempenho adaptativo de *Ae. fluviatilis*.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham EG, Donnelly-Doman M, Fujioka H, Ghosh A, Moreira LA, Jacobs-Lorena M. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgPer1 regulatory elements. *Insect Mol Biol.* 2005;14:271-9.

Allen ML, Berkebile DR, Skoda SR. Postlarval fitness of transgenic strains of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *J Econ Entomol.* 2004;97(3):1181-5.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 2006;12(2):220-4.

Andreasen MH, Curtis CF. Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Medical and Veterinary Entomology* 2005;19:238–44.

Atkinson PW, Pinkerton AC, O'Brochta DA. Genetic transformation systems in insects. *Annu Rev Entomol.* 2001;46:317-46.

Balu B, Shoue DA, Fraser MJ Jr, Adams JH. High-efficiency transformation of *Plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element *piggyBac*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(45):16391-6.

Baton LA, Ranford-Cartwright LC. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitol.* 2004;129:663-76.

Bisset JA, Rodríguez MM, Molina D, Díaz C, Soca L. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados em cepas de *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop.* 2001;53(1):37-43.

Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JBP, Martins Júnior AJ, Medeiros PFV, Valle D. Effectiveness of Methoprene, an insect growth regulator, against Temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J Med Entomol.* 2005;42(5):830-7.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 2007;16(4):295-302.

Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):605-13.

Casida JE, Quistad GB. Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future? *Annu Rev Entomol.* 1998;43:1-16.

Catteruccia F, Godfray HC, Crisanti A. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science* 2003;299(5610):1225-7.

Clements AN. The biology of mosquitoes. Development, Nutrition and Reproduction. Volume 1: CABI Publishing; 2000.

Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA. Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(7):3748-51.

Cogswell FB. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 1992;5(1):26-35.

Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: Parasite and Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 2005;18(3):570–81.

Cônsoli RAGB. Longevidade dos adultos de *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) quando submetidos a diversas dietas de carboidratos e de sangue (Diptera: Culicidae). *Rev Brasil Biol.* 1982;42(2):303-10.

Cônsoli RAGB, Williams P, Moreno EC, Santos BS. Features of Reproduction in Laboratory-Reared *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) (Diptera:Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1983;78(1):37-47.

Cônsoli RAGB, Lourenço-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ; 1998.

Cuéllar CB. The theoretical sex-ratio of tropical Anophelines. Parasitologia 1973; 15(1):79-85.

de Camargo MV, Cônsoli RA, Williams P, Krettli AU. Factors influencing the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes fluviatilis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1983;78(1):83-94.

Deepak G, Ghislaine MDC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. Int J Parasitol. 2004;34:1413-29.

Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice. Cell 2005;122(3):322-5.

Falconer DS, Mackay TFC. Introduction to Quantitative Genetics. (NY): Addison-Wesley; 1996.

Frischknecht F, Martin B, Thiery I, Bourgouin C, Menard R. Using green fluorescent malaria parasites to screen for permissive vector mosquitoes. Malaria Journal 2006; 5:23.

Glushakova S, Yin D, Gartner N, Zimmerberg J. Quantification of malaria parasite release from infected erythrocytes: inhibition by protein-free media. Malaria Journal 2007;6:61.

Gonzalez-Estevez C, Momose T, Gehring WJ, Salo E. Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(24):14046-51.

- Grech K, Maung LA, Read AF. The effect of parental rearing conditions on offspring life history in *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal* 2007;6:130.
- Grossman GL, Rafferty CS, Fraser MJ, Benedict MQ. The *piggyBac* element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000;30(10):909-14.
- Handler AM, Harrell RA. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol*. 1999;8(4):449-57.
- Handler AM, Harrell RA. Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a *piggyBac* vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001;31(2):199-205.
- Handler AM, McCombs SD. The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol Biol*. 2000;9(6):605-12.
- Hangartner WW, Suchy M, Wipf WK, Zurflueh RC. Synthesis and laboratory and field evaluation of a new, highly active and stable Insect Growth Regulator. *J Agric Food Chem*. 1976;24(1):169-175.
- Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:371-91.
- Hogg JC, Hurd H. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s.l. in north east Tanzania. *Parasitology* 1997;114:325-31.
- Hurd H, Taylor PJ, Adams D, Underhill A, Eggleston P. Evaluating the costs of mosquito resistance to malaria parasites. *Evolution* 2005;59(12):2560-72.
- Irvin N, Hoddle MS, O'Brochta DA, Carey B, Atkinson PW. Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(3):891-6.

Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 2002;417(6887):452-5.

Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Rafferty CS, James AA, Collins FH. Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(7):3743-7.

Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, O'Brochta DA. Ectopic expression of a cecropin transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J Med Entomol.* 2004 ;41(3):447-55.

Lambrechts L, Koella JC, Boëte C. Can transgenic mosquitoes afford the fitness cost? *Trends Parasitol.* 2008;24(1):4-7.

Lewis EB. The relation of repeats to position effect in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1945;30:137-66.

Lyman RF, Lawrence F, Nuzhdin SV, Mackay TF. Effects of single *P*-element insertions on bristle number and viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1996; 143(1):277-92.

Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara L, Hemingway J, Ranson H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005;35:861–71.

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Caldas Júnior AL, Brogdon WG. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102(8):895-900.

Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? *Trends Parasitol.* 2006;22(5):197-202.

Marrelli MT, Li C, Rasgon J, Jacobs-Lorena M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(13):5580-3.

Medica DL, Sinnis P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelli* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infection and Immunity* 2005;73(7):4363-9.

Menge DM, Guda T, Zhong D, Pai A, Zhou G, Beier JC, Gouagna L, Yan G. Fitness consequences of *Anopheles gambiae* population hybridization. *Malaria Journal* 2005; 4(44).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ações de Controle da Malária. Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2007.

Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Abraham EG, Crisanti A, Nolan T, Catteruccia F, Jacobs-Lorena M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem*. 2002;277(43):40839-43.

Moreira LA, Wang J, Collins FH, Jacobs-Lorena M. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics* 2004; 166(3):1337-41.

Neves DP, Linardi PM, Cunha HC. Emprego do K-Othrine (Decamethrin NRDC 161) no controle de *Aedes fluviatilis* e de *Culex pipiens fatigans*: testes de laboratório e de campo. *Rev Brasil Biol*. 1981;41(3):607-14.

Ng'habi KR, John B, Nkwengulila G, Knols BG, Killeen GF, Ferguson HM. Effect of larval crowding on mating competitiveness of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Malaria Journal* 2005;4:49.

Okoye PN, Brooke BD, Hunt RH, Coetzee M. Relative developmental and reproductive fitness associated with pyrethroid resistance in the major southern African malaria vector, *Anopheles funestus*. *Bulletin of Entomological Research* 2007;97:599-605.

Pavlopoulos A, Averof M. Establishing genetic transformation for comparative developmental studies in the crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(22):7888-93.

Peloquin JJ, Thibault ST, Staten R, Miller TA. Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: gelechiidae) mediated by the *piggyBac* transposable element. *Insect Mol Biol.* 2000;9(3):323-33.

Pfarr KM, Hoerauf A. A niche for *Wolbachia*. *Trends Parasitol.* 2007;23(1):5-7.

Prins M. Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 2003;21(9):373-5.

Raffel D, Muller HJ. Position effect and gene divisibility considered in connection with three strikingly similar scute mutations. *Genetics* 1940;25:541-83.

Ranson H, Cornel AJ, Fournier D, Vaughan A, Collins FH, Hemingway J. Cloning and Localization of a Glutathione S-transferase Class I Gene from *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272(9):5464-8.

Riehle MA, Moreira CK, Lampe D, Lauzon C, Jacobs-Lorena M. Using bacterias to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *International Journal for Parasitology* 2007;37:595-603.

Rodrigues FG, Oliveira SB, Rocha BC, Moreira LA. Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae) with the *piggyBac* transposable element. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(7):755-7.

Rodrigues FG, Santos MN, de Carvalho TXT, Rocha BC, Riehle MA, Pimenta PFP, Abraham EG, Jacobs-Lorena M, Alves de Brito CF, Moreira LA. Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. *Insect Molecular Biology* 2008;17(2):175–83.

Ruang-Areerate T, Kittayapong P. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: a potential gene driver of dengue vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12534-9.

Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 1982;218(4570):348-53.

Shahabuddin M, Lemos FJ, Kaslow DC, Jacobs-Lorena M. Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immun*. 1996;64(3):739-43

Thomas D, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 2000;287:2474-6.

Touré YT, Oduola AM, Morel CM. The *Anopheles gambiae* genome: next steps for malaria vector control. *Trends Parasitol*. 2004;20(3):142-9.

Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Medeiros PFV, Martins-Jr AJ, Lima JBP. Metodologia para quantificação de atividades de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. Fundação Oswaldo Cruz e Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro e Distrito Federal. 2006.

Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*. 2001;357:65-72.

Walker K, Lynch M. Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. *Medical and Veterinary Entomology* 2007;21:2–21.

Wei SH, Clark AG, Syvanen M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001; 31(12):1145-53.

WHO. World Health Organization (2007). Disponível no site: <http://www.who.int/tdr/diseases/malaria>. Acesso em junho de 2007.

WHO. Roll Back Malaria. 2008.

World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (WHO/TDR) 2004. Focus: malaria. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(4):276-7.

Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227(3):707-11.

Zieler H, Keister DB, Dvorak JA, Ribeiro JM. 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* 2001;204:4157-67.

9 – ANEXOS

Artigo publicado

Expression of a mutated phospholipase A_2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development

Flávia Guimarães Rodrigues, Máira Neves Santos, Thiago X. T. de Carvalho, Bruno Coelho Rocha, Michael A. Riehle, Paulo F. P. Pimenta, Eapen G. Abraham, Marcelo Jacobs-Lorena, Cristiana F. Alves de Brito e Luciano Andrade Moreira

Insect Molecular Biology (2008). 17 (2): 175–183.

Expression of a mutated phospholipase A₂ in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development

F. G. Rodrigues*, M. N. Santos*, T. X. T. de Carvalho*,
B. C. Rocha*, M. A. Riehle†, P. F. P. Pimenta‡,
E. G. Abraham§, M. Jacobs-Lorena§,
C. F. Alves de Brito* and L. A. Moreira*

*Laboratório de Malária, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-MG, Brazil; †Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, AZ, USA; ‡Laboratório de Entomologia Médica, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-MG, Brazil; and §Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Malaria Research Institute, Baltimore, MD, USA

Abstract

The genetic manipulation of mosquito vectors is an alternative strategy in the fight against malaria. It was previously shown that bee venom phospholipase A₂ (PLA₂) inhibits ookinete invasion of the mosquito midgut although mosquito fitness was reduced. To maintain the PLA₂ blocking ability without compromising mosquito biology, we mutated the protein-coding sequence to inactivate the enzyme while maintaining the protein's structure. DNA encoding the mutated PLA₂ (mPLA₂) was placed downstream of a mosquito midgut-specific promoter (*Anopheles gambiae* peritrophin protein 1 promoter, AgPerl) and this construct used to transform *Aedes fluviatilis* mosquitoes. Four different transgenic lines were obtained and characterized and all lines significantly inhibited *Plasmodium gallinaceum* oocyst development (up to 68% fewer oocysts). No fitness cost was observed when this mosquito species expressed the mPLA₂.

Keywords: transformation, bee venom phospholipase A₂, malaria, *piggyBac*, fitness.

Received 30 August 2007; accepted after revision 19 December 2007. Correspondence: Luciano A. Moreira, Laboratório de Malária, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte-MG, Brazil, CEP 30190-002. Tel.: +55 31 3349 7772; fax: +55 31 3295 3115; e-mail: luciano@cpqrr.fiocruz.br

Introduction

Malaria remains a major global problem, causing an unacceptable toll on the health and economic welfare of the world's poorest communities. An estimated 350–500 million clinical malaria episodes occur annually; most of these caused by infection with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *P. falciparum* malaria causes more than one million deaths a year, mainly in sub-Saharan Africa. It also contributes indirectly to many additional deaths, mainly in young children, through synergy with other infections and illnesses (WHO, 2005).

Problems related to parasite drug resistance, mosquito resistance to insecticides and the lack of an effective vaccine increase the need for alternative strategies for malaria control. By genetically manipulating the mosquito vector it is possible to insert effector molecules that block *Plasmodium* development in the insect (Ito *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Various candidates, including the anticircumsporozoite protein antibody (de Lara Capurro *et al.*, 2000), a dodecapeptide SM1 (Ghosh *et al.*, 2001), cecropin-like peptides (Arrighi *et al.*, 2002), gomesin (Moreira *et al.*, 2007) and the bee venom phospholipase A₂ (PLA₂) (Zieler *et al.*, 2001), have been studied.

Phospholipase A₂ enzymes belong to a protein family which catalyses the hydrolysis of the two-acyl ester bond of glycerophospholipids, leading to the production of free fatty acids and lysophospholipids. Secreted phospholipases A₂ (sPLA₂) have been identified in venoms, but are also distributed in mammalian tissues, fluids, and secretions (Kudo & Murakami, 2002), plants (Lee *et al.*, 2003), bacteria (Sugiyama *et al.*, 2002) and viruses (Canaan *et al.*, 2004; Nagiec *et al.*, 2004). Venom PLA₂s cause diverse pharmacological effects such as neurotoxic, myotoxic or cardiotoxic reactions, or have anticoagulant properties, and some sPLA₂s have been shown to display antibacterial (Buckland & Wilton, 2000; Koduri *et al.*, 2002), antiviral (HIV) (Fenard *et al.*, 1999) or anti-*Plasmodium* activities (Deregnacourt & Scrével, 2000; Guillaume *et al.*, 2004).

PLA₂s from snake, scorpion and bee venoms are potent *in vitro* inhibitors of the intraerythrocytic development of

P. falciparum: their anti-*Plasmodium* activity is more dependent on the presence of exogenous phospholipids in serum than on the hydrolysis of the erythrocyte membrane (Guillaume *et al.*, 2004, 2006). When administered via blood feeding, venom PLA₂s inhibit the *P. falciparum* and *P. gallinaceum* sporogonic cycle by associating with the mosquito midgut epithelium and blocking ookinete adhesion and invasion. This mechanism is independent of PLA₂ catalytic activity (Zieler *et al.*, 2001).

Transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the bee venom PLA₂ blocked both the development of *Plasmodium berghei* oocysts and transmission to naïve mice (Moreira *et al.*, 2002). However, the effector protein reduced female fertility, probably because of damage to midgut epithelial cells (Abraham *et al.*, 2005) that reduced uptake of blood nutrients, and consequently, egg production (Moreira *et al.*, 2004). Fitness of transgenic vectors is a crucial feature when one considers their use in disease control.

Previous studies have shown that histidine at position 48 of pancreatic PLA₂ is crucial for enzymatic activity. Substitution of this residue to asparagine does not affect the enzyme's structural integrity although it reduces its activity fivefold (Janseen *et al.*, 1999).

To maintain the *Plasmodium* blocking ability of the bee venom phospholipase A₂ without causing any fitness-related problem to mosquitoes, we generated point mutations, changing the conserved histidine in its active site (H67), and consequently inactivating the enzyme. We expressed this new protein (mPLA₂) in transgenic mosquitoes and evaluated its effect on the progression of the *P. gallinaceum* cycle.

Results

Using site-directed mutagenesis, we generated two point mutations in the bee venom phospholipase A₂ coding sequence, which resulted in amino acids changes and

enzyme inactivation (Riehle *et al.*, 2007). This approach was pursued because Zieler *et al.* (2001) demonstrated that even inactive venom PLA₂ is able to block *Plasmodium* spp.

The recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*, purified and dialysed in order to decrease the concentration of urea used for its purification. Its effect on *P. gallinaceum* was tested in comparison with the commercial bee venom PLA₂. Recombinant mPLA₂ inhibited *P. gallinaceum* oocyst formation up to 80% when compared with the control (buffer) ($P < 0.05$), while the commercial PLA₂ inhibited parasite development by 91 to 99% when compared to the control ($P < 0.01$). Additionally, the prevalence of infected mosquitoes was always lower when either protein was present in comparison to the control (Table 1).

We used a mosquito midgut-specific promoter [*Anopheles gambiae* peritrophin protein 1 promoter (AgPer1); Abraham *et al.*, 2005] to drive the expression of the mPLA₂ in four independent transgenic lines. Expression of the 3 × P3-EGFP (enhanced green fluorescent protein) marker gene was detected by fluorescence microscopy by screening the G1 larvae and had the same pattern as previously observed in other mosquito species (Kokoza *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006). By PCR, it was possible to amplify both marker (EGFP: 645 bp) and effector (mPLA₂: 480 bp) genes in transgenic lines, but not in control lines. The *Aedes aegypti* actin control (Krebs *et al.*, 2002) was amplified in both transgenic and control mosquitoes (Fig. 1A). The number of transgene copies that integrated was assessed by Southern blot analysis. Genomic DNA was digested with the *Bgl*II enzyme, blotted and a probe comprising the left arm of the *piggyBac* transposable element was used. We observed different transposition events in our four transgenic lines, confirming the integration of the foreign genes in the germline of *Ae. fluviatilis*. As expected, there was no hybridization of the radioactive probe in the wild-type mosquitoes' DNA (Fig. 1B).

Table 1. Effect of recombinant mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) or commercial bee venom PLA₂ on *Plasmodium gallinaceum* oocyst formation†

Exp.	Sample	Infection prevalence‡	Oocyst number (range)	Mean oocyst number	Inhibition§
1	Buffer	74% (20/27)	(0–122)	32.4	–
	mPLA ₂	67% (12/28)	(0–72)	10.7	70%*
	PLA ₂	40% (8/20)	(0–21)	2.8	91%**
2	Buffer	90% (18/20)	(0–120)	21.3	–
	mPLA ₂	40% (8/20)	(0–34)	4.5	76.8%*
	PLA ₂	15% (3/20)	(0–2)	0.2	93%**
3	Buffer	70% (17/27)	(0–277)	39.7	–
	mPLA ₂	33% (8/24)	(0–45)	6.6	80.4%*
	PLA ₂	25% (6/24)	(0–5)	0.4	98.8%**

†Infected blood was mixed with recombinant mPLA₂ or commercial PLA₂ (0.1 μmol/l) or buffer alone (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 0.5 M urea, pH 6.9) prior to feeding. The midguts were dissected 7 days after the bloodmeal and checked for oocysts in order to measure prevalence and parasite intensity. Mean oocyst number was significantly different from mosquitoes fed on buffer, according to Mann–Whitney *U* test (* $P < 0.05$) (** $P < 0.01$). Data are from three independent experiments.

‡Percentage of infected mosquitoes (number of infected mosquitoes/total number of mosquitoes).

§100 – [(mean oocyst number per midgut in experimental mosquitoes/mean oocyst number per midgut in control mosquitoes) × 100].

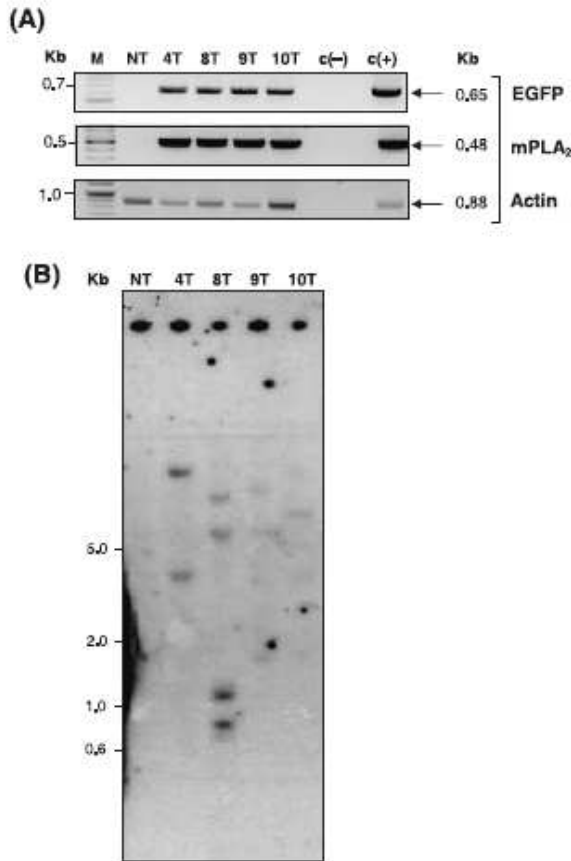


Figure 1. PCR amplification of the EGFP, mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) and Actin genes from genomic DNA isolated from nontransgenic and transgenic *Aedes fluviatilis* larvae. (A) Genomic DNA from nontransgenic (NT) and transgenic larvae from 4T, 8T, 9T and 10T lines were amplified by PCR with primers specific to each target gene (EGFP; mPLA₂; Actin). (B) About 10 µg of transgenic and wild-type mosquito genomic DNA was digested with *Bgl* II and transferred to a nylon membrane. The blot was hybridized with a ³²P-labelled piggyBac left arm probe (0.8 kb *Sa*I fragment). M, 100 bp DNA marker; c(-), no DNA; 4T, 8T, 9T and 10T, transgenic lines; c(+), pBacEGFPAgPermPLA₂ (EGFP and mPLA₂) and *Ae. aegypti* genomic DNA (Actin).

To check whether the AgPer1 promoter could drive the expression of the mPLA₂ in mosquito midguts, we performed RT-PCR using RNA prepared from midgut samples collected prior to (sugar-fed midguts) and after blood

feeding (8 and 48 h post bloodmeal). The AgPer1 promoter drove the production of mPLA₂ in mosquito midguts of all four transgenic lines (Fig. 2). Devenport *et al.* (2004) reported that there were no significant changes in Ag-Aper1 mRNA abundance after a bloodmeal. Our RT-PCR data on expression of AgPer-mPLA₂, although not strictly quantitative, are consistent with similar behaviour for this recombinant construct in *Ae. fluviatilis* (Supplementary Material S1). In other mosquito tissues no mPLA₂ mRNA was detected (Supplementary Material Fig. S2).

The presence of mPLA₂ protein was investigated by immunostaining of mosquito midguts followed by confocal microscopy. The mutated PLA₂ was detected on epithelial cells of midguts from blood-fed mosquitoes using a commercial polyclonal antiserum to bee venom PLA₂. A fluorescent signal was detected towards the luminal side of midgut epithelial cells, where the cell secretory vesicles are also localized. There, one could expect to find AgPer1 in equivalent cells from *An. gambiae*. In nontransgenic mosquito midguts a light green background signal was detected (Fig. 3). The specificity of the polyclonal antibody was verified by Western blots using commercial bee venom PLA₂ in which our recombinant mPLA₂ protein was easily recognized (data not shown).

The effect of the mPLA₂ expression on the development of *P. gallinaceum* in the mosquito was assessed by simultaneously feeding transgenic and nontransgenic female mosquitoes on the same infected chickens and by counting the number of *Plasmodium* oocysts in mosquito midguts 7 days after infection. At least three independent experiments were performed for each transgenic line. All transgenic lines significantly reduced oocyst numbers compared to nontransgenic siblings (17.5 to 68.5% inhibition), although the level of inhibition was not as high as when recombinant protein was added to the bloodmeal (Table 2). When infected mosquitoes were maintained for 15 days and had their salivary glands removed to check for the presence of sporozoites, transgenic mosquitoes had significantly fewer sporozoites than nontransgenic adult females (Supplementary Material Table S1).

To check whether the expression of mPLA₂ had any influence on mosquito overall fitness, we performed some experiments to assess the stability of the transgene

Figure 2. Mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) mRNA expression in *Aedes fluviatilis* transgenic lines. Total RNA samples isolated from nontransgenic (NT) and transgenic mosquito (4T, 8T, 9T and 10T) midguts (before and after a bloodmeal) were subjected to RT-PCR analysis using primers specific to the mPLA₂ gene (A), to the RP49 gene (ribosomal protein) (B) or as a control, without the reverse transcriptase enzyme (C). M1, 100 bp DNA marker; M2, 1 kb plus DNA marker; c(-), no cDNA; c(+), pBacEGFPAgPermPLA₂ (in A).

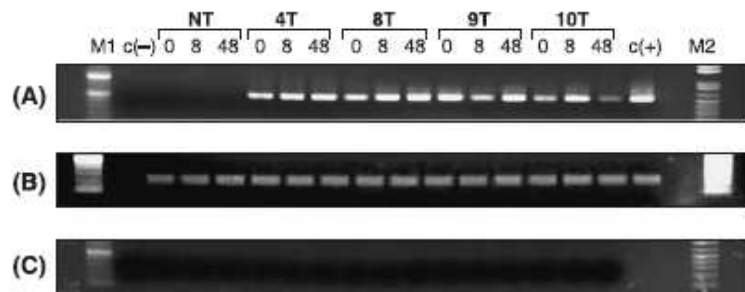


Table 2. Effect of expression of mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) in transgenic *Aedes fluviatilis* on *Plasmodium gallinaceum* oocyst formation

Experiment	Mosquitoes	Prevalence†	Oocyst‡	Inhibition§
1	Control	96% (43/45)	51.9 (0–170)	–
	4T	86.2% (25/29)	26 (0–63)	49.9%*
2	Control	96.4% (27/28)	41.9 (0–148)	–
	4T	75% (21/28)	13.4 (0–136)	68%*
3	Control	90% (29/32)	83.6 (0–287)	–
	4T	86% (19/22)	40.1 (0–168)	52%*
4	Control	87.5% (35/40)	104.75 (0–240)	–
	4T	71% (16/21)	65.6 (0–259)	37.3%*
5	Control	80.6% (25/31)	26.4 (0–136)	–
	8T	75.6% (31/41)	19.4 (0–120)	26.5%*
6	Control	74% (20/27)	12.7 (0–50)	–
	8T	59% (13/22)	4 (0–44)	68.6%*
7	Control	85.2% (41/49)	48 (0–213)	–
	8T	75% (23/30)	34 (0–200)	21.9%*
8	Control	83.3% (30/36)	34.8 (0–160)	–
	9T	71.4% (15/21)	20.5 (0–64)	41.2%*
9	Control	100% (39/39)	49.8 (1–172)	–
	9T	80.9% (17/21)	41.2 (0–184)	17.5%*
10	Control	78.3% (18/23)	11.9 (0–71)	–
	9T	65% (13/20)	8.6 (0–40)	27.7%*
11	Control	87.5% (21/24)	7.5 (0–56)	–
	10T	81.8% (9/11)	3.8 (0–9)	49.3%*
12	Control	93% (38/40)	63.8 (0–212)	–
	10T	50% (10/20)	27.1 (0–124)	57.5%*
13	Control	100% (32/32)	120.4 (12–291)	–
	10T	85.7% (19/21)	84.4 (0–198)	30%*

†Percentage of infected (actual numbers in parentheses).

‡Arithmetic mean of oocyst number per mosquito gut. The range of observed values is indicated in parentheses.

§100 – [(mean oocyst number in transgenic mosquitoes/mean oocyst number in control mosquitoes) × 100].

*Reduction of oocyst number/gut was significant (*P*-value < 0.05) for all lines, as calculated by the Mann–Whitney *U*-test.

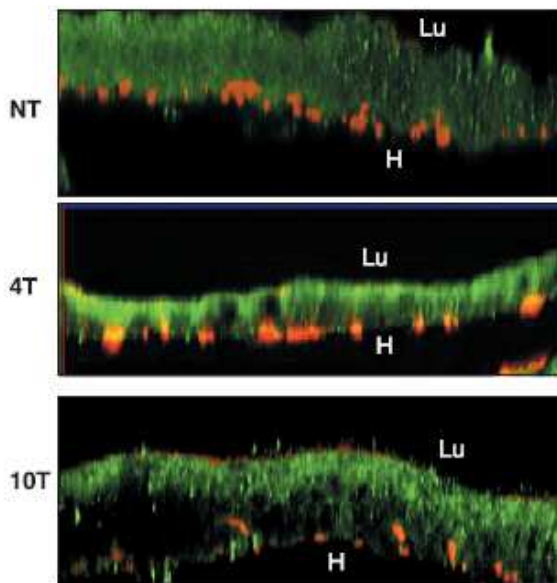


Figure 3. Immunofluorescence staining of transgenic mosquitoes midguts by antimutated phospholipase A₂ (anti-mPLA₂). Midgut from nontransgenic mosquito (NT), 4T and 10T transgenic mosquito lines 24 h postbloodmeal treated with anti-rabbit PLA₂ and Alexa 488 secondary antibody (green) plus rhodamine phalloidin (red), to label the muscle cells (400× magnification). Lu, midgut lumenal side; H, haemocoel.

through generations and measured biological parameters such as fertility and survivorship. The proportion of transgenic mosquitoes from two different lines was compared with nontransgenic counterparts and, as shown in Supplementary Material Fig. S3, the number of transgenic individuals was significantly higher than nontransgenic mosquitoes for several generations. In addition, there was no difference in egg production between nontransgenic and transgenic mosquitoes; survival was significantly longer in most of the lines for both male and female mosquitoes (Supplementary Material Table S2).

Discussion

This is the first report on the generation of transgenic *Ae. fluviatilis* mosquitoes bearing a parasite-blocking molecule. The idea of expressing the inactive bee venom PLA₂ was based on our previous observations that transgenic *An. stephensi* mosquitoes expressing the active enzyme significantly reduced their egg production (Moreira *et al.*, 2004), probably because of midgut epithelia damage (Abraham *et al.*, 2005) which may have compromised nutrient absorption. That effect was not observed by Zieler *et al.* (2001), who were the first to report the *Plasmodium* blocking feature of venom PLA₂ in mosquitoes. When those authors chemically inactivated the enzyme, mixed with a

parasite-enriched bloodmeal and fed female mosquitoes, no fitness-related problems were detected (Zieler *et al.*, 2001). We presume that damage occurs when the wildtype enzyme is expressed intracellularly.

We expressed the mutated bee venom PLA₂ (mPLA₂) in bacteria as a recombinant protein. This protein had similar *in vitro* parasite-blocking ability when compared to our control, the commercial bee venom PLA₂, which encouraged us to express this molecule in mosquitoes. The idea of using midgut-specific promoters to express potential parasite effector molecules has been pursued in different studies (Ito *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Abraham *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2006). As the parasite's early sporogonic stages develop within the mosquito midgut environment, the expression of a blocking molecule in that tissue could target gametocytes, gametes, zygotes and ookinetes (Baton & Ranford-Cartwright, 2005).

The AgPer1 protein is a major constituent of the peritrophic matrix, which protects the midgut during a bloodmeal (Shen *et al.*, 1998). In anopheline mosquitoes, peritrophic matrix proteins are stored in vesicles within the mosquito midgut epithelial cells (Devenport *et al.*, 2004) and are immediately released upon blood feeding. In culicine mosquitoes (*Aedes* spp.), epithelial cells store peritrophin mRNA and protein translation is initiated upon blood feeding (Devenport *et al.*, 2006). Although we used an anopheline promoter to express a transgene in *Aedes*, which last shared a common ancestor at least 140 million years ago (Service, 1993), the *Anopheles* regulatory sequences was recognized by *Ae. fluviatilis*. Previously, another gut-specific promoter from an anopheline mosquito (*An. gambiae* carboxypeptidase) was also able to drive a transgene expression in *Ae. aegypti* (Moreira *et al.*, 2000).

The effect of phospholipase A₂ towards *Plasmodium* development has been extensively studied (Deregnacourt & Scrével, 2000; Zieler *et al.*, 2001; Guillaume *et al.*, 2004), although the exact mechanism of action is not completely understood. In culture, PLA₂s have an indirect effect by degrading lipoproteins present in serum, which in turn produce components (eg arachidonic, linoleic and docosahexaenoic acid) toxic to the parasite (Guillaume *et al.*, 2006).

Confocal microscopy was used to localize the transgenic protein in blood-fed mosquito midguts presenting a homogeneous distribution throughout the tissue towards the lumenal side of the epithelial cells. The localization is similar to that of the peritrophic matrix protein (Ag-Aper1) in *An. gambiae* (Devenport *et al.*, 2004), which demonstrates that the transgenic protein is being properly processed within the mosquito midgut.

Inhibition of oocyst development varied among different transgenic lines and even within lines, in different experiments. Those differences can be a result of various factors including degree of mosquito infection, chicken parasitemia upon infection and effector protein expression in different

lines (Coates *et al.*, 1998; Perera *et al.*, 2002; Marcus *et al.*, 2004). Furthermore, the location of transgene insertion can have a strong influence on the gene expression, whether lying on a euchromatic or heterochromatic region (Bouldesteix & Biéumont, 2005). It is important to note that in all experiments we worked with heterozygous transgenic lines, as we have been crossing transgenic mosquitoes with colony nontransgenic adults for several generations in order to reduce the possibility of associating the transgene with deleterious alleles that might become fixed when one establishes homozygous lines early in the process (Catteruccia *et al.*, 2003; Marrelli *et al.*, 2006). When working with homozygous lines, which should have higher levels of the effector molecule, we would expect a higher degree of inhibition but that has yet to be tested.

This effector molecule is a strong candidate to be tested in human malaria vectors as Zieler *et al.* (2001) have already demonstrated the effect of PLA₂ towards *P. falciparum* infecting *An. stephensi* and *An. gambiae* mosquitoes, and also because we have shown here that mosquito fitness was not compromised with the expression of mPLA₂.

We are aware that transgenic mosquitoes bearing only one effector molecule will not be sufficient to block parasite transmission. For *P. gallinaceum* it has been experimentally demonstrated that mosquitoes bearing only 20 sporozoites can infect a naïve chick (Jasinskiene *et al.*, 2007). Other blocking molecules must be studied in order to generate a mosquito that, for instance, would block parasites within their midguts (by using midgut-specific promoters) and also when traversing the salivary glands (molecules driven by salivary gland-specific promoters). In that way, the possibility of plasmodia overcoming those barriers would be reduced.

The genetic modification of mosquito vectors is important not only for generating parasite-blocking mosquitoes for the control of malaria, but also as a tool for studying parasite–mosquito interactions.

Experimental procedures

Mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) and protein expression

Point mutations relative to the original PLA₂ cDNA sequence (Moreira *et al.*, 2002) were obtained by PCR site-directed mutagenesis (Riehle *et al.*, 2007). The histidine (codon CAC) residue in the active site was modified to asparagine (AAC) in order to inactivate the bee venom phospholipase A₂ without altering its conformation (mPLA₂). An extra point mutation was made on position 62 [codon GCA (A) was changed to ACA (T)].

The mPLA₂ coding sequence was cloned into the pET32a expression vector. Recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain and induced with 1 mM IPTG for 4 h. After induction, cells were pelleted and resuspended in 250 ml chilled lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 2 mg/ml lysozyme), frozen in dry ice/ethanol bath and then sonicated. Lysed cells were centrifuged (10 000 g for 16 min, at 4 °C) and after washing, the pellet was resuspended in milli-Q water (50 ml). Protein purification was performed by affinity chromatography in a column packed

with 1.0 ml nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA; Qiagen, Valencia, CA, USA) resin and eluted according to the manufacturer's protocol. Purified fractions were collected and dialysed (12 kDa cutoff) to decrease urea concentration and analysed by SDS-PAGE.

Construction for mosquito transgenesis

The promoter region, 5'UTR and 3'UTR sequences from *An. gambiae* peritrophic matrix protein 1 (AgAper1) were cloned in pUC19 (Abraham et al., 2005). The mutated bee venom PLA₂ replaced the original PLA₂ by restriction digesting the pUC19 (AgPer1/PLA₂) plasmid with *KpnI* and *BamHI*. The mPLA₂ was inserted into *KpnI* *BamHI* sites, between the 5' and 3' fragments of AgAper1, in pUC19. A *PstI* site 610 bp downstream from the 5' end of the AgAper1 cloned promoter and pUC19 multiple cloning site *PstI* were used to release the fragment carrying 2570 bp 5'-AgAper1 + 480 bp mPLA₂ sequence + 907 bp AgAper1 3' sequence. This *PstI* fragment was subcloned into the *PstI* site of the pSLfa1180fa shuttle vector, which has unique *FseI* and *AscI* sites. The plasmid was digested with both enzymes and the fragment was inserted into *FseI/AscI* sites of *piggyBac*[3 × P3-EGFPpafm] to generate *piggyBac*[3 × P3-EGFP(AgAper1PLA₂m)]. The final plasmid was sequenced to verify the inserts before microinjection.

Mosquitoes

Ae. fluviatilis were reared at 27 °C and 80% humidity under a 12 h light/dark cycle, and adults were fed on 10% sucrose solution *ad libitum*. For egg production female mosquitoes were blood fed on anaesthetized Swiss Webster mice.

Microinjection and mosquito rearing

Ae. fluviatilis embryos were injected, as previously described (Rodrigues et al., 2006), with a mixture of *piggyBac*[3 × P3-EGFP(AgPerPLA₂m)] plasmid (0.3 µg/µl) and *piggyBac* helper plasmid (0.2 µg/µl), which encodes the pBac transposase (Handler & Harrell, 1999). Transformants were selected by screening the G1 larvae for the presence of green fluorescent protein (GFP)-positive individuals using a fluorescent stereomicroscope. Individually transformed adult mosquitoes were mated with nontransgenic mosquitoes to establish stable transgenic lines. Transgenic mosquito lines have been maintained for several generations as heterozygotes.

Detection of the transgene

Larval genomic DNA was isolated by an adapted protocol (Black & Munstermann, 1996). Briefly, fourth instar larvae from all transgenic lines or nontransgenic siblings were frozen in dry ice: ethanol bath, homogenized in grinding buffer (0.1 M NaCl; 0.2 M sucrose; 0.1 M Tris-HCl pH 9.1; 0.05 M EDTA; SDS 0.05%) and incubated at 65 °C for 30 min. Following proteinase K digestion for 3 h at 52 °C, the DNA was extracted with phenol and phenol:chloroform:isoamyl alcohol. After air drying, the DNA pellet was solubilized in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. For PCR analysis, primers specific to EGFP marker (EGFPF: 5'-GGTGCCCATCCTGGTCGAGC-3' and EGFP R: 5'-GCGGTCACGAAGTCCAGCAGG-3'); mPLA₂ (PLAMF: 5'-GGTACCTGGCAAATCAGGGATAGG-3' and PLAMR: 5'-GGATCCCTATCAGGCGTAGTCGG-3') and actin (ActinF: 5'-AAGGTGTGATGGTCGGTA-3' and actinR: 5'-TCATTGCCAC-CAGAAC-3'; Krebs et al., 2002) genes were used.

For Southern blot analysis, 10 µg of genomic DNA was digested with 10 U of *BglII* (Promega, Madison, WI, USA), separated on a 0.7% agarose gel and the blot hybridized with a ³²P-labelled *piggyBac* left arm probe (0.8 kb *SaII* fragment). Blots were exposed to x-ray film for 1 week, at -80 °C.

Transgenic PLA₂ mRNA expression

Mosquito midguts were dissected from transgenic and wildtype mosquitoes at several time-points after blood feeding. All tissues were immediately frozen in an ethanol/dry ice bath and stored at -80 °C. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA synthesis was performed with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with 0.5 µg total RNA from each sample as a template for the reactions and oligo-dT primer. To avoid genomic DNA carry over, total RNA was treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega). After cDNA synthesis, oligonucleotides specific to the mPLA₂ fragment [AGPERF – 5'-GTGTGGTGTACTGTGGC-3'; PLAMR (see above)] were used to amplify the mPLA₂ gene by PCR (95 °C for 2 min and 30 cycles of 95 °C for 1 min; 55 °C for 1 min; 72 °C for 1 min). As a control, we used a ribosomal specific gene (Gentile et al., 2005) (RP49 F: 5'-GTGAAGAAGCGGACGGAAGAAGTT-3' and RP49 R: 5'-TGCATCATCAGCACCTCCAGC-3') (95 °C for 2 min and 30 cycles of 95 °C for 1 min; 61 °C for 1 min; 72 °C for 1 min).

Midgut immunostaining

Midguts from transgenic and nontransgenic mosquitoes fed on naïve mice were dissected in phosphate-buffered saline (PBS; 130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄ · H₂O, pH 7.4) and fixed for 2 h in 4% paraformaldehyde. Fixed tissues were washed with PBS three times for 5 min and blocked in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium for 2 h at room temperature. In between each of these steps, midguts were washed twice for 5 min with PBS, following incubation with PBT/BSA (1% bovine serum albumin, 0.2% Triton in PBS pH 7.5) for 30 min. The anti-rabbit PLA₂ (Nordic, The Netherlands) was diluted in blocking solution AC Dako (1 : 2000) (Dakocytomation, Denmark) and incubated with the midguts at 4 °C overnight. Secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used at a 1 : 500 dilution in Ac Dako for 2 h at room temperature. After each antibody incubation, the tissue was washed three times for 5 min with PBT. The tissues were then incubated with rhodamine/phalloidin (diluted in PBT) for 2 h following another washing step. Immunostainings were analysed with a confocal microscope (LSM510, Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 400×, using a 505–530 nm filter.

Plasmodium gallinaceum blocking experiments

The effect of the recombinant protein (mPLA₂) on the development of the bird malaria parasite was tested, *in vitro*, in three independent experiments. mPLA₂ was added to *P. gallinaceum*-infected chicken blood (0.1 µmol/l) and offered to *Ae. fluviatilis* female mosquitoes through a membrane feeding apparatus. Buffer alone (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 0.5 M urea, pH 6.9) and native PLA₂ (0.1 µmol/l, Sigma, St Louis, MO, USA) [able to inhibit the development of the parasite as demonstrated by Zieler et al. (2001)], were used as controls.

The effect of the mutated protein towards parasite development was also tested in transgenic mosquitoes. *P. gallinaceum* 8A parasite strain was inoculated intra-peritoneally into 2-day-old chicks and parasitemia checked daily via Giemsa-stained blood smears. Transgenic and nontransgenic mosquitoes (3–5 days old) maintained with sugar supplemented with 0.5 g/l p-aminobenzoic acid plus 0.025% gentamicin, were allowed to feed on gametocyte-positive chicks (10–15% parasitemia). Fully engorged mosquitoes were separated after 24 h and kept at 27 °C with 10% sugar solution. After 7 days, midguts were dissected, stained with mercurochrome (2% solution) and the number of oocysts per midgut was determined by microscopy (DIC-100×). The head was separated from the thorax in order to screen, on a fluorescence stereoscope, which midguts belonged to each transgenic or nontransgenic mosquitoes. The procedure was carried out by another person in a double blind assay to avoid any bias with oocyst counting.

To check for sporozoites, transgenic and nontransgenic sibling mosquitoes were infected with *P. gallinaceum* and after 7 days some mosquitoes were dissected to check for oocysts. Fifteen days postinfection the thoraces were separated from the abdomens. Twelve mosquito thoraces and heads were directly transferred to a 0.5 ml tube (previously perforated with a 25 × 7 mm needle and containing glass wool on the bottom) that was then placed inside a 1.5 ml microcentrifuge tube. One hundred microlitres of RPMI 1640 was added to each tube and centrifuged at 3000 g for 5 min at 4 °C. The bottom tube was replaced and this last step was repeated twice, after which all the collected flow-through was mixed and centrifuged at 3000 g for 15 min. The supernatant was removed, leaving about 10 µL inside each tube. Forty microlitres of RPMI 1640 were added and after resuspension 10 µL was transferred to a hemacytometer and counted using a DIC-microscope at 400× magnification.

Fitness of transgenic mosquitoes

Fifty heterozygous virgin transgenic female mosquitoes were crossed with 50 nontransgenic male mosquitoes. One hundred larvae of each progeny were randomly selected in order to check the proportion of transgenic individuals. Subsequent crosses were made, with the same number of randomly chosen male and female individuals. The proportion of male and female adults was recorded. These experiments were followed for five generations.

For egg production, 3-day-old females from nontransgenic and transgenic lines were blood fed and after 3 days their wings were removed and the insects confined in 4 cm Petri dishes containing wet filter paper to collect the eggs. These experiments were repeated four times. To check mosquito survivorship, 1-day-old male and female mosquitoes were grouped in cages, offered sucrose *ad libitum* and mortality was observed every day until all had died. Three independent experiments using female mosquitoes and two with male individuals were performed.

Statistical analysis

The blocking ability of both the recombinant protein and the transgenic mosquitoes expressing the mPLA₂ towards *P. gallinaceum* was analysed with the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Biological parameters were analysed with Kruskal–Wallis and Mann–Whitney *U* tests (Dawson & Trapp, 2001) and chi-square analysis was performed (5% probability) to check whether the population reached the Hardy–Weinberg equilibrium after the second generation.

Acknowledgments

We are in debt to Tatiana A. da Silva for technical support on confocal analysis, Fernanda O. Rezende on sporozoite assays, Ana Paula M. Rebouças for statistical analysis and Paula M. Nogueira on fitness experiments. F.G.R., T.X.T.C., B.C.R. and L.A.M. received fellowships from CNPq. This work was partially funded by TDR/WHO and FAPEMIG.

References

- Abraham, E.G., Donnelly-Doman, M., Fujioka, H., Ghosh, A., Moreira, L.A. and Jacobs-Lorena, M. (2005) Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgPer1 regulatory elements. *Insect Mol Biol* **14**: 271–279.
- Arrighi, R.B., Nakamura, C., Miyake, J., Hurd, H. and Burgess, J.G. (2002) Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2104–2110.
- Baton, L.A. and Ranford-Cartwright, L.C. (2005) Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *Trends Parasitol* **21**: 573–580.
- Black, W.C. and Munstermann, L.E. (1996) Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. In *The Biology of Disease Vectors* (Beatty, B.J. and Marquardt, W.C. eds), pp. 438–470. University Press of Colorado, Niwot.
- Boulesteix, M. and Biéumont, C. (2005) Transposable elements in mosquitoes. *Cytogenet Genome Res* **110**: 500–509.
- Buckland, A.G. and Wilton, D.C. (2000) The antibacterial properties of secreted phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* **1488**: 71–82.
- Canaan, S., Zadori, Z., Ghomashchi, F., Bollinger, J., Sadilek, M., Moreau, M.E. *et al.* (2004) Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A₂. *J Biol Chem* **279**: 14502–14508.
- Catteruccia, F., Godfray, H.C. and Crisanti, A. (2003) Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science* **299**: 1225–1227.
- Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L. and James, A.A. (1998) Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3748–3751.
- Dawson, B. and Trapp, R.G. (2001) *Basic & Clinical Biostatistics*. 3rd edn. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- De Lara Capurro, M., Coleman, J., Beerntsen, B.T., Myles, K.M., Olson, K.E., Rocha, E. *et al.* (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.
- Deregnacourt, C. and Schrével, J. (2000) Bee venom phospholipase A₂ induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components. *J Biol Chem* **275**: 39973–39980.
- Devenport, M., Fujioka, H. and Jacobs-Lorena, M. (2004) Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **13**: 349–358.
- Devenport, M., Alvarenga, P.H., Shao, L., Fujioka, H., Bianconi, M.L., Oliveira, P.L. *et al.* (2006) Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUC1 as a heme-binding protein. *Biochemistry* **45**: 9540–9549.

- Fenard, D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J.C., Lazdunski, M. and Doglio, A. (1999) Secreted phospholipase A₂, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J Clin Invest* **104**: 611–618.
- Franz, A.W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z.N., Blair, C.D., Beaty, B.J., James, A.A. et al. (2006) Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 4198–4203.
- Gentile, C., Lima, J.B. and Peixoto, A.A. (2005) Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**: 545–547.
- Ghosh, A.K., Ribolla, P.E. and 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.
- Guillaume, C., Deregancourt, C., Clavey, V. and Schrével, J. (2004) Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA, and III secreted phospholipases A₂ are serum-dependent. *Toxicon* **43**: 311–318.
- Guillaume, C., Calzada, C., Lagarde, M., Schrével, J. and Deregancourt, C. (2006) Interplay between lipoproteins and bee venom phospholipase A₂ in relation to their anti-*Plasmodium* toxicity. *J Lipid Res* **47**: 1493–1506.
- Handler, A.M. and Harrell, R.A. 2nd. (1999) Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol Biol* **8**: 449–457.
- Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E.A. and Jacobs-Lorena, M. (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* **417**: 452–455.
- Janseen, M.J.W., Van de Wiel, W.A., Beilboer, S.H., Van Kampen, M.D., Verheij, H.M., Slotboom, A.J. et al. (1999) Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A₂ probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng* **12**: 497–503.
- Jasinskiene, N., Coleman, J., Ashikyan, A., Salampessy, M., Marinotti, O. and James, A.A. (2007) Genetic control of malaria parasite transmission: threshold levels for infection in an avian model system. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 1072–1078.
- Kim, W., Koo, H., Richman, A.M., Seeley, D., Vizioli, J., Klocko, A.D. et al. (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**: 447–455.
- Koduri, R.S., Gronroos, J.O., Laine, V.J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J. et al. (2002) Bactericidal properties of human and murine group I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem* **277**: 5849–5857.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E.A. and Raikhel, A.S. (2001) Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3 × P3-EGFP_{afm}]. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 1137–1143.
- Krebs, K.C., Brzoza, K.L. and Lan, Q. (2002) Use of subtracted libraries and microarray to isolate developmentally specific genes from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1757–1767.
- Kudo, I. and Murakami, M. (2002) Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipids Mediat* **68–69**: 3–58.
- Lee, H.Y., Bahn, S.C., Kang, Y.M., Lee, K.H., Kim, H.J., Nohn, E.K. et al. (2003) Secretory low molecular weight phospholipase A₂ plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1990–2002.
- Marcus, J.M., Ramos, D.M. and Monteiro, A. (2004) Germline transformation of the butterfly *Bicyclus anynana*. *Proc Biol Sci* **271**: 263–265.
- Marrelli, M.T., Moreira, C.K., Kelly, D., Alphey, L. and Jacobs-Lorena, M. (2006) Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? *Trends Parasitol* **22**: 197–202.
- Moreira, C.K., Rodrigues, F.G., Ghosh, A., Varotti, F.P., Miranda, A., Daffre, S. et al. (2007) Broad effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of *Plasmodium* spp. *Exp Parasitol* **116**: 346–353.
- Moreira, L.A., Edwards, M.J., Adhami, F., Jasinskiene, N., James, A.A. and Jacobs-Lorena, M. (2000) Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10895–10898.
- Moreira, L.A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Eappen, G.A. et al. (2002) Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* **277**: 40839–40843.
- Moreira, L.A., Wang, J., Collins, F.H. and Jacobs-Lorena, M. (2004) Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics* **166**: 1337–1341.
- Nagiec, M.J., Lei, B., Parker, S.K., Vasil, M.L., Matsumoto, M., Ireland, R.M. et al. (2004) Analysis of a novel prophage-encoded group A Streptococcus extracellular phospholipase A₂. *J Biol Chem* **279**: 45909–45918.
- Perera, O.P., Harrell II, R.A. and 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**: 291–297.
- Riehle, M.A., Moreira, C.K., Lampe, D., Lauzon, C. and Jacobs-Lorena, M. (2007) Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *Int J Parasitol* **37**: 595–603.
- Rodrigues, F.G., Oliveira, S.B., Rocha, B.C. and Moreira, L.A. (2006) Germline transformation of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) with the piggyBac transposable element. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**: 755–757.
- Service, M.W. (1993) Mosquitoes (Culicidae). In *Medical Insects and Arachnids* (Lane, R.P. and Crosskey, R.W. eds), pp. 120–240. Chapman & Hall, London.
- Shen, Z. and Jacobs-Lorena, M. (1998) A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *J Biol Chem* **273**: 17665–17670.
- Sugiyama, M.K., Ohtani, K., Izuhara, M., Koike, T., Susuki, K., Imamura, S. et al. (2002) A novel prokaryotic phospholipase A₂. Characterization, gene cloning, and solution structure. *J Biol Chem* **277**: 20051–20058.
- WHO (World Health Organization) (2005) World malaria report 2005. World Health Organization, Geneva Switzerland. [Online.] <http://www.rbm.who.int/wmr2005>
- Zieler, H., Keister, D.B., Dvorak, J.A. and Ribeiro, J.M. (2001) A snake venom phospholipase A₂ blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J Exp Biol* **204**: 4157–4167.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article:

Figure S1. Mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) mRNA time-course expression in *Aedes fluviatilis* in a transgenic line. Total RNA samples from

nontransgenic (NT) and transgenic (4T) mosquito midguts dissected at different time-points after a bloodmeal were subjected to RT-PCR using oligonucleotides specific to the mPLA₂ gene (B) and to the RP49 gene (ribosomal protein) (C) or as a control, without the reverse transcriptase enzyme (A). M1, 100 pb marker; M2, 1 kb plus DNA marker; c(-), no cDNA; c(+), pBacEGFPagPermPLA₂.

Figure S2. Tissue and sex specificity of mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) mRNA expression in *Aedes fluviatilis* transgenic lines. Total RNA samples from nontransgenic (NT) and transgenic (4T and 8T) mosquito midguts or carcasses were subjected to RT-PCR using oligonucleotides specific to the mPLA₂ gene (A) and to the RP49 gene (ribosomal protein) (B). As a negative control, the reactions were carried out without RT enzyme (C). M1, 100 bp marker; M2, 1 kb plus DNA marker; c(-), no DNA; c(+), pBacEGFPagPermPLA₂; (1, 4, 7), carcasses; (2, 5, 8), female midguts 24 h after bloodmeal; (3, 6, 9), male midguts.

Figure S3. Fitness of mutated phospholipase A₂ (mPLA₂) transgenic mosquitoes. Heterozygous virgin transgenic (T) females were crossed with nontransgenic (NT) males and fed on mouse blood. At each generation, 100 larvae were randomly selected to determine the proportion of transgenic (fluorescent) to nontransgenic individuals. Subsequent crosses were made with the same number of randomly chosen male and female individuals. The proportion of transgenic to nontransgenic was compared by the chi-square

test, at 5% probability (*shows difference from the expected frequency: 50% of each on the first generation and 56% NT and 44% T for F2 through F5).

Table S1. Number of *Plasmodium gallinaceum* sporozoites in nontransgenic and transgenic mosquitoes expressing mutated phospholipase A₂ (mPLA₂).

Table S2. Life table parameters of transgenic and nontransgenic *Aedes fluviatilis* expressing mutated phospholipase A₂ (mPLA₂).

This material is available as part of the online article from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1365-2583.2008.00791.x>. (This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supplementary material

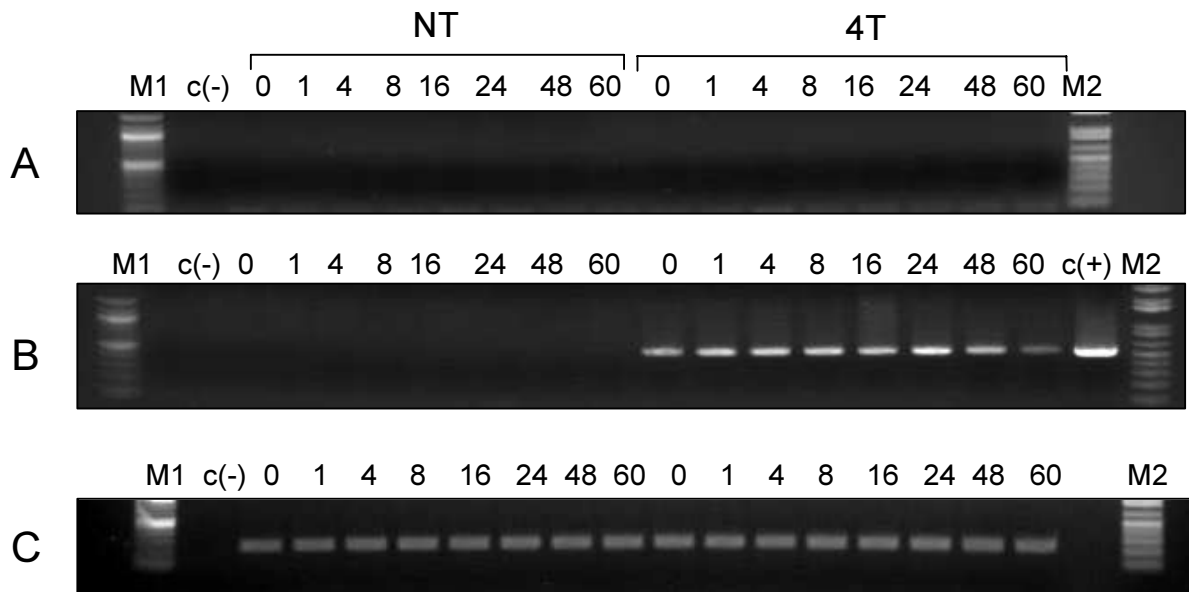


Figure S1.

mPLA₂ mRNA time-course expression in *Ae. fluviatilis* in a transgenic line. Total RNA samples from non-transgenic (NT) and transgenic (4T) mosquito midguts dissected at different time point after a blood meal were subjected to RT-PCR using oligonucleotides specific to the mPLA₂ gene (B) and to the RP49 gene (ribosomal protein) (C) or as a control, without the reverse transcriptase enzyme (A). M1: 100 pb marker; M2: 1kb plus DNA marker; c(-): no cDNA; c(+): pBacEGFPAgPermPLA₂

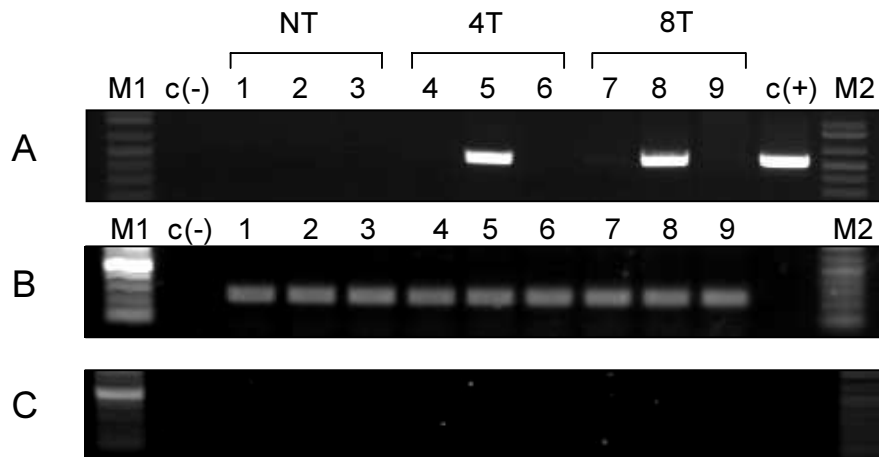


Figure S2.

Tissue and sex specificity of mPLA₂ mRNA expression in *Ae. fluviatilis* transgenic lines. Total RNA samples from non transgenic (NT) and transgenic (4T and 8T) mosquito midguts or carcasses were subjected to RT-PCR using oligonucleotides specific to the mPLA₂ gene (A) and to the RP49 gene (ribosomal protein) (B). As negative control, the reactions were carried out without RT enzyme (C). M1: 100bp marker; M2: 1kb plus DNA marker; c(-): no DNA; c(+): pBacEGFP_{Ag}PermPLA₂; (1, 4, 7): carcasses; (2, 5, 8): female midguts 24h after blood meal; (3, 6, 9): male midguts.

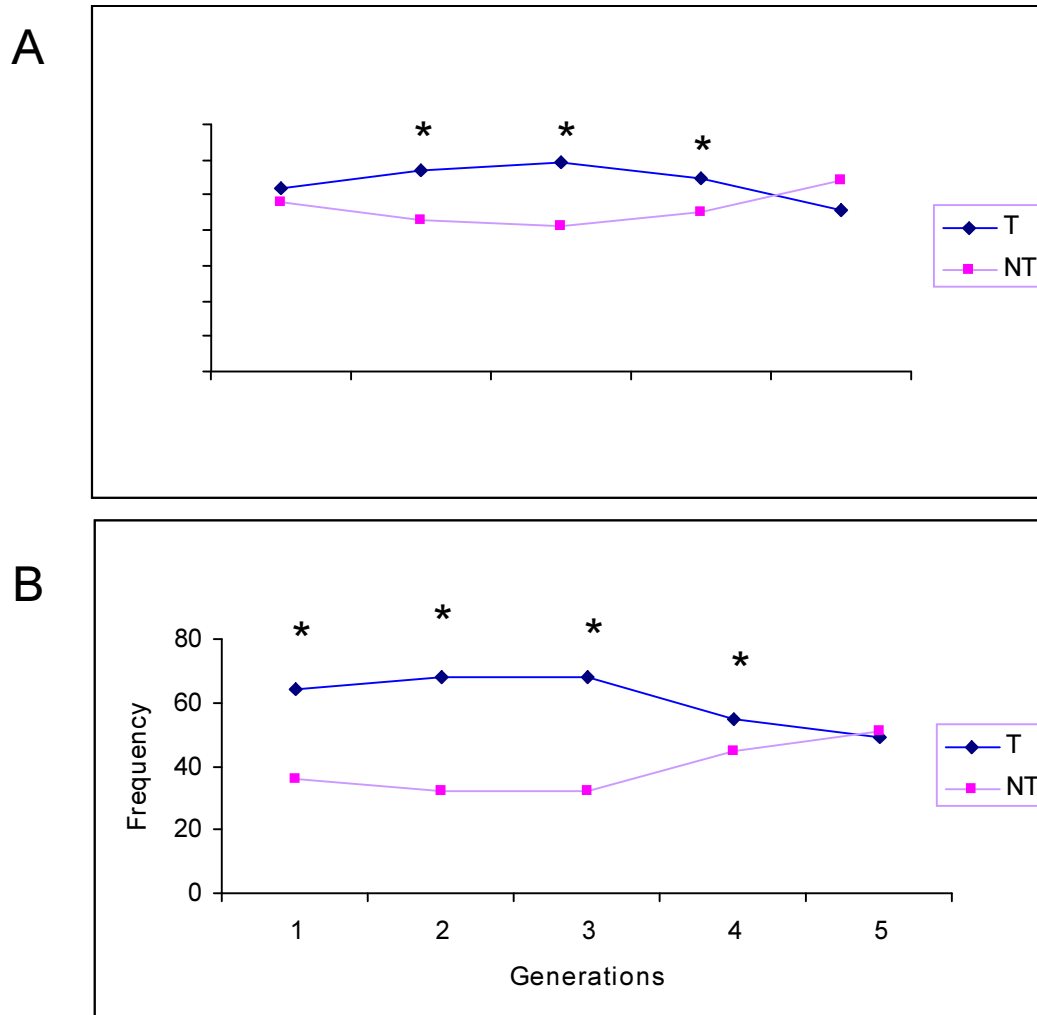


Figure S3.

Fitness of mPLA₂ transgenic mosquitoes. Heterozygous virgin transgenic (T) females were crossed with non-transgenic (NT) males and fed on mouse blood. At each generation, 100 larvae were randomly selected to determine the proportion of transgenic (fluorescent) to non-transgenic individuals. Subsequent crosses were made with the same number of randomly chosen males and females. The proportion of transgenic and non-transgenic was compared by the chi-square test, at 5% probability (* shows difference from the expected frequency: 50% of each on the first generation and 56% NT and 44% T for F2 through F5).

Table S1. Number of *Plasmodium gallinaceum* sporozoites in non-transgenic and transgenic mosquitoes expressing the mPLA₂^a

Exp.	Samples	Mean sporozoite number ± SD	P value ^b
1	Non-Transgenic	12,520 ± 2,145	0.0045
	9T	9,205 ± 3,913	
2	Non-Transgenic	4,065 ± 2,276	0.9097
	10T	3,836 ± 1,606	
3	Non-Transgenic	11,196 ± 4,211	0.0002
	8T	4,170 ± 1,347	
4	Non-Transgenic	14,449 ± 4,229	0.0015
	8T	8,235 ± 2,062	
5	Non-Transgenic	10,133 ± 3,024	0.0073
	9T	6,880 ± 1,600	

^a Mosquitoes (non-transgenic and transgenic siblings) were fed on gametocyte positive chickens. Fifteen days post-infection twelve females had their thorax and head separated and after centrifugation sporozoites were counted on a hemacytometer. Numbers represent an estimate of sporozoites per mosquito.

^b Means were compared by the Mann-Whitney U test.

Table S2. Life table parameters of transgenic and non-transgenic *Aedes fluviatilis* expressing the mPLA₂

Mosquitoes	Mean No. Eggs \pm SD ^a	Male Survival (days \pm SD) ^b	Female Survival (days \pm SD) ^b
Non-Transgenic	64.9 \pm 54.4	13.9 \pm 5.2	22.0 \pm 11.3
4T	46.6 \pm 48.7	16.7 \pm 7.9 *	22.6 \pm 12.5
8T	47.4 \pm 48.9	19.2 \pm 6.7 **	29.3 \pm 9.2 *
9T	59.7 \pm 51.9	19.2 \pm 8.2 **	24.1 \pm 13.9
10T	50.4 \pm 56.6	19.6 \pm 6.8 **	27.2 \pm 10.1 *

^a Eggs were collected through forced laying in four independent experiments. Means not statistically different when compared by the Mann-Whitney *U* test (5% probability).

^b One day old males or females were grouped and kept until all died. Means are from three experiments using females and two with males.

* Means significantly different from non-transgenic mosquitoes - Mann-Whitney *U* test (P<0.05).

** Means significantly different from non-transgenic mosquitoes - Mann-Whitney *U* test (P<0.001).