

# Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade

Transgenic mosquito: from paper to reality

Soraia de Lima Oliveira<sup>1,2</sup>, Danilo Oliveira Carvalho<sup>1,2</sup>, Margareth Lara Capurro<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INTC-EM), Brasil

**Resumo.** Doenças transmitidas por vetores são atualmente os maiores desafios da saúde pública no Brasil e no mundo, sendo as atuais medidas de controle ineficientes. Inovações no âmbito do controle vetorial apontam para uma nova perspectiva com a manipulação genética, já que podem interferir na transmissão da doença, seja impedindo que o patógeno complete seu ciclo no vetor, como reduzindo a população de mosquitos vetores. Apresentamos algumas diretrizes das principais ferramentas disponíveis, SIT e RIDL por exemplo. Abordamos ainda a forma como estas ferramentas funcionam, alguns riscos e benefícios.

**Palavras-chave.** Dengue, malária, controle de vetores, *Aedes aegypti*, transgênicos, RIDL.

**Abstract.** Vector-borne diseases are currently the worst challenge of public health in Brazil and worldwide, being the current control measures inefficient. Innovations concerning vector control point to a new perspective to handling with gene engineering, as they may interfere with disease transmission, preventing the pathogen to complete its cycle in the vector, ie, reducing mosquito population. We present some of the mean genetic tools available, SIT and RIDL for example. We discuss how these tools work, some risks and benefits.

**Keywords.** Dengue, malaria, vector control, *Aedes aegypti*, transgenics, RIDL.

Contato do autor:

<sup>3</sup>mcapurro@icb.usp.br

Recebido 18out010

Aceito 07jun11

Publicado 22jul11

No contexto da entomologia médica, os mosquitos se enquadram entre os insetos que causam maior impacto à saúde pública no mundo e no Brasil. Estimativas apontam que mosquitos são responsáveis pela infecção de 700 milhões de pessoas no mundo, anualmente, atingindo principalmente regiões equatoriais, tropicais e subtropicais. (Gubler 1998, 2002; Mirzaian, et al. 2010).

As fêmeas desses insetos são as responsáveis pela transmissão desses patógenos, pois elas dependem da ingestão de sangue para completar o desenvolvimento dos ovos. Ao picar animais infectados, o mosquito ingere sangue contaminado e passa a hospedar esses patógenos, que escapam dos processos digestivos e se tornam capazes invadir e migrar para a glândula salivar onde irão permanecer até o próximo repasto sanguíneo, quando serão inoculados com a saliva do inseto. Pode ocorrer em alguns casos a transmissão transovariana de alguns arbovírus, assim as fêmeas infectam os ovos e a prole nasce infectada com o patógeno. (Mourya, Gokhale et al. 2001).

Entre as doenças veiculadas pelos mosquitos e que causam um grande impacto sócio-econômico e na saúde pública, destacam-se a malária e a dengue devido ao alto número de pessoas afetadas. O agente etiológico da malária é o protozoário do gênero *Plasmodium*. Ele está presente em 108 países, a maioria no continente Africano, e é veiculado principalmente por espécies do gênero *Anopheles*. Cerca de 40% da população mundial está sob risco malárico. Em 2008 foram registrados 247 milhões de casos de malária e aproximadamente um milhão de mortes.

(Killeen, et al. 2002; Maciel, et al. 2008; Marshall e Taylor 2009; Enayati e Hemingway 2010; Garcia, 2010)

A dengue, enfermidade causada por vírus da família Flaviviridae, afeta populações de mais de 100 países, distribuídos pelas Américas, África, Sudeste da Ásia, ilhas do oeste do Pacífico e leste do Mediterrâneo. Cerca de dois quintos da população mundial vive em áreas de risco infectadas pelo principal vetor da dengue, *Aedes aegypti*. A estimativa é que, mundialmente, 50 milhões de pessoas são infectadas todos os anos. Somente no Brasil, entre janeiro e junho de 2010, foram notificados 361.552 casos de dengue. (Who, 2009, 2010)

Além disso, nos deparamos com o ressurgimento de algumas das doenças transmitidas por artrópodes, como CHIKV (vírus chikungunya) que teve o primeiro grande surto urbano documentado na década de 1960 em Bangkok. Em 2004 foi registrado um outro grande surto que começou no Quênia e se espalhou por numerosas ilhas do Oceano Índico, na Índia e em pelo menos 18 países da Ásia, Europa e América do Norte, ocorrendo, inclusive, transmissão autóctone em alguns destes países. (Staples, et al. 2009)

A crescente mortalidade e morbidade causada por doenças transmitidas por vetores ao redor do mundo está relacionada à ausência de vacinas e medicamentos específicos e eficazes. Diante deste fato, o controle de doenças como dengue, malária e febre amarela passou a focar nos mosquitos transmissores.

O manejo integrado é a estratégia de combate ao ve-

tor que apresenta melhores resultados, pois compreende o uso de múltiplas atividades com diferentes focos para impedir a proliferação do vetor nas áreas afetadas. Podemos citar as seguintes estratégias:

1. Controle mecânico, no qual órgãos governamentais desenvolvem programas junto à comunidade com atividades preventivas, como a conscientização da população, e o mais importante a eliminação de possíveis criadouros;

2. Controle biológico, que utiliza outros organismos para o controle populacional da espécie, como a utilização de larvas predadoras (*Toxorhynchites* sp.), a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), e outros que possam se alimentar ou impedir o desenvolvimento do vetor;

3. Controle químico, com a aplicação de inseticidas, tanto para as formas adultas, quanto para as imaturas. (Forattini 2002; Tauil 2002).

Qualquer medida de controle torna-se ineficaz sem a contribuição da população em reduzir a disponibilidade de criadouros e das autoridades em realizar ações preventivas que impeçam surtos e epidemias. O custo de manutenção de programas públicos, agravado pelos efeitos adversos em organismos não-alvos com o uso de inseticidas, e, principalmente, a seleção de populações resistentes aos produtos químicos, tornam esses programas pouco eficientes e conseqüentemente falhos no combate ao vetor. Além disso, já foram registradas populações de *Aedes aegypti* que apresentam resistência ao uso de Bti, agravando ainda mais o quadro. (Bracco, et al. 1997; Macoris, et al. 1999; Lima, et al. 2003; Leite e Carneiro de Abreu 2009; Darriet, et al. 2010; Harris, et al. 2010; Paris, et al. 2010; Rivero, et al. 2010; Rajatileka, et al. 2011).

A alta capacidade reprodutiva dos mosquitos também é um dos principais fatores que dificultam o controle da população de vetores em uma área.

Cresce, então, a necessidade de se encontrar alternativas para o combate ao mosquito. Com base no entendimento da interação que ocorre entre o parasita, o vetor e o hospedeiro vertebrado, aliado ao desenvolvimento de ferramentas da biologia molecular, nasce uma alternativa que tem a manipulação genética como peça chave. (Hurd 1994; Kokoza, et al. 2000; Moreira, et al. 2002; Horn e Wimmer 2003; Speranca e Capurro 2007).

Essa manipulação utiliza genes quiméricos que variam nos mecanismos de ação contra o agente etiológico. Com a construção transgênica pronta, esse conjunto é inserido no genoma do vetor e passa a ser expresso de acordo com os promotores dessa construção (de Lara Capurro, Coleman et al. 2000; Nirmala and James 2003; Travanty, Adelman et al. 2004; Speranca and Capurro 2007).

### Ainda em laboratório

Linhagens que visam a substituição da população, ou seja, inserir irreversivelmente um novo gene em uma população, podem apresentar muitas moléculas que foram descritas como tendo um papel importante no bloqueio da transmissão de agentes etiológicos. Em laboratório, algumas linhagens atingiram a eficiência de 99% no bloqueio da transmissão. É o caso da linhagem que expressa

um anticorpo contra uma proteína de membrana do parasita (*Plasmodium gallinaceum*) que o impede de alcançar a glândula salivar. Outra linhagem expressa o peptídeo SM1 que compete com as proteínas de superfície do parasita do gênero *Plasmodium* sp. impedindo que ele penetre nos tecidos e alcance a glândula salivar com eficiência de aproximadamente 80% no bloqueio da transmissão. (de Lara Capurro, et al. 2000; Ito, et al. 2002; Jacobs-Lorena, 2003; Nirmala e James, 2003).

O dilema enfrentado com o uso dessas linhagens é que, mesmo com reduções significativas, o agente etiológico ainda é capaz de ser disseminado e completar seu ciclo em novos hospedeiros e, conseqüentemente, gerar o quadro de doença. A solução encontrada foi agrupar mecanismos diferentes no mesmo transgene, formando um duplo transgênico que expresse mecanismos que individualmente tiveram resultados significantes, mas que não bloqueavam a transmissão. O duplo transgênico é capaz de inibir em 100% a transmissão do patógeno. (Jasinskiene, et al. 2007; Kokoza, et al. 2010).

Como a linhagem proposta usa o modelo de infecção laboratorial de *Aedes aegypti* e *Plasmodium gallinaceum* (malária aviária), esta linhagem não pode ser usada para controle de malária humana, pois o parasita é de outra espécie e não se sabe se o transgene pode bloquear da mesma forma. Além disso, *Aedes aegypti* não transmite malária ao homem, o vetor neste caso pertence a outro gênero, *Anopheles*, sendo *Anopheles darlingi* o principal transmissor no país. Outro ponto negativo é que esta linhagem também não poderia ser usada para o controle do vírus dengue, pois o transgene utilizado tem como alvo o parasita e não o vírus. (Deane 1986; Killeen, et al. 2002; Oliveira-Ferreira, et al. 2010).

A maquinaria do RNA de interferência (RNAi) é um dos mecanismos mais usuais contra o vírus dengue, e consiste em uma estratégia de bloqueio da replicação viral no mosquito. Componentes protéicos do RNAi reconhecem uma porção do RNA do vírus dengue tipo 02. Essa região do RNA é expressa pelo mosquito devido à construção transgênica, e quando houver infecção pelo vírus direcionar-se-á a destruição do RNA viral, impedindo a replicação do vírus nos tecidos do mosquito. Esta linhagem apresentou resultados significantes, embora alguns indivíduos ainda fossem capazes de transmitir o vírus dengue tipo 02. Infelizmente, a linhagem não teve o mesmo resultado quando colocada a prova com o vírus dengue tipo 04 (Adelman, et al. 2002; Travanty, et al. 2004; Franz, et al. 2006).

A maior dificuldade encontrada nessa abordagem genética é como realizar a introdução deste transgene na população alvo. A utilização de elementos de transposição é o recurso disponível atualmente, mas este sistema não é eficiente quando se trata de inserir um gene em uma população inteira. Alternativas que utilizem os “genes-egoístas” são o foco das atenções no momento. Entre eles estão o sistema de home endonucleases e MEDEA, que ainda não estão disponíveis para controle de doenças transmitidas por vetores. Estes sistemas baseiam-se no fato de que se o organismo não for portador deste gene, ele morre, e apenas quando for portador sobrevive. Ligando-se

o transgene de interesse a esse “gene-egoísta” garante-se que a prole portadora do “transgene-egoísta” resultante de um cruzamento entre selvagens e transgênicos seja a única sobrevivente, passando essa característica aos seus descendentes (Sinkins e Gould 2006; Windbichler, et al. 2007; Lorenzen, et al. 2008; Yahara, et al. 2009; Hay, Chen et al. 2010).

### Saindo do laboratório

A manipulação genética pode atuar também reduzindo a população alvo. Dessa forma, a população de insetos é reduzida a níveis em que a disponibilidade de novos insetos, que possam ser infectados e aptos a transmissão dos agentes etiológicos, também seja menor. Esta metodologia, que já é empregada em alguns países, mostra resultados promissores, e pode ser utilizada no controle de mosquitos. (Alphey 2002; Alphey e Andreasen 2002; Coleman e Alphey 2004; Dyck, et al. 2005; Alphey, et al. 2008; Alphey et al. 2009).

### Técnica do Inseto Estéril - SIT

A liberação de machos estéreis para suprimir a população já é uma técnica bastante utilizada na agricultura para controle de pragas, como exemplificado pela mosca das frutas do Mediterrâneo (*Ceratitis capitata*). Esta técnica, denominada SIT (do inglês – Sterile Insect Technique) baseia-se na criação massiva e liberação um grande número de insetos machos submetidos a doses de radiação, que promove a quebra irreparável do material genético tornando o inseto estéril. A vantagem dessa técnica é que ela se aproveita do comportamento do macho em procurar fêmeas para copular, não utiliza nenhum tipo de inseticida, é espécie-específica e ambientalmente segura. (Alphey 2002; Dyck, ichs et al. 2005; Phuc, Andreasen et al. 2007; Alphey, et al. 2008; Catteruccia, et al. 2009). Por outro lado, o sistema tende a ser instável e pode reduzir drasticamente o fitness dos machos, tornando-os menos competitivos e ineficientes para cópula. A separação entre machos e fêmeas também não é totalmente eficiente e permite que algumas fêmeas passem despercebidas pelo processo. Infelizmente essas fêmeas, mesmo recebendo as doses de radiação e permanecendo estéreis, são tão competentes para a transmissão dos agentes etiológicos quanto os insetos não-irradiados. (Alphey 2002; Alphey e Andreasen 2002; Benedict e Robinson 2003; Alphey, et al. 2008).

### Liberação de machos carregando gene letal - RIDL

Conhecido como uma evolução da técnica do inseto estéril, o RIDL (do inglês – Release of Insect carrying Dominant Lethal gene) é um sistema transgênico espécie-específico que induz a letalidade nos organismos portadores do transgene. Como em SIT, mosquitos RIDL são produzidos em larga escala e apenas os machos são liberados. Com essas linhagens há diminuição na quantidade de adultos (fase em que ocorre a transmissão do patógeno) na ausência de um repressor que controla o sistema letal. Quando se reduz a população também se reduz os casos de doença.

O sistema repressível possui o ativador transcripcio-

nal tetraciclina - repressível (tTA)- que ativa o promotor de tetO que regula o gene efetor. O sistema é bloqueado quando existe a presença de tetraciclina no interior do mosquito, pois tTA tem mais afinidade por tetraciclina do que por tetO.

A linhagem OX513A de *Aedes aegypti* usa o sistema representado na figura 1, onde o aumento exacerbado dos níveis de tTA promove mortalidade nas células, pois tetO funciona em retroalimentação positiva (feedback positivo) estimulando ainda mais a expressão de tTA no interior das células. Desta forma, machos RIDL homocigotos que são liberados copulam com fêmeas selvagens e toda a prole será portadora do transgene e morrerá por toxicidade causada pelos altos níveis de tTA nas células. Atualmente esta linhagem desenvolvida para o combate do vírus dengue é a mais preparada e estudada para iniciar os testes de campo em áreas infestadas pelo vetor e que tenha ocorrência do vírus. (Alphey e Andreasen 2002; Gong, et al. 2005; Fu, Condon et al. 2007).

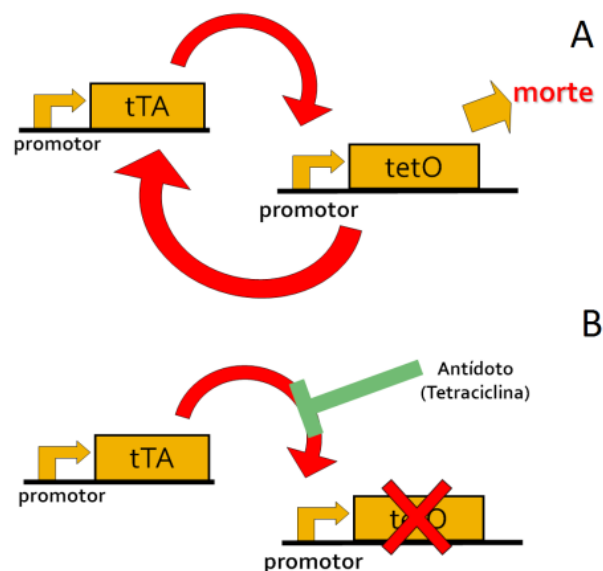


Figura 01. Sistema tTA - tetO repressível apresentado pela linhagem OX513A de *Aedes aegypti*. (A) ausência de tetraciclina permite o sistema de retroalimentação e causa a morte do inseto; (B) presença de tetraciclina bloqueia o sistema por afinidade entre as moléculas. et al. 2000).

Os gráficos 01 e 02 representam modelos teóricos de como a tecnologia RIDL para a linhagem OX513A funciona em campo. No gráfico 1 observamos uma situação onde a população de mosquitos não depende da sazonalidade pluviométrica, pois há uma flutuação populacional constante durante todo o ano. Neste caso a introdução dos machos RIDL deve ser intensa e mantida para que a população não volte a subir e atinja os níveis necessários para reiniciar a transmissão do patógeno.

Por outro lado, em regiões onde o regime de chuvas está intimamente ligado com a flutuação populacional, como mostra o gráfico 2, a liberação ocorre quando há o menor índice populacional (período de seca) na região para que esse índice se mantenha baixo ou se possível seja

reduzido ainda mais.

Recentemente a linhagem OX513A chegou ao Brasil e foram iniciados testes de compatibilidade com linhagens brasileiras e testes de competitividade entre machos transgênicos e selvagens com fêmeas selvagens. Outros parâmetros que compreendem a tabela de vida também estão sendo avaliados. A realização desses estudos em laboratório mostrou que não existe preferência por parte das fêmeas da linhagem Higgs (linhagem exclusiva de laboratório) entre machos Higgs selvagens e machos transgênicos RIDL (OX513A). De fato, o resultado encontrado foi que 47% das fêmeas preferiram os machos RIDL, e 53% preferiram machos Higgs.

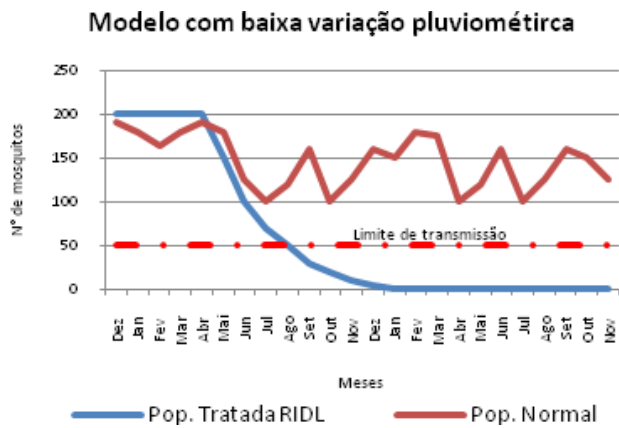


Gráfico 1. Modelo de flutuação populacional independente da sazonalidade pluviométrica.

Esta linhagem atualmente está sob fase de teste de campo no município de Juazeiro no estado da Bahia em cinco localidades, como previsto pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio) que autorizou os testes de campo. Em fevereiro de 2011 foi realizada a primeira liberação de mosquito transgênico da América do Sul (dados ainda não publicados).

Com a mesma linha de pensamento, a construção conhecida como Flightless (OX3604) possui um fenótipo fêmea-específico repressível que afeta os músculos de voo, impedindo assim que a fêmea copule, seja capaz de se alimentar ou de realizar qualquer outra atividade inerente ao ciclo de vida. Esta linhagem ainda não apresenta resulta-

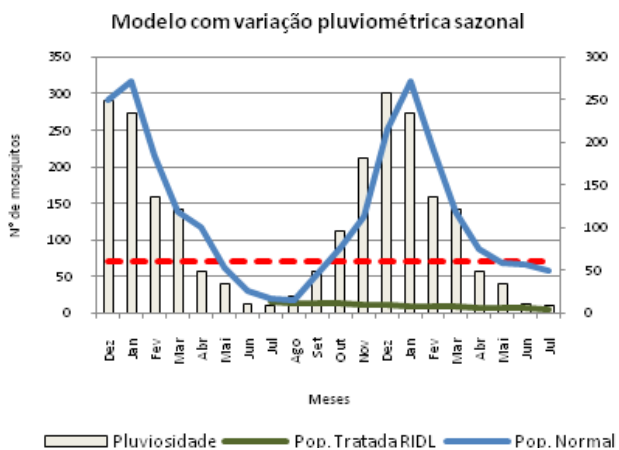


Gráfico 02: Modelo de flutuação populacional seguindo regime de chuva.

dos no campo (Fu, e col., 2009). Como a prole resultante do cruzamento entre transgênicos e selvagens, portadora do transgene não sobrevive, a construção não é inserida na população original. Isso permite um maior controle da liberação dos mosquitos e também permite utilizar este tipo de linhagem transgênica como uma nova ferramenta no manejo integrado de vetores.

O tema transgenia provoca inúmeras reações nas diferentes classes da população humana, e geralmente organismos geneticamente modificados enfrentam forte ceticismo. Esta é a razão de se apresentar à população informações suficientes quanto ao uso dessa tecnologia, pois a aceitação pública é prioritária e essencial para quaisquer testes com mosquitos transgênicos em campo e estes testes devem estar de acordo com as exigências das autoridades responsáveis (Dyck, et al. 2005; Marshall, et al. 2010).

### Considerações Finais

Em conjunto com as ações e ferramentas disponíveis, o uso de mosquitos transgênicos contribui na redução do número de casos das doenças veiculadas por esses vetores. Os avanços tecnológicos alcançados até agora têm potencial em aumentar a eficácia e eficiência do controle genético de vetores (Fu, e col., 2009)

É importante que as questões éticas, sociais e políticas sejam levadas em consideração, tais como informar a população humana incluída na área de estudo, órgãos governamentais responsáveis e cientistas locais sobre os riscos e benefícios da possível liberação de mosquitos transgênicos (Jacobs-Lorena, 2003; Alphey, 2002b).

Um estudo realizado em Mali, sobre a possível liberação de mosquitos transgênicos para o controle da malária surpreendente demonstrou que a maioria da população entrevistada é a favor da liberação. Parte dos entrevistados exigiu algum tipo de teste em outras regiões e/ou testes laboratoriais, além de um maior embasamento referencial sobre o assunto por parte das autoridades e da comunidade científica a respeito do assunto, somente uma minoria se mostrou contra a liberação (Marshall, 2000).

### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer o suporte financeiro da FAPESP, CNPq, MCT/DECIT e INTC-EM.

### Bibliografia

- Adelman, Z. N., I. Sanchez-Vargas, et al. (2002). "RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome." *J Virol* 76(24): 12925-33.
- Alphey, L. (2002). "Re-engineering the sterile insect technique." *Insect Biochem Mol Biol* 32(10): 1243-7.
- Alphey, L. and M. Andreasen (2002). "Dominant lethality and insect population control." *Mol Biochem Parasitol* 121(2): 173-8.
- Alphey, L., M. Benedict, et al. (2009). "Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis." *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3): 295-311.

- Alphey, L., D. Nimmo, et al. (2008). "Insect population suppression using engineered insects." *Adv Exp Med Biol* 627: 93-103.
- Araújo, R. V. (2007). Estudo dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti*. Departamento de Parasitologia - ICB II. São Paulo, Universidade de São Paulo. Doutorado.
- Benedict, M. Q. and A. S. Robinson (2003). "The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique." *Trends Parasitol* 19(8): 349-55.
- Bracco, J. E., M. Dalbon, et al. (1997). "[Resistance to organophosphorous and carbamates insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*]." *Rev Saude Publica* 31(2): 182-3.
- Catteruccia, F., A. Crisanti, et al. (2009). "Transgenic technologies to induce sterility." *Malar J* 8 Suppl 2: S7.
- Coleman, P. G. and L. Alphey (2004). "Genetic control of vector populations: an imminent prospect." *Trop Med Int Health* 9(4): 433-7.
- Darriet, F., S. Marcombe, et al. (2010). "Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies)." *Parasit Vectors* 3: 88.
- de Lara Capurro, M., J. Coleman, 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(4): 427-33.
- Deane, L. M. (1986). "Malaria vectors in Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81: 5-14.
- Dyck, V., J. Hendrichs, et al. (2005). *History of the Sterile Insect Technique*. Sterile Insect Technique, Springer Netherlands: 3-36.
- Dyck, V., J. Hendrichs, et al. (2005). *Public Relations and Political Support in Area-Wide Integrated Pest Management Programmes that Integrate the Sterile Insect Technique*. Sterile Insect Technique, Springer Netherlands: 547-559.
- Enayati, A. and J. Hemingway (2010). "Malaria management: past, present, and future." *Annu Rev Entomol* 55: 569-91.
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia Médica - Identificação, biologia e sistemática*. São Paulo, Edusp.
- Franz, A. W., I. Sanchez-Vargas, et al. (2006). "Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4198-203.
- Fu, G., K. C. Condon, et al. (2007). "Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing." *Nat Biotechnol* 25(3): 353-7.
- Garcia, L. S. (2010). "Malaria." *Clin Lab Med* 30(1): 93-129.
- Gong, P., M. J. Epton, et al. (2005). "A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly." *Nat Biotechnol* 23(4): 453-6.
- Gubler, D. J. (1998). "Resurgent vector-borne diseases as a global health problem." *Emerg Infect Dis* 4(3): 442-50.
- Gubler, D. J. (2002). "The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems." *Arch Med Res* 33(4): 330-42.
- Harris, A. F., S. Rajatileka, et al. (2010). "Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman." *Am J Trop Med Hyg* 83(2): 277-84.
- Hay, B. A., C. H. Chen, et al. (2010). "Engineering the genomes of wild insect populations: challenges, and opportunities provided by synthetic Medea selfish genetic elements." *J Insect Physiol* 56(10): 1402-13.
- Horn, C. and E. A. Wimmer (2003). "A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management." *Nat Biotechnol* 21(1): 64-70.
- Hurd, H. (1994). "Interactions between parasites and insects vectors." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 27-30.
- Ito, J., A. Ghosh, et al. (2002). "Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite." *Nature* 417(6887): 452-5.
- Jacobs-Lorena, M. (2003). "Interrupting malaria transmission by genetic manipulation of anopheline mosquitoes." *J Vector Borne Dis* 40(3-4): 73-7.
- Jasinskiene, N., J. Coleman, et al. (2007). "Genetic control of malaria parasite transmission: threshold levels for infection in an avian model system." *Am J Trop Med Hyg* 76(6): 1072-8.
- Killeen, G. F., U. Fillinger, et al. (2002). "Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa?" *The Lancet Infectious Diseases* 2(10): 618-627.
- Kokoza, V., A. Ahmed, et al. (2000). "Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9144-9.
- Kokoza, V., A. Ahmed, et al. (2010). "Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8111-6.
- Leite, M. E. and K. K. R. Carneiro de Abreu (2009). "Sistema de informação geográfica aplicada à distribuição do caso de dengue na microregião de Pirapora - MG." *HYGEIA* 5(9): 63 - 76.
- Lima, J. B., M. P. Da-Cunha, et al. (2003). "Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil." *Am J Trop Med Hyg* 68(3): 329-33.
- Lorenzen, M. D., A. Gnirke, et al. (2008). "The maternal-effect, selfish genetic element Medea is associated with a composite Tc1 transposon." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 10085-9.
- Maciel, C., V. X. de Oliveira Junior, et al. (2008). "Anti-*Plasmodium* activity of angiotensin II and related synthetic peptides." *PLoS One* 3(9): e3296.
- Macoris, M., M. T. Andrighetti, et al. (1999). "[Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil]." *Rev Saude Publica* 33(5): 521-2.
- Marshall, J. M. and C. E. Taylor (2009). "Malaria control with transgenic mosquitoes." *PLoS Med* 6(2): e20.
- Marshall, J. M., M. B. Toure, et al. (2010). "Perspectives of people in Mali toward genetically-modified mosquitoes for malaria control." *Malar J* 9: 128.
- Mirzaian, E., M. J. Durham, et al. (2010). "Mosquito-borne illnesses in travelers: a review of risk and prevention." *Pharmacotherapy* 30(10): 1031-43.
- Moreira, L. A., A. K. Ghosh, et al. (2002). "Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control." *Int J Parasitol* 32(13): 1599-605.
- Mourya, D. T., Gokhale, et al. (2001). "Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes." *Acta Virol* 45(2): 67-71.
- Nirmala, X. and A. A. James (2003). "Engineering *Plasmodium*-refractory phenotypes in mosquitoes." *Trends Parasitol* 19(9): 384-7.
- Oliveira-Ferreira, J., M. V. Lacerda, et al. (2010). "Malaria in Brazil: an overview." *Malar J* 9: 115.
- Paris, M., G. Tetreau, et al. (2010). "Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes." *Pest Manag Sci* 67(1): 122-8.
- Phuc, H. K., M. H. Andreasen, et al. (2007). "Late-acting

- dominant lethal genetic systems and mosquito control.” *BMC Biol* 5: 11.
- Rajatileka, S., J. Burhani, et al. (2011). “Mosquito age and susceptibility to insecticides.” *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
- Rivero, A., J. Vezilier, et al. (2010). “Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem?” *PLoS Pathog* 6(8).
- Sinkins, S. P. and F. Gould (2006). “Gene drive systems for insect disease vectors.” *Nat Rev Genet* 7(6): 427-35.
- Speranca, M. A. and M. L. Capurro (2007). “Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review.” *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(4): 425-33.
- Staples, J. E., R. F. Breiman, et al. (2009). “Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease.” *Clin Infect Dis* 49(6): 942-8.
- Tauil, P. L. (2002). “[Critical aspects of dengue control in Brazil].” *Cad Saude Publica* 18(3): 867-71.
- Thomas, D. D., C. A. Donnelly, et al. (2000). “Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system.” *Science* 287(5462): 2474-6.
- Travanty, E. A., Z. N. Adelman, et al. (2004). “Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*.” *Insect Biochem Mol Biol* 34(7): 607-13.
- WHO (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*  
World Health Organization - WHO: 148.
- WHO. (2010). “Health topics – Dengue.” Retrieved March, 2011, 2011, from <http://www.who.int/topics/dengue/en/>.
- Windbichler, N., P. A. Papatianos, et al. (2007). “Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos.” *Nucleic Acids Res* 35(17): 5922-33.
- Yahara, K., M. Fukuyo, et al. (2009). “Evolutionary maintenance of selfish homing endonuclease genes in the absence of horizontal transfer.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(44): 18861-6.