UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

MARCADORES MOLECULARES E CONTROLE
GENÉTICO DE MOSQUITOS VETORES

MAURO TOLEDO MARRELLI

Tese apresentada para obtenção do título de
Livre - Docente, junto à Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo,
Departamento de Epidemiologia, especialidade
Sistemática e Ecologia de Populações de Vetores

São Paulo
2011

MARCADORES MOLECULARES E CONTROLE GENÉTICO DE MOSQUITOS VETORES

MAURO TOLEDO MARRELLI

**Tese apresentada para obtenção do título
de Livre-Docente, junto à Faculdade de
Saúde Pública da Universidade de São
Paulo, Departamento de Epidemiologia,
especialidade Sistemática e Ecologia de
Populações de Vetores**

São Paulo

2011

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação

Aos meus três amores,

Heleni, Arthur e Danilo

Agradecimentos

Ao apresentar este tese gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para sua realização e também às pessoas que tiveram participação importante na minha carreira.

À Judith Kloetzel, minha orientadora do mestrado, pela amizade e aprendizado, e por que continua sendo minha referência de integridade como pessoa e cientista. Aos colegas que dividiam o laboratório de Protozoologia, onde tudo começou, junto com o grupo do Heitor e da Fro: Marilda, Regina, Mônica, Clóvis, Angela, Izilda, Ana Maria, Bruno, Roberto, Erika, Stela, Júnior... entre outros.

Um agradecimento especial à amiga Rosely, pelos muitos e muitos anos de amizade e pelos muitos artigos em colaboração.

Ao Osvaldo Marinotti, meu orientador do doutorado, pela amizade e aprendizado, e aqui estendo meus agradecimentos a seus estudantes, muitos ainda meus amigos: Eric, Cristina, Paulo, Zeca, Enios, Marcela, Rodrigo e Abraham. À Sirlei Daffre, professora do ICB, que dividia a responsabilidade do laboratório com o Osvaldo, e todos seus alunos da época, Pedro, Daniel, Lourival e, principalmente, à minha querida amiga Déa. À Susana Pessoa, que fazia de tudo para os dois grupos.

À amiga Teca, e todo seu grupo, pelo apoio, incentivo, amizade e pelas muitas colaborações e discussões.

Aos professores do Departamento de Parasitologia do ICB que foram importantes na minha formação.

Ao pessoal da Entomologia da Fundação Nacional de Saúde do Acre e de Rondônia, pelo apoio nas capturas de anofelinos em campo e no laboratório.

Ao Ricardo Lourenço de Oliveira e à Nildimar (FIOCRUZ) pela colaboração durante meu doutorado.

Ao Marcelo Jacobs Lorena, pela oportunidade mais importante da minha carreira, pois ter feito pós-doc em seu laboratório foi uma grande experiência profissional e de vida, onde aprendi a dar importância a qualidade dos artigos científicos. Estendo meus agradecimentos aos colegas que dividiam as bancadas do seu laboratório: Martin, Stephan, Mike, Abraham, Anil, Prakash, Anirud, Neil, Jessica e ao amigo Chaoyang pelas grandes idéias,

amizade e colaboração nos projetos. Ao Luciano pela amizade e ajuda nos primeiros meses de Estados Unidos.

Um agradecimento especial à amiga Cristina, pela ajuda nos primeiros tempos de EUA, em Cleveland, pela amizade que continua apesar da distância e pela colaboração científica que tivemos na época.

Ao amigo Delsio Natal, por ser o responsável pela minha vinda à FSP como Jovem Pesquisador, por todo apoio que deu e continua dando aos projetos, e aos colegas e técnicos de seu laboratório, em especial aos amigos Walter e Paulo.

Ao Almério pela amizade e pelas muitas discussões entusiasmadas nos corredores da FSP.

À Maria Anice Sallum pelo apoio, incentivo, discussões e pela valiosa colaboração nos trabalhos com mosquitos *Culex*, que não teriam sido possíveis sem sua ajuda.

Aos professores e colegas do Departamento de Epidemiologia. Aos colegas da secretaria e da informática do HEP, os do presente e os que foram para outro lugar: Rosana, Beth, Palmirinha, Rita, Regininha, Roberta, Fernando, Rodrigo, Daniel, Pascoal e especialmente a Dora pela amizade, ajuda na confecção do memorial e incentivo.

Aos meus alunos que contribuíram com seus resultados, incluídos nessa tese, André (o primeiro), Bruna, Fabiana e Sirlei, e também àqueles que não contribuíram diretamente, mas cuja convivência foi sempre muito boa, Daniel, Ferrari, Sergio, Gabriela e Delma.

Aos órgãos financiadores de pesquisa, FAPESP, CNPq, EMAE, OMS, NIH, que aprovando e financiando projetos que trabalhei como estudante, colaborador ou coordenador, possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, em especial ao Sergio e Ana, pelo suporte, incentivo, aprendizado e lições da vida.

À Heleni, por me completar, por sempre me apoiar, pela compreensão, dedicação, pelas sugestões e correções dessa tese, e por todo o amor e felicidade que tem me dado...

RESUMO

Marrelli MT. Marcadores moleculares e controle genético de mosquitos vetores. 2011. 184p. Tese de Livre Docência. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Os mosquitos são responsáveis pela transmissão de várias doenças ao homem, entre elas malária, dengue e filarioses. O Laboratório de Biologia Molecular de Vetores do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo vem desenvolvendo projetos de pesquisa relacionados aos aspectos moleculares e ao controle genético dos mosquitos vetores, principalmente dos gêneros *Anopheles* e *Culex*. A identificação das espécies contidas nesses gêneros é dificultada pela falta de características marcantes nas fêmeas adultas, e pelo fato de muitos desses pertencerem a complexos de espécies crípticas. Estes problemas levaram a utilização de abordagens moleculares, com a utilização de marcadores mitocondriais e ribossômicos para auxiliar na taxonomia e a responder questões filogenéticas. Entre os estudos discutidos nessa tese, é mostrado o *Anopheles darlingi* como espécie monotípica e o *An. oswaldoi* como um complexo de espécies. Já os estudos com espécies do gênero *Culex* indicaram a presença de alguns complexos e de espécies em processos de especiação. Sabe-se que a ocorrência de espécies crípticas entre os vetores de patógenos e o desenvolvimento de técnicas que permitam a correta identificação é crucial em programas de controle. O ressurgimento de parasitoses e arboviroses transmitidas por mosquitos devido principalmente a resistência desses aos inseticidas levaram ao surgimento de estratégias alternativas de controle, tais como a utilização de mosquitos geneticamente modificados para supressão ou substituição de populações vetorais. Embora a competência e a viabilidade da modificação genética de mosquitos tenham sido demonstradas em laboratório, ainda não se sabe como os transgenes podem ser inseridos nas populações de mosquitos na natureza. Foram propostas várias abordagens possíveis, como o uso de elementos de transposição. Porém, o êxito de qualquer mecanismo dependerá em parte do custo no *fitness* dos mosquitos que é imposto pela presença do transgene e, desse modo, estudos de *fitness* são essenciais para a seleção de linhagens de mosquitos transgênicos que poderão ser utilizadas em programas de controle. A utilização de mosquitos transgênicos no controle de doenças está próxima de uma realidade e alguns países, incluindo Malásia, México e Brasil, estão em fases de testes preliminares para liberação em massa de *Aedes aegypti* transgênicos para supressão da população. Assim, a Organização Mundial da Saúde encomendou a produção de um guia de orientação, denominado *MosqGuide*, para proporcionar informação aos países endêmicos na escolha da estratégia e determinar em que condições implantar os métodos de controle genético, especificamente para o controle dos mosquitos vetores da malária e dengue.

Palavras-chave: Mosquitos, *Anopheles*, *Culex*, marcadores moleculares, ITS2, COI, controle, transgênicos.

ABSTRACT

Marrelli MT. Molecular markers and genetic control of the mosquito vectors. 2011. 184p. Tese de Livre Docência. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Mosquitoes are responsible for transmitting many human diseases, including malaria, dengue fever and filariasis. The Laboratory of Molecular Biology of Vectors of the Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, has been developing scientific projects related to the molecular aspects and to the genetic control of mosquito vectors, mainly of genera *Anopheles* and *Culex*. The identification of species in these genera is hampered by lack of striking characteristics in adult females, and many mosquitoes of these genera belong to cryptic species complexes. These problems led to use of molecular approaches, using mitochondrial and ribosomal markers, to help answering taxonomic and phylogenetic questions. Among the studies discussed here, we showed the *Anopheles darlingi* as monotypic species and *An. oswaldoi* as a species complex. Studies on species of the genus *Culex* indicated the presence of some complexes and species in speciation processes. The occurrence of cryptic species between the vectors of pathogens and the development of techniques which allow the correct identification is crucial to control programs. The resurgence of parasitic infections and arboviruses transmitted by mosquitoes mainly because of resistance to insecticides has led to alternative strategies, such as the use of genetically modified mosquitoes for suppression or replacement of vector populations. Although the competence and viability of the genetic modification of mosquitoes have been demonstrated in the laboratory, it is still unclear how the transgenes can be inserted in populations of mosquitoes in nature. Several approaches have been proposed, such as the use of transposon elements. However, the success of any mechanism will depend in part on the fitness cost of mosquitoes that is enforced by the presence of the transgene and thereby fitness studies are essential to selecting lineages of transgenic mosquitoes to be used in control programs. The use of transgenic mosquitoes in controlling diseases is close to be a reality, and some countries including Malaysia, Mexico and Brazil are in preliminary stages of tests to release transgenic strains of *Aedes aegypti*, for suppression of the population. Thus, the World Health Organization commissioned the production of a guide, named *MosqGuide*, to provide information to endemic countries in the choice of the strategy and to determine under what conditions deployment of genetic control methods, specifically for the control of mosquito vectors of malaria and dengue.

Key words: Mosquitoes, *Anopheles*, *Culex*, molecular markers, ITS2, COI, control, transgenic.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta por uma **INTRODUÇÃO** sobre mosquitos como um problema de saúde pública, por uma **DISCUSSÃO** geral dos artigos relacionados às linhas de pesquisa “marcadores moleculares” e “mosquitos transgênicos”, que são parte representativa da minha produção científica, e pelas cópias desses **ARTIGOS**, publicados principalmente entre 2005 e 2011. Nos artigos são descritos os **MATERIAIS E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÕES** referentes às duas linhas de pesquisas. Nas **CONSIDERAÇÕES FINAIS** procuro concluir os conteúdos dos artigos e dos temas abordados e, por fim, segue as **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.

Cada artigo é apresentado com um breve resumo em português, para auxiliar a situá-lo no contexto dos dados apresentados. A escolha dos artigos seguiu o critério de representatividade das duas principais linhas de pesquisa que tenho seguido desde meu doutorado, e que hoje o Laboratório de Biologia Molecular de Vetores, sob minha coordenação, mantém projetos de pesquisa. Os dois primeiros artigos, publicados em 1999, são parte da minha tese de doutorado, orientada pelo Dr. Osvaldo Marinotti, e foram incluídos devido a importância para meu início nesta linha de pesquisa. Cinco desses artigos são de autoria de estudantes que recentemente defenderam suas dissertações de mestrado ou doutorado, sob minha orientação. Artigos publicados durante meu pós-doutorado no laboratório do Dr. Marcelo Jacobs Lorena também foram incluídos, pois entre estes estão meus três principais artigos publicados na área de transgênicos.

Os **ARTIGOS** incluídos estão na seguinte ordem:

ARTIGO 1 - Malafronte RS, **Marrelli MT**, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 36: 631-4, 1999.

ARTIGO 2 - **Marrelli MT**, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 36: 679-684, 1999.

ARTIGO 3- Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Marinotti O. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology* 19: 208-218, 2005.

ARTIGO 4 - Marrelli MT, Sallum MAM, Marinotti O. A critical review of ITS2 as a tool for Latin American anopheline taxonomy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 817-832, 2006.

ARTIGO 5 - Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Sallum MA, Malafronte RS, Marrelli MT. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera, Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011 (em publicação).

ARTIGO 6 - Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MA, Marrelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the Cytochrome C Oxidase I mitochondrial gene. *Journal of Medical Entomology* 2011 (em publicação).

ARTIGO 7 - Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105: 672-676, 2010.

ARTIGO 8 - Wilke ABB, Natal D, Gomes AC, Marrelli MT. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. *Revista de Saúde Pública*, 43: 869-874, 2009.

ARTIGO 9 - Wilke ABB, Nimmo DD, John OS, Kojin BB, Capurro ML, Alphey L, Marrelli MT. Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17: 65-74, 2009.

ARTIGO 10 - Marrelli MT, Moreira, CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. Mosquito transgenesis: What is the fitness cost? *Trends in Parasitology* 22: 197-202, 2006.

ARTIGO 11 - Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 104: 5580-5583, 2007.

ARTIGO 12 - Marrelli MT, Li C, Yan G, Jacobs-Lorena M. Fitness of transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the SM1 peptide under the control of a vitellogenin promoter. *Journal of Heredity* 99: 275-282, 2008.

ARTIGO 13 - Mumford J, Quilan MM, Beech CJ, Alphey L, Bayard V, Capurro ML, Kittayapong P, Knight JD, **Marrelli MT**, Ombongi K, Ramsey J, Reuben J. MosqGuide: A project to develop best practice guidance for the deployment of innovative genetic vector control strategies for malaria and dengue. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17: 93-95, 2009.

ARTIGO 14 - Beech CJ, Vasan SS, Nagaraju J, Rose RI, Othman RY, Pillai V, Mohammadi A, Bouaré M, Corena M, Lim LH, Tyagi BK, Mumford J, Quinlan MM, Alphey L, Bayard V, Capurro ML, Kittayapong P, **Marrelli MT**, Ombongi K, Reuben R, Ramsey J, Lavery J. Deployment of innovative genetic vector control strategies: Progress on regulatory and biosafety aspects and development of best-practice guidance. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17: 75-85, 2009.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. MOSQUITOS: UM PROBLEMA DE SAÚDE DE PÚBLICA	8
2. IDENTIFICAÇÃO DE MOSQUITOS VETORES	10
2.1. COMPLEXOS DE ESPÉCIES CRÍPTICAS	10
2.2. O ITS2 EM ANOFELINOS DA AMÉRICA LATINA	14
2.3. ESTUDOS COM ESPÉCIES DE MOSQUITOS DO GÊNERO <i>CULEX</i>	20
3. CONTROLE GENÉTICO	26
3.1. ESTRATÉGIAS DE USO DE MOSQUITOS TRANSGÊNICOS	26
3.2. ESTUDOS DE FITNESS DOS MOSQUITOS TRANSGÊNICOS	28
ARTIGO 1	34
ARTIGO 2	39
ARTIGO 3	46
ARTIGO 4	58
ARTIGO 5	75
ARTIGO 6	84
ARTIGO 7	93
ARTIGO 8	99
ARTIGO 9	105
ARTIGO 10	116
ARTIGO 11	123
ARTIGO 12	128
ARTIGO 13	137
ARTIGO 14	141
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	163
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170

1. INTRODUÇÃO

1.1. MOSQUITOS: UM PROBLEMA DE SAÚDE DE PÚBLICA

A palavra mosquito tem sido popularmente utilizada para indicar uma série de insetos, de tamanho reduzido, que causam incômodos e transmitem patógenos causadores de doenças aos seres humanos. Neste trabalho serão considerados como mosquitos apenas os insetos nematóceros da família Culicidae. Estes insetos têm sido notados pelo homem e referidos na literatura há muito tempo. HERÓDOTO (Século V a.C.), geógrafo e historiador grego, por exemplo, escreveu sobre a grande quantidade de mosquitos no Egito, principalmente em regiões pantanosas. VITRUVIUS POLLIO, arquiteto e engenheiro romano, por sua vez, no Século I a.C. já recomendava que as casas não fossem construídas em locais próximos a regiões alagadas, por motivo de insalubridade relacionada à presença destes insetos. Desde esta época até metade do Século XVIII, não se conhece nenhum estudo publicado referente aos mosquitos. Entre meados do Século XVIII e meados do Século XIX, começaram a surgir trabalhos descritivos da morfologia e biologia destes insetos. No entanto, ainda era pequena a importância dada aos mosquitos como objeto de estudo científico, como pode ser ilustrado pelo nome do gênero *Anopheles*, criado em 1818 por MEIGEN, que significa inútil ou imprestável. NOTT, em 1848, e BEAUPERTHUY, em 1853, foram os primeiros a apontar o mosquito como um inseto supostamente relacionado à propagação da febre amarela (CHRISTOPHERS 1960, FOSTER 1965, CLEMENTS 1992, MITCHELL 1996).

O papel dos insetos e outros invertebrados como transmissores de agentes causadores de doenças em vertebrados foi cientificamente comprovado somente no final do Século XIX. A primeira evidência foi obtida pelo médico escocês, PATRICK MANSON, em 1877, que descobriu que vermes (*Wuchereria bancrofti*) causadores da filariose (elefantíase) no homem se desenvolviam no interior de mosquitos do gênero *Culex*, mais precisamente o *Cx. fatigans*. No entanto, pensava-se que a transmissão ocorria pela ingestão das águas de fontes onde os mosquitos infectados morriam. A partir de então, foi comprovada a transmissão de outras

enfermidades ao homem pelos mosquitos. Ross, trabalhando na Índia em 1897, demonstrou o desenvolvimento do *Plasmodium* em mosquitos, e a confirmação definitiva da transmissão da malária humana por *Anopheles claviger* foi apresentada logo a seguir, por GRASSI, em 1898. A transmissão do vírus causador da febre amarela, pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, foi confirmada em Cuba, no ano de 1900, pela equipe liderada por WALTER REED (CHRISTOPHERS 1960, FOSTER 1965, CLEMENTS 1992, MITCHELL 1996).

Mais de um século após estas descobertas, sabe-se que os mosquitos são vetores das quatro espécies de plasmódios que causam a malária humana, transmitem as filárias *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*, muitas espécies de arbovírus, como os causadores da febre amarela e da dengue, contribuindo assim de maneira expressiva para os atuais índices de mortalidade e morbidade humana no mundo. Anualmente são registrados, pelo menos, 250 milhões de novos casos de malária, filarioses, dengue e outras arboviroses relacionados diretamente à presença destes insetos (JAMES 1992).

Apesar dos números preocupantes, as ações para o controle da transmissão dessas enfermidades não tem sido eficientes. Isso ocorre devido a vários tipos de problemas sócio-econômicos (crescimento da população mundial, falta de informação e educação e má distribuição de renda) e biológicos (resistência dos parasitas às drogas utilizadas nos tratamentos dos pacientes, resistência dos insetos vetores aos inseticidas químicos utilizados para o seu controle e mudanças do meio pela ação antrópica, afetando a distribuição geográfica dos vetores). Frente a este quadro, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias como, por exemplo, a utilização de mosquitos transgênicos, ou do aprimoramento dos programas atuais destinados ao controle da transmissão dessas enfermidades.

Estudos moleculares e bioquímicos referentes aos mosquitos e à sua interação com os parasitas começaram a receber maior atenção das agências financiadoras, tais como, BILL & MELINDA GATES FOUNDATION, MACARTHUR FOUNDATION & NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH nos Estados Unidos da América, WELLCOME TRUST na Inglaterra, e a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE em vários países, a partir da década de 80. Estes incentivos levaram muitos pesquisadores de outras áreas a direcionarem seus esforços para o estudo de insetos vetores, como o caso do grupo do Dr. MARCELO

JACOBS LORENA, hoje professor da JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, que após anos de trabalho dedicados à genética de *Drosophila*, passou a trabalhar com pesquisas de anofelinos, nos anos 90. É nesse contexto que a Biologia Molecular e a Bioquímica tem contribuído para o estudo dos mosquitos vetores de enfermidades ao homem e o desenvolvimento de métodos de controle das populações de insetos e/ou transmissão dos patógenos por eles veiculados. O Laboratório de Biologia Molecular de Vetores do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo vem desenvolvendo projetos de pesquisas relacionados aos aspectos moleculares da biologia e controle dos mosquitos vetores.

2. IDENTIFICAÇÃO DE MOSQUITOS VETORES

2.1. COMPLEXOS DE ESPÉCIES CRÍPTICAS

Embora a Família Culicidae seja uma das mais estudadas entre os insetos, ainda há muitas dúvidas no campo da sistemática, filogenia e evolução. A pesquisa em mosquito tem sido aplicada e centralizada na identificação, biologia e controle das espécies responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos (MILLER et al. 1996).

Rotineiramente, mosquitos e outros insetos são identificados através da utilização de chaves taxonômicas, com base na dicotomia de caracteres morfológicos. Ao longo dos anos, isso levou à realização de estudos anatômicos detalhados, atingindo-se o diagnóstico das chamadas morfo-espécies (FORATTINI 2002). A identificação de espécies vetorais pode ser uma tarefa muito fácil em determinadas localidades, necessitando apenas de técnicos treinados na taxonomia dos insetos de acordo com suas características morfológicas. Entretanto, em muitas situações, esta identificação pode apresentar dificuldades, sendo necessária a aplicação de técnicas mais sofisticadas, que utilizem metodologia bioquímica e de DNA recombinante.

Durante as primeiras décadas do século passado os esforços para entender e controlar a transmissão da malária na Europa levaram a uma inesperada, mas importante, descoberta: foi demonstrado que o principal vetor da malária na Europa na época, o *Anopheles maculipennis*, não era uma espécie monotípica, mas sim

um complexo de várias espécies com características morfológicas de difícil distinção. Denomina-se complexo, o conjunto de espécies que apresentam características morfológicas idênticas ou que se sobrepõem, de modo a dificultar a sua correta identificação, sendo as espécies do complexo denominadas espécies crípticas (COLLINS & PASKEWITZ 1996). Esta descoberta, combinada com as subseqüentes demonstrações de que essas espécies crípticas podem apresentar diferenças na distribuição geográfica e nas suas preferências por hospedeiros, permitiu a compreensão do fenômeno designado “*anofelismo sem malária*”, observado em várias regiões do mundo, contribuindo, portanto, para o desenvolvimento de estratégias mais efetivas e racionais para o controle dessa enfermidade (BLACK & MUNSTERMANN 2005).

Assim, por exemplo, *Anopheles gambiae*, na África, constitui-se em um complexo de sete espécies crípticas (*An. gambiae* sensu stricto, *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus*, *An. bwambae*, *An. merus*, *An. melas*, *An. quadriannulatus* espécie B). Na maioria dos casos, estes anofelinos são encontrados em habitats diferentes, sendo os mais importantes na transmissão da malária humana o *A. gambiae* s.s. e o *A. arabiensis*. Duas dessas espécies, *An. arabiensis* e *An. quadriannulatus*, são simpátricas em determinadas áreas do Zimbábue. Nos anos 1970, a resistência desses mosquitos ao inseticida Dieldrin foi detectada. Para evitar gastos dos estoques de BHC (benzeno hexaclorado), um inseticida químico relacionado ao Dieldrin, foram realizados testes de sua eficácia para o controle dos anofelinos locais. Os mosquitos dessas áreas foram expostos ao BHC, e os sobreviventes foram identificados como *An. arabiensis*, um eficiente vetor da malária, enquanto que todos os mosquitos mortos eram *An. quadriannulatus*, um mosquito altamente zoofílico e não competente na transmissão de patógenos causadores da malária humana. Portanto, o vetor *An. arabiensis* já se encontrava altamente resistente ao BHC, tornando-o inútil no controle da malária (GREEN 1981).

Respostas similares de resistência a inseticidas têm sido notadas em espécies pertencentes a outros complexos de espécies crípticas como, por exemplo, *Anopheles culicifacies*, na Índia, cuja resistência ao DDT (Diclorodifeniltricloroetano) foi associada principalmente a um dos membros, denominado espécie B, que não é vetor da malária humana (SUBBARAO et al. 1988).

Estes exemplos ilustram a importância do estudo das espécies que compõe as populações de mosquitos, nas áreas onde projetos de controle de vetores estão sendo aplicados ou estão em fase de planejamento. Consequentemente, a distinção de mosquitos membros de complexos é fundamental para estudos epidemiológicos e programas de controle, já que diferentes espécies dentro de um complexo podem exibir diferenças na ecologia, na capacidade e competência vetorial, e na resposta a medidas de controle (WHITE 1982).

Na tentativa de elucidar o problema da identificação de espécies crípticas, vários métodos têm sido empregados tais como a análise do bandejamento de cromossomos politênicos (MAHON et al. 1976, COLLUZZI et al. 1979) e a tipagem de enzimas por meio de perfis de migração eletroforética (GREEN et al. 1992, COETZEE et al. 1993, FOLEY & BRYAN 1993). Estes métodos variam muito quanto ao custo, tempo e trabalho despendidos; quantidade, qualidade e tipo de conservação dos exemplares a serem analisados; tipo de informação gerada e aplicabilidade (HILL & CRAMPTON 1994). Devido às limitações desses métodos, técnicas diretas de análise baseadas em DNA têm sido desenvolvidas nos últimos anos (HILL & CRAMPTON 1994, WALTON et al. 1999).

Em mosquitos (Diptera: Culicidae) e outros artrópodes, uma das regiões do genoma que tem sido amplamente estudada e utilizada para a distinção de espécies crípticas é a que compreende o DNA ribossômico (DNAr) (COLLINS & PASKEWITZ 1996). De forma geral, cada unidade de repetição do DNAr eucarionte possui uma organização conservada (Figura 1), sendo constituída por: 1) um espaçador intergênico não transcrito (IGS) que é altamente variável; 2) um espaçador externo transcrito (ETS), que é transcrito em uma sequência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do RNAr; 3) três regiões transcritas, cada uma delas com as respectivas sequências que codificam três genes ribossômicos: 5.8S, 18S e 28S (regiões altamente conservadas); 4) dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) (COLLINS & PASKEWITZ 1996).

Métodos baseados em sequências de DNAr para a identificação de mosquitos têm contribuído significativamente para estudos epidemiológicos e de controle da malária. Inicialmente pelo uso de sequências clonadas de DNAr que podem ser utilizadas como sondas (COLLINS et al. 1987) e posteriormente pelo uso de PCR

(McLAIN et al. 1989, PASKEWITZ & COLLINS 1990, PASKEWITZ et al. 1993a, SCOTT et al. 1993). Utilizando-se *primers* específicos da região IGS a técnica de PCR distingue cinco membros do complexo *An. gambiae* (SCOTT et al. 1993). A região do ITS2, por sua vez, tem sido amplamente usada na distinção de anofelinos pertencentes a vários complexos de espécies crípticas, tais como os complexos *An. maculipennis* (PORTER & COLLINS 1991), *An. punctulatus* (BEEBE & SAUL 1995) e *An. quadrimaculatus* (CORNEL et al. 1996), e em análises filogenéticas (WESSON et al. 1992, FRITZ et al. 1994, SEVERINI et al. 1996, SALLUM et al. 2002, MARRELLI et al. 2005, VESGUEIRO et al. 2011).

Figura 1. Esquema do cistron ribossômico em eucariotos. Genes 18S, 5.8S e 28S, codificam para os componentes do RNA ribossômico. Espaçadores internos transcritos, ITS1 e ITS2. Espaçador externo transcrito (ETS) e espaçador intergênico (IGS).

Recentemente, graças às inúmeras vantagens quanto à sua estrutura e evolução, a análise de sequências do DNA mitocondrial (DNAMt) tem se tornado o método de escolha em estudos populacionais, taxonômicos e filogenéticos. A organização do DNAMt dos animais é relativamente simples, sendo constituída, na grande maioria dos casos, por uma dupla fita circular contendo 37 genes, dos quais dois codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam

proteínas. Quando comparado ao DNA nuclear, o DNAmít apresenta inúmeras vantagens: possui múltiplas cópias por célula; seu genoma haplóide é de origem materna; não sofre processos de recombinação gênica; os íntrons estão ausentes em muitos invertebrados; os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliados a um sistema de reparo pouco eficiente, parecem acumular mutações (WILSON et al. 1985, MORITZ et al 1987).

Uma região do gene mitocondrial COI (subunidade I da citocromo oxidase), foi indicada para ser empregada como um tipo de código de barras de todas as espécies, conhecida como *barcoding* (SIMON et al. 1994, HERBERT et al. 2003), e tem sido utilizada como ferramenta em diversos estudos de filogenia, taxonomia, genética de populações e filogeografia dentro da família Culicidae (COOK et al. 2005, PATSOULA et al. 2006, OSHAGHI et al. 2006, HEMMERT et al. 2007, DEMARI-SILVA et al. 2011, *em publicação*). O COI é responsável pela produção de uma pequena e conservada proteína heme (citocromo c), a qual está envolvida no transporte de elétrons e na translocação de prótons através da membrana (SARASTE 1990), e no mecanismo de apoptose (morte celular) em diversos organismos (ZHAO et al. 2008).

2.2. O ITS2 EM ANOFELINOS DA AMÉRICA LATINA

O vetor primário da malária humana na Região Amazônica, o *Anopheles darlingi* (DEANE 1986), é uma espécie altamente antropofílica e endofílica, com grande capacidade de adaptação ambiental e reprodução em diferentes habitats (TADEI et al 1998, TADEI et al. 2000). Alguns estudos sugerem a existência de um complexo *An. darlingi*, baseados na ampla distribuição geográfica com diferenças morfológicas, no perfil de isoenzimas e no padrão de bandejamento dos cromossomos politênicos, além de diferenças na biologia entre as várias populações encontradas no Brasil, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia e Venezuela (KREUTZER & KITZMILLER 1971, ROSA-FREITAS et al. 1992, CHARLWOOD 1996). Por outro lado, resultados obtidos a partir da utilização de técnicas de análise de isoenzimas, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e sequenciamento de regiões do DNA ribossômico, indicaram a ocorrência de fluxo gênico por todo o território ocupado por esta espécie de mosquito, e que, portanto, *An. darlingi* é uma espécie monotípica (MANGUIN et al. 1999).

Em contraste com a publicação de MAGUIN et al. (1999), analisamos sequências de ITS2 de *An. darlingi* coletados em várias regiões do Brasil (MALAFRONTTE et al. 1999, **ARTIGO 1**). Os resultados mostraram que os exemplares capturados no Norte e Nordeste do Brasil apresentaram-se como uma população monotípica, porém, a população de *An. darlingi* de Dourado, no Estado de São Paulo, apresentou diferenças significativas, com 6% de diferenças e 10 pares de bases menor, em relação às outras populações. Estes resultados corroboram com dados obtidos por SIBAJEV-FREITAS et al. (1995), que já tinham indicado diferenças nessa população, por análise de hidrocarbonetos de cutícula e padrão de isoenzimas. Uma análise mais detalhada ainda é necessária para identificar a origem destas diferenças, que poderiam ser devido a variações intra-específicas ou ao fato, de que mosquitos *An. darlingi* encontrados em Dourado constituírem, de fato, outra espécie, dentro de um complexo *An. darlingi*, distinta daquela encontrada no Norte ou Nordeste do Brasil. De qualquer modo, as sequências de ITS2 apresentam os *An. darlingi* encontrados onde ocorre transmissão (na Região Norte), como uma única espécie.

Embora o *An. darlingi* seja considerado o principal vetor da malária no Brasil, outras informações obtidas em várias localidades da Região Amazônica, apontam para existência de outros mosquitos vetores que desempenham papel importante na transmissão dessa enfermidade, entre estes podem ser citados: *An. deaneorum*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis*, *An. nuneztovari* e *An. oswaldoi* (ARRUDA et al. 1986, KLEIN et al. 1991a, 1991b, BRANQUINHO et al. 1993, ROSA-FREITAS et al. 1998, MARRELLI et al. 1998, 1999a).

Vários relatos mostram o *Anopheles oswaldoi* como um vetor sem importância ou então de importância secundária na transmissão da malária (DEANE 1986, KLEIN et al. 1991a, 1991b). Por outro lado, esta espécie já foi indicada como vetor local de malária no Vale do Rio Ene, no Vale Amazônico no Peru (HAYES et al. 1987, NEED et al. 1993) e em localidades da Venezuela (RUBIO-PALIS et al. 1992). Estudos realizados no Estado do Acre, indicaram o *An. oswaldoi* como principal vetor da malária na região (NATAL et al. 1992, BRANQUINHO et al. 1993, BRANQUINHO et al. 1996, MARRELLI et al. 1998, 1999a). Utilizando indivíduos capturados em três áreas de desmatamento no Estado do Acre, Brasil, BRANQUINHO et al. (1993) analisaram 2.610

mosquitos da espécie de *An. oswaldoi* s.l. por ensaio imunoenzimático (ELISA) usando anticorpos monoclonais específicos para a detecção de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. vivax* V247 e *Plasmodium malariae*. As taxas de infecção de *An. oswaldoi* s.l. para qualquer uma das espécies de plasmódio foram mais elevadas do que as observados para *An. deaneorum*, enquanto que nenhuma das amostras de *An. darlingi* e *An. triannulatus*, foi positiva.

Mais tarde, outro estudo realizado pelo mesmo grupo (BRANQUINHO et al. 1996), determinou as taxas de oocistos nos tratos digestivos e de esporozoitos nas glândulas salivares de espécies de anofelinos capturados em Senador Guiomar e Plácido de Castro, Acre. Como resultado, apenas um *An. oswaldoi* s.l. recolhido em uma armadilha de Shannon, foi positivo para as duas formas. Na mesma área, MARRELLI et al. (1998) demonstraram mosquitos *An. oswaldoi* s.l. e seres humanos infectados com parasitas *P. vivax-like/P. simiovale*, corroborando com a importância da *An. oswaldoi* s.l. como um vetor importante em áreas recentemente estabelecidas no Estado do Acre.

Revisões taxonômicas referentes aos anofelinos pertencentes ao subgênero *Nyssorrhynchus* (FARAN 1980, FARAN & LINTHICUM 1981, LINTHICUM 1988), fazem evidentes as dificuldades para distinção morfológica de algumas espécies do Grupo Oswaldoi, como o *An. oswaldoi*. NEED et al. (1993), por exemplo, alegaram dificuldades para identificar anofelinos do grupo capturados no Peru. RUBIO-PALIS et al. (1992), observaram diferenças nos picos de atividades destes anofelinos na Venezuela. Em 1993, Delgado e Rubio-Palis propuseram nova chave para identificação dos anofelinos do Grupo Oswaldoi, capturados na Venezuela, a partir de características morfológicas. E. L. Peyton (comunicação pessoal) sugeriu que *An. oswadoi* encontrados fora da mata seriam *An. konderi* (considerado uma sinonímia de *An. oswaldoi*), e o *An. oswaldoi* s.s. estaria restrito às áreas de mata.

Anopheles konderi foi descrito por GALVÃO & DAMASCENO (1942) a partir de um exemplar macho, procedente de Coari, Amazonas. Esta espécie somente é diferenciada de *An. oswaldoi* por aspectos morfológicos da genitália masculina, e foi considerada espécie válida por vários autores (CAUSEY et al. 1946). Devido às dificuldades em separar fêmeas dessas espécies a partir de caracteres morfológicos

conhecidos, a literatura sobre *An. konderi* permaneceu muito pobre e sua história natural foi sempre confundida com a de *An. oswaldoi*, sendo posteriormente considerada sinonímia de *An. oswaldoi* por LANE (1953).

Desse modo, utilizando metodologia idêntica àquela para análise de populações de *An. darlingi* (MALAFRONTTE et al. 1999, **ARTIGO 1**), foi realizada análise de sequências de ITS2 de *An. oswaldoi* de distintas localidades do Brasil e outros países da América do Sul, para revisar o *status* taxonômico dessa espécie (MARRELLI et al. 1999b, **ARTIGO 2**). Diferentemente do que encontramos para *An. darlingi*, *An. oswaldoi* apresentou sequências indicativas da existência de um complexo de pelo menos 4 espécies crípticas, que incluiria *An. oswaldoi* s.s. e o *An. konderi*, entre outras a serem esclarecidas. *Anopheles konderi* foi removido da sinonímia de *An. oswaldoi* por FLORES-MENDOZA et al. (2004). Posteriormente, com a finalidade de comparar a susceptibilidade do *An. oswaldoi* s.l. e *An. konderi* s.l. a infecção pelo *P. vivax*, estes mosquitos foram experimentalmente infectados com sangue de pacientes maláricos. Os resultados mostraram que *An. oswaldoi* s.l. está envolvido na transmissão de *P. vivax*, enquanto que *An. konderi*, mesmo desenvolvendo oocistos de *P. vivax* nos tratamentos digestivos, os esporozoítos não conseguiram invadir as glândulas salivares (MARRELLI et al. 1999a)

A importância epidemiológica do *An. oswaldoi* s.l. pode ter sido superestimada no Estado do Acre, como uma consequência de erros de identificação da espécie. Em trabalho realizado no assentamento Pedro Peixoto, situado nos municípios de Rio Branco, Senador Guiomar e Plácido de Castro, por NATAL et al. (1992), de 4.588 exemplares de anofelinos capturados, 3.156 (86%) foram identificadas como *An. oswaldoi* s.l. No entanto, revisando o material depositado na Coleção Entomológica da Faculdade de Saúde Pública da USP, foi possível identificar dois machos, antes identificados como *An. oswaldoi* por NATAL et al. (1992), como na realidade *An. rangeli*. Por conseguinte, muitos indivíduos *An. rangeli* foram erroneamente identificados como *An. oswaldoi* s.l. (SALLUM et al. 2008).

Em outro estudo, analisamos sequências de ITS2 de amostras de 16 espécies de anofelinos capturados na Região Amazonas, Brasil (MARRELLI et al. 2005, **ARTIGO 3**). Análise da máxima verossimilhança (*maximum-likelihood*) separou dois

grupos distintos de espécies em conformidade com os reconhecidos subgêneros *Anopheles* (representado neste estudo por *An. eiseni*, *An. mattogrossensis*, *An. mediopunctatus* e *An. peryassui*) e *Nyssorhynchus*, representado por 12 diferentes espécies. Para o subgênero *Nyssorhynchus*, a árvore de *Neighbour-Joining* gerada a partir das relações entre as sequências de ITS2 foi compatível com a chave taxonômica morfológica estabelecida para estas espécies Amazônicas: *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. benarrochi*, *An. braziliensis*, *An. darlingi*, *An. deaneorum*, *An. dunhami*, *An. evansae*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. rangeli* e *An. triannulatus* (Figura 1, MARRELLI et al. 2005, **ARTIGO 3**).

A comparação dos resultados das sequências de ITS2 e as características morfológicas utilizadas para identificação revelou três diferentes circunstâncias: (1) espécies que apresentam ITS2 significativamente diferentes e com características morfológicas de fácil distinção; (2) sequências de ITS2 diferentes que permitem a identificação de espécies que são difíceis de identificar morfolologicamente; e (3) espécies sem diferenças suficientes no ITS2 para distinção de espécies membros de complexos (MARRELLI et al. 2005, **ARTIGO 3**).

Caracteres morfológicos discerníveis podem não existir para identificação de anofelinos (WHITE 1977, 1979). Como já discutido, revisões taxonômicas de anofelinos pertencentes ao Subgênero *Nyssorhynchus* (FARAN 1980, LINTHICUM 1988) colocaram em evidência muitos problemas na distinção morfológica de espécimes dentro da Secção de *Albimanus* do grupo *Oswaldoi*. Caracteres, tais como a região basal escura do tarso posterior II em *An. oswaldoi*, têm uma ampla gama de variação, sobrepondo o intervalo de caracteres mesmo com as espécies não vetoras *An. rangeli* e *An. evansae*, confundindo a identificação destas espécies (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994). Por outro lado, os resultados do estudo com ITS2 mostrou *An. oswaldoi* com diferença de 21% em comparação com *An. evansae* e 24% em comparação com *An. rangeli*, enquanto que *An. evansae* tem diferença de 23% da *An. rangeli*, como previamente identificados por FRITZ (1998). Essas diferenças inter-específicas facilitam separar essas três espécies a nível molecular.

O vetor local *An. nuneztovari* e a espécie *An. dunhami*, que nunca foi encontrada infectada com malária humana, são quase indistinguíveis

morfologicamente. No entanto, as sequências ITS2 destas duas espécies diferem em 22% e, portanto, podem ser utilizadas para a identificação correta desses mosquitos. Estes são exemplos de que ITS2 pode ser útil para a identificação de espécies morfologicamente semelhantes. Com base nas diferenças das sequência identificadas, *primers* específicos poderiam ser desenhados para diferentes regiões do ITS2, para que um produto de PCR de tamanho exclusivo seja amplificado para cada uma dessas espécies.

Outra circunstância mencionada, na qual sequências ITS2 não auxiliam a solucionar problemas taxonômicos, foi verificada em dois complexos de espécies afins. Na Secção de *Argyritarsis* (Grupo *Albitarsis*), *An. albitarsis* faz parte de um Complexo de pelo menos quatro espécies irmãs (WILKERSON et al. 1995), mas, infelizmente, não encontramos diferenças insuficientes no ITS2 para identificação molecular (Tabela 3, MARRELLI et al. 2005, **ARTIGO 3**). Níveis tão baixos de variação apoiariam uma hipótese de especiação muito recente ou incipiente nesses dois complexos. Os valores limitados da diferença de ITS2 são comparáveis aos obtidos com membros de complexo *An. gambiae*, com sete membros que não podem todos ser distinguidos morfologicamente e para o qual as sequências ITS2 não apresentam diferenças suficientes para ser usado para identificação das espécies (PASKEWITZ et al. 1993b).

Os resultados desse estudo (MARRELLI et al. 2005, **ARTIGO 3**) confirmam, mais uma vez, que o ITS2 é uma ferramenta útil para a identificação das espécies, para análises filogenéticas e, eventualmente, para solucionar problemas taxonômicos. Desse modo, utilizando a maioria das nossas sequências, disponibilizadas no GenBank, MATSON et al. (2008), propuseram um método de identificação das espécies de anofelinos da Região Amazônica, baseado no polimorfismo dos fragmentos da região do ITS2, gerados com diferentes enzimas de restrição.

Além disso, outra análise comprova o problema de identificação de anofelinos do Grupo *Oswaldoi*. Revisando sequências de ITS2 depositadas no GenBank (MARRELLI et al. 2006a, **ARTIGO 4**), chegamos a um resultado preocupante. Muitas das sequências de ITS2 que foram geradas e depositadas no GenBank foram originadas de indivíduos identificados de maneira incorreta. Por exemplo, foi demonstrado que uma das sequências geradas como sendo *An. oswaldoi* no estudo MARRELLI et al. (1999b,

ARTIGO 2), era provavelmente pertencente a um espécime de *An. evansiae* que foi erroneamente identificado como *An. oswaldoi*. Sequências de ITS2 de vários anofelinos da Região Neotropical têm sido determinadas durante a última década e depositadas no GenBank. Na maioria dos casos não existem espécimens testemunhas, logo muitos erros de identificação podem ter sido cometidos e, por conseguinte, muitas sequências depositadas no GenBank relacionadas a estas espécies não são confiáveis, como discutido na nossa análise.

Enquanto essas sequências foram utilizadas para análises comparativas em cada grupo taxonômico, como contribuições de pesquisadores e laboratórios individuais, pouco ou nenhum esforço tinha sido feito para analisar o padrão que abrangente a geração e coleta de dados. Por conseguinte, a organização e comparação de todas as sequências de ITS2 de anofelinos latino-americanos e uma análise de suas relações foi a finalidade da nossa revisão (MARRELLI et al. 2006a, **ARTIGO 4**). Como resultado, por exemplo, as sequências de ITS2 foram agrupadas de acordo com os subgêneros de anofelinos, e *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* foram agrupados no mesmo ramo filogenético, confirmando propostas anteriores de monofilia dessas linhagens (SALLUM et al. 2000, KRZYWINSKI et al. 2001a, b)

2.3. ESTUDOS COM ESPÉCIES DE MOSQUITOS DO GÊNERO *CULEX*

O gênero *Culex* pertence à tribo Culicini, sendo o maior gênero da família Culicidae com 23 subgêneros e 763 espécies (HARBACH 2007). Apesar disso, ele é um gênero pouco estudado (MILLER et al. 1996). Até 2002 eram reconhecidos 13 subgêneros na Região Neotropical, sendo que a maior parte das espécies pertence aos subgêneros *Melanoconion* e *Culex*. Estes subgêneros têm maior atenção epidemiológica, pois transmitem agentes causadores de arboviroses e filarioses, dentre outros patógenos (FORATTINI 2002, CONSOLI & OLIVEIRA 1994). Em 2008 foi descrito um novo subgênero neotropical *Phytotelmatomyia*.

Além das dúvidas em relação ao monofiletismo de *Culex*, a identificação das espécies contidas nesse gênero ainda é dificultada pela falta de características marcantes nas fêmeas adultas. Assim, a genitália dos machos tem sido considerada

mais adequada para a identificação das espécies. Da mesma maneira, características das larvas de quarto instar possibilitam a separação das espécies de *Culex*. No entanto, a identificação de espécies de alguns subgêneros, tais como *Melanoconion* e *Microculex*, é bastante dificultada pela falta de chaves de identificação atualizadas e que incluam todos os taxa descritos (CONSOLI & OLIVEIRA 1994). Além disso, deve se considerar que muitos mosquitos desse gênero também podem constituir complexos de espécies. Estes problemas levaram a utilização de abordagens moleculares.

A primeira investigação das relações entre espécies de mosquitos *Culex*, utilizando este tipo de abordagem, foi realizada por MILLER et al. (1996). Estes autores utilizaram os espaçadores ITS1 e ITS2 do DNAr para inferir as relações entre 14 espécies do gênero *Culex*. Desde então, poucas espécies de *Culex* tinham sido estudadas com o uso da biologia molecular, sendo as pertencentes ao complexo Pipiens as mais bem representadas devido à sua importância epidemiológica e vasta distribuição mundial (SEVERINI et al. 1996, BAHNCK & FONSECA 2006, KASAI et al. 2008).

O subgênero *Culex* possui dois complexos de grande importância epidemiológica: o complexo Pipiens (com as espécies: *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens*, *Cx. australicus* e *Cx. pallens*) e o Complexo Coronator (que inclui *Cx. coronator*, *Cx. ousqua*, *Cx. usquatus*, *Cx. camposi*, *Cx. usquatissimus*) (BRAM 1967). A única característica morfológica utilizada para distinguir as espécies dentro desses complexos é baseada na comparação das estruturas da genitália dos machos, sendo que as fêmeas são morfológicamente indistinguíveis (FORATTINI 2002).

Considerando o escasso conhecimento sobre a taxonomia e as relações filogenéticas de mosquitos do gênero *Culex*, a sua importância epidemiológica, a grande diversidade de espécies de mosquitos aliada às dificuldades na identificação morfológica das espécies de mosquitos desse gênero, principalmente devido ao fato das fêmeas serem morfológicamente muito similares, foram realizados dois estudos centrados na análise de espécies de mosquitos pertencentes a este gênero, um deles utilizando o marcador ITS2 (VESGUEIRO et al. 2011, **ARTIGO 5**), e outro o gene COI (subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase) (DEMARI-SILVA et al. 2011, *em publicação*, **ARTIGO 6**). Para as análises discutidas nesses artigos, foram tomados os devidos cuidados para que as exúvias das larvas, pupas e as genitálias masculinas dos

adultos, usados para a extração de DNA, fossem montadas entre lâmina e lamínula e empregadas para a identificação das espécies. Em seguida, o material foi codificado e rotulado, sendo depositado na Coleção de Referência da Faculdade de Saúde Pública como *vouchers*, e as sequências produzidas foram depositadas no GenBank com estas informações.

Os dois estudos investigaram as variações intra-genômicas, intra-específicas e interespecíficas entre espécies de mosquitos do gênero *Culex*, pertencentes aos subgêneros: *Culex*, *Microculex*, *Melanoconion* e *Phenacomyia* e uma espécie do gênero *Lutzia*. Os principais objetivos foram estabelecer as relações taxonômicas do gênero *Culex* na região Neotropical, e testar o posicionamento filogenético dos subgêneros *Phenacomyia* e *Lutzia* em relação ao *Culex* (VESGUEIRO et al. 2011, **ARTIGO 5**, DEMARI-SILVA et al. 2011, **ARTIGO 6**).

Os resultados dessas análises demonstraram que tanto o gênero como o subgênero *Culex* não formam grupos monofiléticos, uma vez que *Lutzia* e *Phenacomyia* ficaram agrupados dentro desses grupos (VESGUEIRO et al. 2011, **ARTIGO 5**, DEMARI-SILVA et al. 2011, **ARTIGO 6**). *Lutzia* foi descrito por THEOBALD (1903) como sendo um gênero distinto para a espécie mexicana denominada *Culex bigoti*. Em 1932, Edwards definiu *Lutzia* como um subgênero de *Culex*, e todos os autores seguintes adotaram essa classificação. Recentemente, NAVARRO & LIRIA (2000) empregaram caracteres morfológicos das partes do aparelho bucal de larvas para inferir as relações filogenéticas dentro da tribo Culicini, usando o método de parcimônia. Os resultados das análises indicaram que *Culex* e *Lutzia* formavam grupos monofiléticos, sendo que *Lutzia* seria o grupo mais primitivo entre os dois, confirmando a hipótese de EDWARDS (1932). No entanto, TANAKA (2003) elevou *Lutzia* a gênero e estabeleceu dois subgêneros novos (*Metalutzia* e *Insulalutzia*). Os resultados das análises realizadas com ITS2 e COI vão contra a classificação proposta por TANAKA (2003), uma vez que *Lutzia* ficou agrupado dentro do gênero *Culex* nas duas análises (Figura 1, VESGUEIRO et al. 2011, **ARTIGO 5**, Figura 1, DEMARI-SILVA et al. 2011, **ARTIGO 6**), corroborando a hipótese de EDWARDS (1932), de que *Lutzia* seria um subgênero de *Culex*.

Do mesmo modo, o subgênero *Phenacomyia*, descrito por HARBACH & PEYTON (1992) quando identificaram uma estrutura não usual na escova maxilar das

larvas de *Culex lactator*. Afirmando que as mudanças nas estruturas da maxila da larva são específicas na natureza, os autores consideraram que o *Cx. lactator* poderia pertencer a um novo subgênero. Assim, descreveram outras características morfológicas que corroboravam essa hipótese e, transferiram *Culex corniger* para o subgênero novo, como sendo espécie irmã de *Cx. lactator*. Semelhante ao resultado obtido para *Lutzia*, as análises da região do ITS2 e do gene COI indicaram que as variações morfológicas empregadas por HARBACH & PEYTON (1992) podem não ser suficientes para indicar o monofiletismo desses grupos.

Entre as 17 de espécies estudadas com o gene COI, *Cx. mollis*, *Cx. dolosus* e *Cx. imitator* mostraram altas variações intra-específicas nas sequências do gene COI (3,1%, 2,3% e 3,5%, respectivamente). Estes resultados estão em conformidade com a análise morfológica de espécimes coletados no mesmo local, indicando que este táxon pode incluir três complexos de espécies crípticas (Figura 1, DEMARI-SILVA et al. 2011, **ARTIGO 6**). No entanto, na análise com ITS2, somente *Cx. imitator* apresentou alta variação intra-específica, 7% de diferença entre exemplares capturados no Espírito Santo e São Paulo (VESGUEIRO et al. 2011, **ARTIGO 5**).

Tanto a análise de distância (*neighbour joining* com dados de ITS2), como a análise Bayesiana (com o gene COI), não conseguiram resolver algumas das relações, e algumas politomias foram encontradas. A proximidade de *Cx. nigripalpus* e *Cx. chidesteri* é suportada por caracteres morfológicos. Na análise com o gene COI, os dois indivíduos de *Culex nigripalpus* ficaram separados, e, um deles ficou agrupado com *Culex chidesteri*. Da mesma forma, *Culex bidens* é muito similar ao *Culex declarator*, aparecendo como espécies irmãs nas duas análises (com suporte do ramo elevado: 0,98 na análise Bayesiana). Nesse caso pode haver um processo de especiação recente que ainda não pode ser observado no fenótipo. Já *Culex usquatus* faz parte do Complexo Coronator, sendo que *Cx. usquatus* ficou agrupado com as espécies de *Cx. coronator* nas duas análises (Figura 1, VESGUEIRO et al. 2011, **ARTIGO 5**, Figura 1, DEMARI-SILVA et al. 2011, **ARTIGO 6**).

Finalizando esta primeira linha de pesquisa, realizamos um estudo de populações de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (MORAIS et al. 2010, **ARTIGO 7**). Conforme anteriormente citado, *Culex quinquefasciatus* faz parte do Complexo

Pipiens, que nas Américas é composto por duas espécies principais, *Cx. quinquefasciatus*, que é adaptado às zonas tropicais e *Cx. pipiens*, que é encontrado nas zonas temperadas. Em zonas intermédias, estes dois membros podem se acasalar produzindo híbridos e formas intermediárias (BARR 1957), através dos processos de fluxo gênico e introgressão (HUMERES et al. 1998, McABEE et al. 2008, KOTHERA et al. 2009). Os mosquitos do complexo de *Cx. pipiens* são vetores potenciais de filárias em áreas tropicais e subtropicais (BOCKARIE et al. 2009) e diversos arbovírus, incluindo o vírus do Nilo Ocidental (APPERSON et al., 2004, COOK et al. 2006).

Fêmeas adultas e estágios imaturos de espécies do complexo *Cx. pipiens* são morfologicamente semelhantes. A diferenciação de machos adultos pode ser feita através da análise de genitália (SUNDARARAMAN 1949). Como os membros desse complexo apresentam uma ampla distribuição geográfica, outras diferenças fenotípicas além das encontradas na genitália masculina, podem ser encontradas. Por exemplo, alguns caracteres de asa também podem ser usados para identificação morfológica de espécies de mosquitos (MORAIS et al. 2010, **ARTIGO 7**). Chaves taxonômicas compiladas por FORATTINI (2002) comparam a morfologia das asas de fêmeas adultas, e mostram que a veia de subcostal (Sc) se liga a veia costal (C) antes da bifurcação com a veia radial 2 + 3 ($R_2 + 3$) em *Cx. quinquefasciatus*, enquanto que em *Cx. pipiens*, a veia Sc se liga a veia C no mesmo ponto ou além da bifurcação do $R_2 + 3$. O estudo de MORAIS et al. (2010, **ARTIGO 7**) é a primeira investigação que utiliza este tipo de análise entre populações geograficamente distantes.

Para a correta distinção das espécies, inquéritos morfológicos e moleculares são necessários, bem como o conhecimento sobre as características das populações em um gradiente biogeográfico. Da mesma forma, a correta identificação das fêmeas e dos híbridos é de importância epidemiológica, principalmente devido a diferenças de fisiológicas, que podem refletir na preferência por hospedeiros, assim como no potencial vetor das espécies (HUMERES et al. 1998, LENORMAND & RAYMOND 2000, FONSECA et al. 2004, SAVAGE et al. 2008)

O trabalho realizado por MORAIS et al. (2010, **ARTIGO 7**) foi uma investigação preliminar da variabilidade genética morfológica de *Cx. quinquefasciatus* no Brasil. Além disso, a presença de uma zona de híbridos para *Cx. quinquefasciatus* e

Cx. pipiens na Argentina é discutida. O estudo também revê os dados de identificação morfológica das fêmeas baseados em caracteres morfométricos das asas. Neste artigo caracterizamos geneticamente e analisamos a morfometria das asas de seis populações distintas de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*. A caracterização molecular foi feita por PCR da região polimórfica do segundo intron do gene nuclear acetilcolinesterase. Os tamanhos dos centróides foram significativamente diferentes entre algumas localidades geográficas. Os valores médios de R_2/R_{2+3} diferiram significativamente entre as populações. No geral, o formato das asas, representados pelos caracteres morfométricos, dividiu as populações em dois agrupamentos principais. Nossos resultados sugerem que as amostras do Brasil são morfológicamente e geneticamente distintas das amostras da Argentina, e também indicam uma distinção morfológica entre populações do Norte e Sul do Brasil. Nós sugerimos que a morfometria das asas pode ser utilizada para uma avaliação preliminar da estrutura populacional do *Cx. quinquefasciatus* no Brasil

3. CONTROLE GENÉTICO

3.1. ESTRATÉGIAS DE USO DE MOSQUITOS TRANSGÊNICOS

Medidas de controle de mosquitos não têm surtido efeito devido principalmente a sua grande capacidade de reprodução e flexibilidade genômica (SHEARMAN 2002), que pode ser mostrada por dois aspectos. Primeiro, pela rápida seleção de linhagens resistentes a inseticidas químicos e biológicos utilizados no controle ou ainda a resistência a diversas condições ambientais. E segundo, pela existência de uma grande variedade de espécies intimamente relacionadas, formando complexos de espécies crípticas, como discutido anteriormente, algumas das quais parecem estar sofrendo especiação no processo de adaptação ao ambiente modificado pelo homem (BESANSKY & COLLINS 1992). A resistência aos inseticidas tem levado a sérios problemas de saúde pública, contribuindo para o ressurgimento de parasitoses e arboviroses transmitidas por mosquitos. Devido a este tipo de problema, outras estratégias de controle têm sido consideradas, como o controle genético, utilização de mosquitos geneticamente modificados (MOREIRA et al. 2000, ALPHEY 2002).

A utilização de mosquitos transgênicos no controle de doenças está rapidamente ganhando força. Na última década, avanços na biotecnologia, como a identificação de elementos de transposição que integram o transgene no genoma dos embriões de mosquitos, a descoberta de marcadores de transformação adequados, como as proteínas fluorescente GFP e DsRed (HORN et al. 2002), o desenvolvimento de técnicas de microinjeção (JASINSKIENE et al. 1998, CATTERUCCIA et al. 2000, GROSSMAN et al. 2001), a caracterização dos promotores que podem controlar a expressão de genes estranhos de modo tecido e estágio específicos (COATES et al. 1999, MOREIRA et al. 2000, KOKOZA et al. 2001a, ABRAHAM et al. 2005, CATTERUCCIA et al. 2005) e a identificação e caracterização de moléculas efetoras que interferem no desenvolvimento de parasitas no vetor (CONDE et al. 2000, GHOSH et al. 2001, ZIELER et al. 2001, ARRIGHI et al. 2002), levaram a geração de diferentes linhagens e categorias de mosquitos transgênicos. As diferentes abordagens de uso de mosquitos transgênicos são discutidas nas revisões por WILKE et al. 2009a, 2009b (**ARTIGO 8** e **ARTIGO 9**).

As estratégias de controle de mosquitos utilizando transgênicos podem ser divididas em duas categorias principais: substituição ou supressão de uma população alvo. Na estratégia de controle genético para substituição da população, os mosquitos transgênicos devem carregar um gene que interfere no desenvolvimento de patógenos e, quando liberados no meio ambiente, o transgene deverá ser introduzido na população, passando a ser dominante e assim reduzindo a transmissão de doenças (MOREIRA et al. 2000). O sistema de controle genético para supressão de uma população alvo é baseado na técnica de insetos estéreis (SIT), que levou ao desenvolvimento da tecnologia conhecida como “*liberação de insetos carregando um gene letal dominante*” (RIDL). Nessa estratégia, o produto do transgene suprime a capacidade de reprodução dos insetos alvos, levando ao declínio da população (KOKOZA et al. 2001b).

O controle de populações de insetos com a técnica SIT tem sido realizado com sucesso em diversas ocasiões, erradicando e controlando pragas agrícolas, como a mosca das frutas (BUSHLAND 1955). Baseado nos princípios da técnica SIT havia grande otimismo no final da década de 60 e início da década de 70 no uso desta técnica como estratégia alternativa no controle de mosquitos vetores de doenças. Entretanto, a técnica SIT tem sido usada somente contra um número restrito de espécies de mosquitos alvos. Este fato é devido em grande parte a alguns problemas fundamentais do sistema. Os insetos machos liberados devem competir por acasalamento com os tipos selvagens e o processo de produção, e em particular a necessidade de esterilizar os insetos machos por radiação pode, em alguns casos, causar uma perda drástica na capacidade de acasalamento destes insetos comparados aos machos selvagens (ALPHEY 2002).

Além disso, é importante a liberação exclusiva de mosquitos machos, por não exercerem a hematofagia. Para algumas espécies de culicídeos, a separação entre machos e fêmeas poderia ser feita por métodos físicos, baseados no tamanho das pupas, porém, sob o ponto de vista prático, essa estratégia seria extremamente trabalhosa e inviabilizaria qualquer projeto em grande escala. Desse modo, a proposta do sistema RIDL (do inglês “**R**elease of **I**nsects carrying a **D**ominant **L**ethal gene”) por THOMAS et al. (2000), e HEINRICH & SCOTT (2000), resolveria muitos desses problemas

relacionados à SIT em mosquitos. O sistema consiste na integração de um gene letal dominante, que pode estar associado a um promotor específico da fêmea, que permitiria a separação dos sexos, como descrito em detalhes nas revisões por WILKE et al. (2009a, 2009b, ver Figura 1, **ARTIGO 8**, e Figuras 1 e 2, **ARTIGO 9**), e foi utilizado com sucesso para transformar *Aedes aegypti*, sendo que uma das linhagens, denominada OX513, está em fase de testes de campo na Malásia e no Brasil (PHUC et al. 2007).

Embora a competência e viabilidade da modificação genética de mosquitos têm sido demonstradas em laboratório, ainda não sabemos como os transgenes podem ser inseridos nas populações de mosquitos na natureza. Foram propostas várias abordagens possíveis, como o uso de elementos de transposição. Porém, o êxito de qualquer mecanismo dependerá em parte do custo no *fitness* dos mosquitos que é imposto pela presença do transgene.

3.2. ESTUDOS DE *FITNESS* DOS MOSQUITOS TRANSGÊNICOS

Uma questão crucial que precisa ser considerada antes da liberação de mosquitos geneticamente manipulados é o custo do transgene no *fitness* dos mosquitos que os expressam. Os insetos transgênicos devem competir com as populações locais e espalhar com eficiência os genes efetores nas populações. O *fitness* pode ser definido como o sucesso relativo de um genótipo na transmissão de seus genes para a próxima geração. Ele tem dois componentes principais, sobrevivência e reprodução e, pode ser avaliada por vários parâmetros, tais como fecundidade, fertilidade, produtividade de biomassa das larvas, taxa de desenvolvimento, emergência do adulto e competitividade por acasalamento dos machos. Outros fatores que podem reduzir o *fitness* são: condições insuficientes para criação em massa, *inbreeding* (consanguinidade) e hibridização com os mosquitos de diferentes origens genéticas. Desse modo, foi realizada uma revisão (MARRELLI et al. 2006b, **ARTIGO 10**) focando os possíveis custos dos transgenes no *fitness* dos mosquitos transgênicos, resultando em muitas lições para estudos futuros de *fitness* desses mosquitos.

O impacto do transgene no *fitness* dos mosquitos pode ser dividido em custo negativo do produto do próprio transgene e efeito mutagênico da integração do transgene no genoma dos mosquitos. Os insetos transgênicos normalmente expressam vários genes como, por exemplo, um marcador fluorescente e um gene anti-parasita (ITO et al 2002, MOREIRA et al. 2002, KIM et al. 2004). Construções do tipo RIDL codificam além do marcador e do gene efector, uma proteína repressível trans-ativadora para controle do sistema (ALPHEY 2002). O acúmulo de proteínas estranhas pode ser tóxico para as células em que elas são expressas. É menos provável que proteínas expressas em células restritas tenham um impacto sobre o *fitness* do que as expressas em vários órgãos. Por exemplo, a proteína fluorescente GFP expressa no olho parece não afetar o *fitness*, pelo menos não em condições de laboratório (MOREIRA et al. 2004). Proteínas expressas em abundância controladas por promotores onipresentes, como por exemplo, o promotor de actina, podem causar um custo no *fitness* devido ao acúmulo de grandes quantidades de proteínas estranhas em uma ampla variedade de tipos de célula (LIU et al. 1999). Por exemplo, embora nenhum efeito sobre o *fitness* tenha sido observado em mosquitos que expressam o peptídeo SM1, o mesmo não foi observado em mosquitos expressando a fosfolipase A2 (PLA2), que foram claramente menos aptos e menos férteis que o tipo selvagem (MOREIRA et al. 2004). O *fitness* menor provavelmente foi causada por danos às células epiteliais do trato digestivo (ABRAHAM et al. 2005).

Um segundo modo do transgene reduzir o *fitness* é através do rompimento da função de algum gene, uma vez que a inserção pode ocorrer em uma área de transcrição ativa do genoma. Porém, na maioria dos casos, o impedimento da expressão de um gene funcional somente seria letal em homozigose, sendo que este tipo de fenótipo não seria detectado em heterozigotos. Os estudos de integração de transgenes em *Drosophila* têm mostrado que a maioria das inserções ou ocorre em regiões não codificadoras ou interrompendo funções de genes não essenciais (LYMAN et al. 1996). As poucas experiências com mosquitos também mostram que o efeito no *fitness* devido à inserção mutagênica não é frequente (MARRELLI et al. 2006b, **ARTIGO 10**).

Os primeiros estudos de *fitness* de mosquitos transgênicos chegaram a conclusões semelhantes, indicando que estes mosquitos mostraram um custo maior no *fitness* que o tipo selvagem (CATTERUCCIA et al. 2003, IRVIN et al. 2004). Em um dos estudos, número igual de mosquitos *An. stephensi*, transgênicos e não-transgênicos foram misturados em gaiolas, e a presença do transgene foi analisada por várias gerações. Em todos os experimentos, a frequência do alelo transgênico diminuiu acentuadamente até a extinção. A análise do sítio de integração do transgene em duas linhagens mostrou que o elemento de transposição tinha interrompido a sequência de codificação de um gene não essencial em uma das linhagens, e que esta tinha um *fitness* significativamente menor que a outra, em que a integração do transgene não interrompeu nenhum gene (CATTERUCCIA et al. 2003).

Em outro estudo, IRVIN et al. (2004) examinaram a aptidão reprodutiva e o desenvolvimento de três de linhagens de *Aedes aegypti* transgênicas, comparando com não-transgênicas. Os resultados mostraram que todas as linhagens analisadas tinham elevados custos no *fitness*. A sobrevivência foi significativamente reduzida em todas as fases da vida e a maior taxa de mortalidade foi observada durante a transição de ovo para larva. Além disso, a fecundidade foi consideravelmente reduzida e a longevidade dos adultos foi menor em duas linhagens.

Em um terceiro estudo, realizado no laboratório do Dr. JACOBS-LORENA, MOREIRA et al. (2004) demonstraram que mosquitos transgênicos heterozigotos expressando o peptídeo SM1 sob o controle do promotor de carboxipeptidase, que é induzido na alimentação sanguínea, foram tão aptos quanto os controles não transgênicos, quando alimentados com sangue de ratos não infectados. A expressão do peptídeo SM1 No trato digestivo do anofelino inibe a formação de oocistos e a transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado (ITO et al. 2002).

Uma diferença importante entre os dois primeiros estudos e o terceiro é que CATTERUCCIA et al. (2003) e IRVIN et al. (2004) utilizaram linhagens transgênicas homozigotas, enquanto o estudo realizado por MOREIRA et al. (2004) manteve as linhagens transgênicas na forma heterozigota ao cruzar cada geração de mosquitos transgênicos com o tipo selvagem de uma população mantida em insetários. Esta estratégia assegura que o *background* genético das linhagens transgênicas seja o

mesmo que a dos mosquitos controles, permitindo que uma correlação mais direta entre custo do *fitness* e presença do transgene. A diminuição no *fitness* observada para os mosquitos transgênicos homozigotos pode ser interpretada de duas maneiras: (i) diminuição em consequência de efeitos negativos do produto transgene ou efeito “mutagênico” durante o processo de inserção do transgene, ou (ii) diminuição do *fitness* como consequência da fixação de genes recessivos deletérios próximos ao ponto de inserção do transgene (“*hitchhiking effect*”, Figura 2, MARRELLI et al 2006b, **ARTIGO 10**). As duas possibilidades não podem ser distinguidas nas experiências realizadas nos dois primeiros estudos (CATTERUCCIA et al. 2003, IRVIN et al. 2004). O fato de que nenhum custo no *fitness* foi observado em duas linhagens independentes, expressando o peptídeo SM1, no terceiro estudo (MOREIRA et al. 2004) sugere que o transgene por si só não é sempre deletério.

Várias lições podem ser derivadas dos estudos publicados. O *inbreeding* pode ter um forte impacto sobre o *fitness*. A maioria dos organismos carregam numerosas mutações recessivas que reduzem o *fitness* (SIMMONS & CROW 1977, HALLIGAN & KEIGHTLEY 2003), quando a fixação de tais alelos ocorre. O uso de heterozigotos para avaliar o impacto do transgene no *fitness* deve ser considerado por duas razões. Em primeiro lugar, heterozigotos não estão sujeitos ao efeito do *inbreeding*. Em segundo lugar, a literatura de *Drosophila* sugere que mutações causadas pela inserção do transgene são geralmente recessivas (LYMAN et al. 1996) e não poderiam ser detectados em heterozigotos. No entanto, para aplicações práticas, como a criação em massa para a liberação em campo, a produção de linhagens homozigotas é necessária. Como o efeito mutagênico da inserção do transgene é um evento probabilístico, o *fitness* de várias linhagens com a mesma construção genética deve ser comparado e a mais apta escolhida. Quando há suspeita de “*hitchhiking effect*”, o cruzamento de transgênicos com não transgênicos por várias gerações pode melhorar o *fitness*, e os alelos deletérios das proximidades da inserção do transgene podem ser geneticamente removidos. Por fim, ao produzir linhagens de transgênicas, promotores tecido específicos (por exemplo, um promotor específico de olho, como marcador, ou um promotor específico de tecido gorduroso ou de trato digestivo, para os genes efetores) devem ser preferidos aos promotores que expressam proteínas de

modo onipresente e em abundância, que podem levar ao acúmulo de proteínas em muitos tipos de células, causando um efeito deletério ao transgênico (Liu et al. 1999).

Outro fator considerado foi o efeito da infecção com plasmódios na reprodução dos mosquitos transgênicos. Parasitas causadores da malária e outros patógenos, mesmo em baixos números, podem diminuir a fertilidade de seus insetos hospedeiros (HURD 2003), podemos supor que quando alimentados com sangue infectado com *Plasmodium*, os mosquitos transgênicos expressando genes antiparasitas seriam mais aptos que os não transgênicos, devido à prevalência reduzida de parasitas. Para investigar a validade desta premissa, experimentos de seguimento de gerações em gaiolas foram realizados, sendo que uma população de mosquitos, iniciada com igual número de indivíduos selvagens e transgênicos, expressando SM1, foi mantida alimentada com sangue de camundongos infectados com *P. berghei*. Nessas condições os transgênicos tiveram uma significativa vantagem no *fitness* sobre os não transgênicos (MARRELLI et al. 2007, **ARTIGO 11**). Estes mosquitos foram mais aptos, apresentando maior fecundidade (produção de maior número de ovos) e menor taxa de mortalidade, que os não transgênicos. Neste estudo realizamos também experimentos de seguimento de gerações em gaiolas, iniciando com proporções iguais de mosquitos transgênicos e não transgênicos.

Como resultado, os mosquitos transgênicos substituíram gradualmente os não transgênicos quando mantidos alimentados com camundongos infectados com uma cepa de *P. berghei* produtora de gametócitos, mas não quando alimentados com camundongos infectados com cepa que não produz gametócitos. Estes resultados sugerem que quando alimentados com sangue infectado com *Plasmodium*, os mosquitos transgênicos tem uma vantagem seletiva sobre os não transgênicos. Estes resultados têm importantes implicações na definição de estratégias de controle da malária utilizando mosquitos transgênicos (MARRELLI et al. 2007, **ARTIGO 11**).

Tanto em condições naturais como em experimentais, as infecções com *Plasmodium* com menos de cinco oocistos, podem significativamente reduzir a fecundidade dos anofelinos (HURD 2003), podendo ser previsto que o transgene pode conferir uma significativa vantagem para promover sua disseminação em populações de campo, onde a prevalência das infecções com malária é menor do que no

laboratório, e apenas uma parte relativamente pequena de mosquitos torna-se infectada (PRINGLE 1966). Nestas condições, a introgressão do transgene deverá ser consideravelmente mais lenta e possivelmente com magnitude não suficiente para estabelecer o transgene na população sem um programa contínuo de liberação em massa. No entanto, uma vez estabelecida, a presença dos transgenes que interferem com o desenvolvimento do parasita deve tornar mais difícil sua re-introdução após a erradicação da malária de uma área alvo (MARRELLI et al. 2007, **ARTIGO 11**).

Em outro estudo, analisamos o *fitness* de três linhagens de mosquitos transgênicos utilizando tabela de vida e experimentos de competição entre transgênicos e não transgênicos (LI et al. 2008, **ARTIGO 12**). As três linhagens de *Anopheles stephensi* foram geradas também expressando o peptídeo SM1, porém, sob controle de promotor de vitelogenina, inibindo a transmissão do parasita *Plasmodium berghei*, causador da malária em camundongos. A análise da tabela de vida indicou um baixo custo no *fitness* para as duas inserções únicas do transgene SM1 nas linhagens denominadas VD35 e VD26, e nenhum custo para inserções duplas na linhagem VD9. Entretanto, em experimentos de competição em gaiolas, onde cada uma das três linhagens, que são homozigotas para o transgene, foi inicialmente misturada com mosquitos não transgênicos na mesma proporção, a frequência do transgene diminuiu com o passar das gerações. Experimentos sugerem que a redução na frequência do transgene é consequência de um reduzido sucesso no cruzamento, reduzida capacidade de reprodução, e/ou efeito mutagênico da inserção do transgene no genoma do mosquito, e não devido ao efeito do próprio transgene. Desse modo, para uma linhagem de mosquitos transgênicos ser liberada em campo e efetivamente reduzir a transmissão de uma doença, um mecanismo genético de introdução do gene (*drive mechanism*) deve desenvolvido (LI et al. 2008, **ARTIGO 12**).

ARTIGO 1

Este artigo descreve os resultados da análise da divergência entre sequências de ITS2 de espécimes de *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária na Amazônia, coletados em várias localidades no Brasil: São Paulo (Dourado), Bahia (Itabela), Rondônia (Porto Velho), Roraima (Boa Vista), e Acre (Plácido de Castro). As sequências do ITS2 de mosquitos capturados na Região Amazônica (Porto Velho, Boa Vista e Plácido de Castro) e no Nordeste do Brasil (Itabela) foram quase idênticas. Entretanto, uma alta divergência (4-5%) nas sequências de ITS2 foi encontrada em mosquitos capturados no Sudeste (Dourado). Novas análises serão necessárias para determinar se estas diferenças indicam que a população de Dourado é composta por insetos de uma espécie diferente (críptica).

Analysis of ITS2 DNA Sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)

R. S. MALAFRONTTE,^{1,2} M. T. MARRELLI,^{1,2} AND O. MARINOTTI²

J. Med. Entomol. 36(5): 631-634 (1999)

ABSTRACT Specimens of *Anopheles darlingi* Root, the major vector of malaria in Brazil, were collected from several states in Brazil: São Paulo (Dourado), Bahia (Itabela), Rondônia (Porto Velho), Roraima (Boa Vista), and Acre (Plácido de Castro). Sequence divergence in the 2nd internal transcribed spacer (ITS2) was examined. The ITS2 sequences of mosquitoes captured in the Amazon region (Porto Velho, Boa Vista and Plácido de Castro) and in the northeast of Brazil (Itabela) were almost identical; however, a 4-5% sequence divergence was observed in the ITS2 of mosquitoes captured in the southeast (Dourado). Further analysis is needed to determine if these differences indicate that Dourado population may be a separate species.

KEY WORDS *Anopheles darlingi*, second internal transcribed spacer, ribosomal DNA, polymorphism

MALARIA REMAINS A serious health problem in the Amazon Basin as a result of massive immigration by miners and by colonization of the forest close to the rivers where *Anopheles darlingi* Root mosquitoes are abundant (Walsh et al. 1993, Tadei et al. 1998).

Anopheles darlingi is the primary malaria vector in Brazil (Forattini 1962, Deane 1988, Lourenço-de-Oliveira et al. 1989), and its geographic distribution extends from southern Mexico to northern Argentina (Faran and Linthicum 1981). Previous studies on the biology of this vector indicated that geographically distinct populations present different patterns of biting activity (Elliott 1972, Forattini 1987, Rosa-Freitas et al. 1992, Charlwood 1996). Rosa-Freitas et al. (1992) pointed out that this polymorphic behavior might not be a useful taxonomic character, because it is affected by seasonal variation and local environmental conditions.

Kreutzer et al. (1972) and Tadei et al. (1982) found that Amazonian populations of *An. darlingi* showed elevated polymorphism with a high frequency of inversion heterozygotes in salivary gland polytene chromosomes, whereas mosquitoes from Dourado, São Paulo State, were less polymorphic and appeared to show fixation of certain chromosomal arrangements.

Using cuticular hydrocarbons and isoenzymatic patterns, Sibajev-Freitas et al. (1995) distinguished *An. darlingi* captured in Dourado from those captured in Costa Marques, indicating intraspecific variation. Differences were not observed by analysis of mitochondrial DNA restriction sites.

The spacers of rDNA evolve at a faster rate than the coding sequences and the 2nd internal transcribed spacer (ITS2) has been used as a tool that distinguishes among some mosquito sibling species (Porter and Collins 1991, Paskewitz et al. 1993, Cornel et al. 1996). The purpose of our study was to compare ITS2 sequences obtained from *An. darlingi* specimens from several states of Brazil.

Materials and Methods

Mosquitoes. Adult females of *An. darlingi* species were collected during 1994-1998 at human bait in the states of São Paulo (Dourado, 22°06' S, 48°19' W), Rondônia (Porto Velho, 8°49' S, 63°54' W), Acre (Plácido de Castro, 10°20' S, 67°11' W), Roraima (Boa Vista, 2°49' N, 60°1' W), and Bahia (Itabela, 16°34' S, 39°24' W) (Fig. 1). Mosquitoes were identified to species with morphological keys (Faran and Linthicum 1981, Linthicum 1988) and stored at room temperature in isopropanol until genomic DNA extraction.

Cloning and Sequencing. Genomic DNA was extracted according to Moreira-Ferreira et al. (1998) with some modifications. Individual mosquitoes were homogenized in 50 µl of lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 100 mM EDTA; 1% SDS; 1 mg/ml proteinase K) and incubated for 1 h at 60°C. Genomic DNA was extracted with phenol (2×), phenol/chloroform (1×), chloroform/isoamylalcohol (1×) and precipitated by cold ethanol overnight. After centrifugation (12,000 × g for 5 min), the pellet was resuspended in 1 ml of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) containing 10 mg/ml RNase. The DNA again was precipitated by addition of 20% (vol:vol) of sodium acetate 3 M and 1 ml of isopropanol. The suspension was kept for 15 min at room temperature and centrifuged (12,000 × g for 30 min).

¹ Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 477, 05403-000, São Paulo, SP, Brazil.

² Depto. de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

ARTIGO 2

Este artigo descreve resultados da divergência entre sequências do ITS2 entre espécimes de mosquitos fêmeas de *Anopheles oswaldoi* capturados em 7 localidades na América do Sul. Os comprimentos dos ITS2 para todos os mosquitos variaram de 348 de 356 pares de bases. Após alinhamento, a similaridade variou entre 87 e 100%. Esta divergência está dentro do esperado para diferenças inter-específicas entre membros de complexos de espécies crípticas de anofelinos. Por conseguinte, os espécimes foram colocados em 4 grupos que podem corresponder a pelo menos 4 espécies crípticas diferentes. Uma espécie provavelmente está relacionada ao *A. oswaldoi* sensu stricto e outra ao *Anopheles konderi*. Os outros 2 grupos podem corresponder a espécies que as identificações morfológicas devem ser esclarecidas. Estes dados indicam que *A. oswaldoi* compreende um complexo de espécies crípticas e que a identificação baseada em DNA pode auxiliar a resolver questões taxonômicas relacionadas a este grupo de mosquitos.

Sequence Analysis of the Second Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae)

MAURO T. MARRELLI,¹ ROSELY S. MALAFRONTTE,^{1, 2} CARMEN FLORES-MENDOZA,³
RICARDO LOURENÇO-DE-OLIVEIRA,³ JUDITH K. KLOETZEL,² AND OSVALDO MARINOTTI¹

J. Med. Entomol. 36(6): 679-684 (1999)

ABSTRACT Sequence divergence in the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA was examined for female specimens of *Anopheles oswaldoi* Peryassu from 7 localities in South America. The lengths of ITS2 for all mosquitoes ranged from 348 to 356 nucleotides. After alignment of these sequences, similarity ranged from 87 to 100%. Divergence was within the range of inter-specific differences for members of anopheline species complexes. Therefore, specimens were placed into 4 groups that may correspond to at least 4 cryptic species. One is probably related to *An. oswaldoi* sensu stricto and another to *Anopheles konderi* Galvão & Damasceno. The other 2 groups may correspond to species for which morphological identification remains to be clarified. These data provide evidence that *An. oswaldoi* comprise a complex of cryptic species and that DNA identification may help to resolve the taxonomic questions related to this group.

KEY WORDS *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi*, cryptic species, ribosomal DNA, second internal transcribed spacer, malaria vector

COMPLEXES OF CLOSELY related species of insects present a challenge to taxonomists, because distinction of members in a complex may explain differences in ecology, vectorial capacity, and response to control measures. The *Anopheles gambiae* complex, for instance, includes both vector and nonvector species of malaria parasites (Coluzzi et al. 1979). The methods used to detect and differentiate cryptic species include mating incompatibility, morphometric analysis, polythene chromosome analysis, isoenzymes electrophoresis (Coluzzi et al. 1979, Collins et al. 1988, Rosa-Freitas et al. 1990, Coetzee et al. 1993, Foley and Bryan 1993), and DNA sequence analysis (Collins et al. 1990, Conn et al. 1993, Paskewitz et al. 1993a, b; De Merida et al. 1995).

Among the analyzed DNA sequences, ribosomal DNA has been used successfully to address taxonomic questions (Collins et al. 1987, 1989; Porter and Collins 1991; Paskewitz et al. 1993a). In insects, rDNA genes are present in tandem repeat arrays separated by intergenic spacers. Each unit contains a conserved transcribed region, within which are the genes for the 18S, 5.8S, and 28S separated by 2 internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) (Beckingham 1982).

Because rDNA spacers evolve at a faster rate than the coding sequences, these regions may distinguish closely related species that otherwise show little ge-

netic divergence (Tautz et al. 1987, Porter and Collins 1991). In mosquitoes, the ITS2 has been used to distinguish groups within closely related species, namely *An. maculipennis* complex (Porter and Collins 1991), *An. gambiae* complex (Collins et al. 1989; Paskewitz et al. 1993a), and *Culex pipiens* complex (Miller et al. 1996) and is becoming a general taxonomic tool to infer phylogenetic relationships (Wesson et al. 1992).

Differences among biting behaviors of *Anopheles oswaldoi* Peryassu captured at several localities have been reported (Rubio-Palis et al. 1992, Delgado and Rubio-Palis 1993). Furthermore, *An. oswaldoi* has been considered an important vector of malaria parasites at certain localities, whereas at others its role is secondary or unimportant (Hayes et al. 1987; Klein et al. 1991a, b; Rubio-Palis et al. 1992; Branquinho et al. 1993, 1996). These data suggest that *An. oswaldoi* may constitute a complex of cryptic species.

Klein et al. (1991a, b) found that in Rondônia, Brazil, only a very low percentage of *An. oswaldoi* females that fed on malaria patients developed salivary gland infections when compared with *An. darlingi*. In addition, *An. oswaldoi* is exophilic and zoophilic, is found more frequently in forest than peridomestic environments, and is consequently regarded as secondary or an unimportant vector in most of its territory (Lourengo-de-Oliveira et al. 1989; Oliveira-Ferreira et al. 1990; Klein et al. 1991a, b; Lourenço-de-Oliveira and Luz 1996).

In contrast, this species has been incriminated as an important malaria vector, associated with *P. vivax* 210 and 247 variant transmission in the Rio Ene Valley, Peru (Hayes et al. 1987, Need et al. 1993) as well as in localities in Venezuela (Rubio-Palis et al. 1992). In the

¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

² Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enas de Carvalho Aguiar 470, 05400-800, São Paulo, Brazil.

³ Departamento Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

ARTIGO 3

Neste artigo analisamos sequências de ITS2 de amostras de 16 espécies de *Anopheles* capturados na bacia do Amazonas, Brasil. O comprimento do ITS2 variou entre 323 e 410 pares de bases, com conteúdo GC entre 50,7% a 66,5% e a identidade das sequências variando entre 25% para 99% entre as espécies. Análise da máxima verossimilhança (*maximum-likelihood*) separou dois grupos distintos de espécies em conformidade com os reconhecidos subgêneros *Anopheles* (representado por *eiseni*, *mattogrossensis*, *mediopunctatus* e *perassui*) e *Nyssorhynchus* (representado por 12 spp.). Para este último grupo, a árvore de *neighbour-joining* gerada a partir das relações entre as sequências de ITS2 foi compatível com a chave taxonômica morfológica estabelecida para estas espécies Amazônicas: *albitarsis*, *aquasalis*, *benarrochi*, *braziliensis*, *darlingi*, *deaneorum*, *dunhami*, *evansae*, *nuneztovari*, *oswaldoi*, *rangeli* e *triannulatus*. Esses dados provaram que o ITS2 é uma ferramenta útil para a identificação das espécies e, eventualmente, para solucionar problemas taxonômicos.

Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences

M. T. MARRELLI¹, L. M. FLOETER-WINTER¹, R. S. MALAFRONTTE^{1,2},
W.P. TADEI³, R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA⁴, C. FLORES-MENDOZA⁴
and O. MARINOTTI^{1,5}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, and ²Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, ³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus, Amazonas, ⁴Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and ⁵Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, CA, U.S.A.

Abstract. Species identification of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) can be problematic because many of them belong to complexes of morphologically similar species, often with contrasted ecology, behaviour and vectorial importance. The application of DNA-based diagnostics has proved to be useful for distinguishing between such species. We determined ribosomal DNA sequences of the second internal transcribed spacer (ITS2) from samples of 16 species of *Anopheles* captured in the Amazon Basin, Brazil. Length of the ITS2 varied from 323 to 410 base pairs, with GC content ranging from 50.7% to 66.5% and sequence identity from 25% to 99% between species. Maximum-likelihood PAUP analysis separated two distinct groups of species conforming with the recognized subgenera *Anopheles* (represented by *eiseni*, *mattogrossensis*, *mediopunctatus* and *perassui*) and *Nyssorhynchus* (represented by 12 spp.). For the latter group, the neighbour-joining tree generated from rDNA sequence ITS2 relationships is compatible with the morphological taxonomic key established for these Amazonian species: *albitarsis*, *aquasalis*, *benarrochi*, *braziliensis*, *darlingi*, *deaneorum*, *dunhami*, *evansae*, *nuneztovari*, *oswaldoi*, *rangeli* and *triannulatus*. These ITS2 sequence data proved to be a useful tool for species identification and, potentially, to solve taxonomic problems.

Key words. *Anopheles*, *Nyssorhynchus*, ITS2, malaria vectors, molecular diagnostics, ribosomal DNA, second internal transcribed spacer, species identification, Amazon, Brazil.

Introduction

Malaria remains endemic throughout tropical Africa and many parts of Asia, central and South America, transmitted by anopheline mosquitoes. In Brazil, nearly all the malaria

transmission (> 99%) occurs in the Amazon Basin inhabited by almost 20 million people, representing approximately 12% of the Brazilian population. The incidence of malaria in Brazil has increased during recent years, with > 630 000 reported cases in 1999. Among the problems making it difficult to control malaria transmission in the Amazonian region are massive human migration and agricultural development, parasite resistance to antimalaria drugs, changes in behaviour of malaria vector anopheline mosquitoes and insecticide resistance (Singer & de Castro, 2001).

About 60 species of *Anopheles* are known to occur in Brazil; they are classified in five subgenera: *Stethomyia*,

Correspondence: Dr Osvaldo Marinotti, McGaugh Hall, Room 2315, Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, CA 92697–3900, U.S.A. Tel: +1 949 8243210; fax: +1 949 8242814; E-mail: omarinot@uci.edu

ARTIGO 4

Esta revisão discute o uso do marcador molecular ITS2 (segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossômico), comumente utilizado na taxonomia de mosquitos e na distinção de espécies relacionadas, em anofelinos da América Latina. Foram revisadas 178 sequências de ITS2 de anofelinos da América Latina, depositadas no *GenBank*. Entre estas, foram encontradas 105 sequências únicas correspondendo a 35 diferentes espécies. No geral, as sequências de ITS2 distinguiram as espécies de anofelinos, entretanto, informações sobre variações intra-específicas e geográficas ainda são escassas. Variações intra-específicas foram de 0,2% a 19%. Nossas análises indicaram que erros de identificação e/ou erros nas sequências podem ser os responsáveis por esta alta taxa de divergência. Vários estudos de taxonomia de anofelinos da América Latina utilizaram dados moleculares fornecidos por uma única ou poucas espécies capturadas em campo. No entanto, propomos que vários cuidados devem ser tomados e requisitos mínimos devem ser considerados na concepção de estudos adicionais. Futuros estudos neste campo devem considerar que: (1) espécimes testemunhas (*vouchers*), relacionadas às sequências de DNA, devem ser depositadas em coleções entomológicas, (2) variações intra-específicas devem ser cuidadosamente avaliadas, (3) ITS2 e outros marcadores moleculares, considerados como um grupo, fornecem informações mais confiáveis, (4) dados biológicos sobre as populações de vetores ainda são escassos e devem ser priorizados, (5) os marcadores moleculares são mais poderosos e confiáveis quando associados às ferramentas taxonômicas tradicionais.

The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - A critical review

Mauro Toledo Marrelli, Maria Anice Mureb Sallum, Osvaldo Marinotti*/*

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

*Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine McGaugh Hall, Room 2315, 92697-3900, Irvine, CA, US

Among the molecular markers commonly used for mosquito taxonomy, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the ribosomal DNA is useful for distinguishing among closely-related species. Here we review 178 GenBank accession numbers matching ITS2 sequences of Latin American anophelines. Among those, we found 105 unique sequences corresponding to 35 species. Overall the ITS2 sequences distinguish anopheline species, however, information on intraspecific and geographic variations is scarce. Intraspecific variations ranged from 0.2% to 19% and our analysis indicates that misidentification and/or sequencing errors could be responsible for some of the high values of divergence. Research in Latin American malaria vector taxonomy profited from molecular data provided by single or few field capture mosquitoes. However we propose that caution should be taken and minimum requirements considered in the design of additional studies. Future studies in this field should consider that: (1) voucher specimens, assigned to the DNA sequences, need to be deposited in collections, (2) intraspecific variations should be thoroughly evaluated, (3) ITS2 and other molecular markers, considered as a group, will provide more reliable information, (4) biological data about vector populations are missing and should be prioritized, (5) the molecular markers are most powerful when coupled with traditional taxonomic tools.

Key words: *Anopheles* - Neotropical - anophelines - malaria vectors - internal transcribed spacer 2 - ITS2 - taxonomy - systematics

ANOPHELES SIBLING SPECIES

Many anopheline mosquitoes belong to species complexes that are difficult to differentiate using morphological criteria alone. These complexes may include both malaria vectors and nonvector species, which either may occur sympatrically, or have distinct geographical distributions (Collins & Paskewitz 1996, Krzywinski & Besansky 2003, Black & Munstermann 2005). The *Anopheles gambiae* complex, as an example of an extensively studied taxonomic group, is composed of seven species, of which five are human malaria vectors. *A. gambiae* s.s. and *A. arabiensis* are both major malaria vectors in Africa, however the former feeds mostly on humans while the latter feeds on both humans and cattle. Differently, *A. quadriannulatus* species A and B, members of the same complex, are mainly cattle feeders and do not transmit human malaria (Coetzee 2006). In Asia a similar scenario occurs in which *A. minimus* s.s. and *A. varuna*, both members of the *A. minimus* complex, have distinct feeding behaviors. *A. minimus* s.s. feeds both on humans and animals, and is a major malaria vector, while *A. varuna* is essentially zoophilic

and does not play a role in *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* transmission (Kittayapong 2006). Therefore, the proper identification of malaria vectors and their sibling species, together with the mapping of their geographical distribution, is of fundamental importance for malaria control programs that depend on this information to set up their actions and to establish protocols that will result in useful epidemiological data. Actions focused on areas where malaria vector species occur, in contrast with a widespread intervention, are beneficial since the burden of malaria is primarily situated in developing countries, which have limited economic resources to invest in public health programs (Van Bortel et al. 2001, McMichael et al. 2005).

Evidences for anopheline sibling species were first discovered during the 1920s and 1930s when mosquitoes of the *A. maculipennis* complex were shown to belong to distinct species by comparative studies of their eggshell coloring patterns, feeding behaviors and mating incompatibility (Black & Munstermann 2005). Subsequently, different chromosomal forms were observed in specimens of *A. maculipennis* and these forms assigned to distinct species within the complex. While the cytogenetic approach has proven to be powerful for mosquito taxonomy [i.e. *A. maculipennis* and *A. gambiae* complexes (Frizzi 1947, 1953, Coluzzi 1966, Coetzee et al. 2000)], its application is time consuming and requires specialized skills.

Since then, researchers from around the world have pursued ways to recognize species within the various

Financial support: Fapesp (grants 05/50225-2 and 05/53973-0)

*Corresponding author: omarinot@uci.edu

Received 29 May 2006

Accepted 1 November 2006

ARTIGO 5

Este artigo analisa sequências de ITS2 de mosquitos do gênero *Culex*, um dos maiores gêneros da Tribo Culicini, que inclui vetores de vários arbovírus e filárias. Tal como os anofelinos e outros grupos de mosquitos, muitas espécies de *Culex* são morfologicamente similares, dificultando a identificação quando caracteres de fêmea adulta são utilizados. Desse modo, sequências de ITS2 de 16 espécies do gênero *Culex* e uma do gênero *Lutzia* foram clonadas para avaliar a variabilidade genômica e verificar a aplicabilidade do ITS2 em análises filogenéticas do grupo. Três a sete clones por indivíduo foram sequenciados, gerando 144 diferentes sequências de ITS2, variando de 199 a 339 pares de bases. Uma matriz de distância revelou a presença de variações intra-genômicas e intra-específicas. Devido à variabilidade intra-genômica foram selecionadas sequências de ITS2 para análise de distância baseadas em suas estruturas secundárias (similaridades >75%). A topologia foi obtida utilizando o método *neighbor-joining* com *p-distance*. Apesar da heterogeneidade observada, indivíduos das mesmas espécies foram agrupados juntos e correlacionados com a classificação atual baseada na morfologia. A topologia também corroborou com a monofilia dos subgêneros *Melanoconion* e *Microculex*. Além disso, indicou que o gênero *Culex* é parafilético em relação ao gênero *Lutzia*, e o subgênero *Culex* é parafilético uma vez que a classificação atual exclui o subgênero *Phenacomyia*. Apesar da heterogeneidade intra-genômica, o ITS2 pode ser um marcador apropriado para ser utilizado na taxonomia do gênero.

Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae)

Fabiana Tavares Vesgueiro¹, Bruna Demari-Silva¹, Rosely dos Santos Malafronte², Maria Anice Mureb Sallum¹, Mauro Toledo Marrelli^{1/+}

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública ²Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Culex is the largest genus of Culicini and includes vectors of several arboviruses and filarial worms. Many species of *Culex* are morphologically similar, which makes their identification difficult, particularly when using female specimens. To aid evolutionary studies and species distinction, molecular techniques are often used. Sequences of the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA (rDNA) from 16 species of the genus *Culex* and one of *Lutzia* were used to assess their genomic variability and to verify their applicability in the phylogenetic analysis of the group. The distance matrix (uncorrected *p*-distance) that was obtained revealed intragenomic and intraspecific variation. Because of the intragenomic variability, we selected ITS2 copies for use in distance analyses based on their secondary structures. Neighbour-joining topology was obtained with an uncorrected *p*-distance. Despite the heterogeneity observed, individuals of the same species were grouped together and correlated with the current, morphology-based classification, thereby showing that ITS2 is an appropriate marker to be used in the taxonomy of *Culex*.

Key words: Diptera - *Culex* - ITS2 - rDNA - phylogeny - concerted evolution

Culex Linnaeus is the largest genus of the Culicine with 768 species subdivided into 26 subgenera (Harbach 2011). The *Culex* genus includes species suspected of being potential vectors for filarial worms and several arboviruses, including the Venezuelan equine encephalitis virus (Weaver et al. 2004) and the West Nile virus (Turell et al. 2001). In the Americas, members of this extensive genus are subdivided into 14 subgenera. The subgenera *Melanoconion* Theobald and *Culex* Linnaeus are those of greatest epidemiological importance in the region and include most of the neotropical species. In Brazil, the Saint Louis encephalitis virus has been isolated from *Culex* (*Culex*) *coronator* Dyar and Knab and *Culex* (*Cux.*) *declarator* Dyar and Knab (Vasconcelos et al. 1991). *Culex* (*Cux.*) *quinquefasciatus* Say is the main vector for *Wuchereria bancrofti*, with active transmission in areas in the Northeast of Brazil (Fontes et al. 1998, 2005). Despite the medical importance of some species of the genus *Culex* and the great discomfort they cause, little progress has been made in the taxonomy and systematics of the genus. Most *Culex* mosquito research focuses on the epidemiology of arboviruses and potential vectors (Turell et al. 2001, Weaver et al. 2004) and on the control of species that transmit pathogens to humans

and other vertebrates (Regis et al. 1995, Melo et al. 2009).

The taxonomic history of *Culex* demonstrates the complexity of the group and the difficulty in differentiating its species using traditional morphological criteria alone. The morphological identification of these mosquitoes is difficult because many species of *Culex* are morphologically similar (Bram 1967, Williams & Savage 2009). Furthermore, some *Culex* species belong to species complexes (Smith & Fonseca 2004), there are hybrid forms (Humeres et al. 1998, Smith & Fonseca 2004) and intraspecific variations in established diagnostic characteristics are frequently reported (Rey et al. 2006). Lastly, field-collected adult specimens often lack ornamentation characteristics, making their identification difficult based on morphology alone (Knight & Nayar 2004). There are few taxonomic studies for groups of *Culex*. In Bram's (1967) revision of neotropical species of *Culex* and the subgenus *Culex*, a description of a new species, a re-description of several species and identification keys for the male genitalia and fourth instar larval characteristics are included. In another study, Tanaka (2003) elevated the subgenus *Lutzia* Theobald to the status of genus of the Culicine tribe.

Accurate species identification is fundamental for ecological, biological and epidemiological studies. Diagnosis based on traditional methods, including the external structures of the male genitalia, allows for initial identification that can be further tested using molecular techniques. Thus, many species previously considered unique and homogeneous turn out to consist of other isomorphic forms (Forattini 2002). Ribosomal DNA (rDNA) sequences have been used widely in mosquito taxonomy and phylogenetic analyses (Walton et al. 1999, Sallum et al. 2002, Marrelli et al. 2005). Due

Financial support: FAPESP (05/50225-2 for MTM and 05/53973-0), CNPq (BPP 300351/2008-9 to MAMS)

FTV was a Master's student supported by CAPES.

+ Corresponding author: mmarelli@usp.br

Received 23 April 2010

Accepted 4 November 2010

ARTIGO 6

Os resultados apresentados nesse artigo referem-se a análises de sequências de nucleotídeos que correspondem a um fragmento de 478 pares de bases do gene COI (subunidade 1 do citocromo c oxidase), incluindo parte da região do *barcoding*, de 37 indivíduos de 17 espécies do gênero *Culex*. Estas sequências foram geradas para estabelecer a relação entre 5 subgêneros: *Culex*, *Phenacomyia*, *Melanoconion*, *Microculex* e *Carrollia*, e uma espécie do gênero *Lutzia*, que ocorrem no Brasil. Métodos Bayesianos foram empregados nas análises filogenéticas. Resultados das comparações entre as sequências mostraram que indivíduos identificados como *Culex dolosus*, *Culex mollis* e *Culex imitator* tiveram uma divergência intra-específica muito alta (3,1%, 2,3% e 3,5%, respectivamente) utilizando Kimura Dois Parâmetros (K2P). Estas diferenças foram associadas tanto a diferenças nos caracteres da genitália masculina, como nos estágios de larvas e pupas, sugerindo que podem representar complexos de espécies. A topologia da árvore bayesiana sugeriu que o gênero e subgênero *Culex* são parafiléticos em relação a *Lutzia* e a *Phenacomyia*, respectivamente. O gene COI pode ser uma ferramenta útil para estimar as relações filogenéticas e identificar espécies morfologicamente similares do gênero *Culex*.

POPULATION BIOLOGY/GENETICS

Taxonomic and Phylogenetic Relationships Between Species of the Genus *Culex* (Diptera: Culicidae) From Brazil Inferred From the Cytochrome *c* Oxidase I Mitochondrial Gene

AQ:1

BRUNA DEMARI-SILVA, FABIANA TAVARES VESGUEIRO, MARIA ANICE MUREB SALLUM,
AND MAURO TOLEDO MARRELLI¹

AQ:2

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo,
Av. Drive. Arnaldo 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brazil

J. Med. Entomol. 48(2): 000–000 (2011); DOI: 10.1603/ME09293

ABSTRACT Species of the genus *Culex* Linnaeus have been incriminated as the main vectors of lymphatic filariases and are important vectors of arboviruses, including West Nile virus. Sequences corresponding to a fragment of 478 bp of the cytochrome *c* oxidase subunit I gene, which includes part of the barcode region, of 37 individuals of 17 species of genus *Culex* were generated to establish relationships among five subgenera, *Culex*, *Phenacomyia*, *Melanoconion*, *Microculex*, and *Carrollia*, and one species of the genus *Lutzia* that occurs in Brazil. Bayesian methods were employed for the phylogenetic analyses. Results of sequence comparisons showed that individuals identified as *Culex dolosus*, *Culex mollis*, and *Culex imitator* possess high intraspecific divergence (3.1, 2.3, and 3.5%, respectively) when using the Kimura two parameters model. These differences were associated either with distinct morphological characteristics of the male genitalia or larval and pupal stages, suggesting that these may represent species complexes. The Bayesian topology suggested that the genus and subgenus *Culex* are paraphyletic relative to *Lutzia* and *Phenacomyia*, respectively. The cytochrome *c* oxidase subunit I sequences may be a useful tool to both estimate phylogenetic relationships and identify morphologically similar species of the genus *Culex*.

AQ:3

KEY WORDS *Culex*, *Lutzia*, *Phenacomyia*, taxonomy, phylogeny, COI, species complex

Species of the genus *Culex* Linnaeus are the main vectors of lymphatic filariases and several New World arboviruses, including West Nile virus. Furthermore, they are often the most common mosquitoes feeding on humans in urban areas (Fonseca et al. 2004, Kasai et al. 2008). In addition to their importance in the transmission of these pathogens, the genus contains pest species that decrease quality of life and cause economic devaluation and reduction in work efficiency (Forattini 2002).

The genus *Culex* belongs to the tribe Culicini, which includes three other genera: *Galindomyia* Stone & Barreto, *Deinocerites* Adames (both Neotropical taxa), and *Lutzia* Tanaka. *Culex* comprises 763 valid species subdivided into 23 subgenera. The monophyly of the Culicini has never been questioned; however, like other large genera, the *Culex* includes many polymorphic features and exceptional forms (Harbach 2007). Currently, there are 14 valid subgenera in the Neotropical region, as follows: *Allimanta*, *Belkinomyia*, *Culex*, *Microculex*, *Carrollia*, *Phenacomyia*, *Phytotelmatomyia*, *Melanoconion*, *Micraedes*, *Anoediopora*,

Aedinus, *Neoculex*, *Nicaromyia*, and *Tinolestes*. The *Melanoconion* Theobald and *Culex* Linnaeus are the major subgenera (Forattini 2002). Despite being one of the major genera in the Culicidae, both taxonomy and the phylogenetic relationships within the genus *Culex* are poorly known (Miller et al. 1996).

Differentiation of *Culex* species based only on morphological characteristics of the female is difficult, and often for accurate species identification it is necessary to examine characters of the male genitalia and immature stages. A variety of molecular techniques such as several diagnostic polymerase chain reaction (PCR) assays, allozyme analyses, and restriction fragment-length polymorphism analysis of PCR products has been developed to differentiate species in this genus, with special focus on species of the *Culex pipiens* complex (Cabtree et al. 1995, Urbanelli et al. 1997, Smith and Fonseca 2004, Sanogo et al. 2007, Harrington and Poulson 2008). Nevertheless, taxonomy of species of the *Cx. pipiens* complex remains controversial, and the phylogenetic relationships within the *Culex* are poorly understood (Harbach 2007).

Mitochondrial DNA has commonly been used for molecular evolutionary studies, mostly in arthropods (Herbert et al. 2003). The cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene is the largest and the most con-

¹ Corresponding author: Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Drive. Arnaldo 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brazil (e-mail: mmarelli@usp.br).

ARTIGO 7

Neste artigo caracterizamos geneticamente e analisamos a morfometria das asas de seis populações distintas de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*. A caracterização molecular foi feita por PCR da região polimórfica do segundo intron do gene nuclear acetilcolinesterase. Os tamanhos dos centróides foram significativamente diferentes entre algumas localidades geográficas. Os valores médios de R_2/R_{2+3} diferiram significativamente entre as populações. No geral, o formato das asas, representados pelos caracteres morfométricos, pode ser dividido em dois agrupamentos principais. Nossos resultados sugerem que as amostras do Brasil são morfologicamente e geneticamente distintas das amostras da Argentina, e também indicam uma distinção morfológica entre populações do Norte e Sul do Brasil. Nós sugerimos que a morfometria das asas pode ser utilizada para uma avaliação preliminar da estrutura populacional do *Cx. quinquefasciatus* no Brasil

Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina

Sirlei Antunes de Morais¹, Camila Moratore^{2,3}, Lincoln Suesdek^{2,3}, Mauro Toledo Marrelli^{1/+}

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública ²Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ³Seção de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

Variation among natural populations of Culex (Culex) quinquefasciatus Say is associated with different vectorial capacities. The species Cx. quinquefasciatus is present in the equatorial, tropical and subtropical zones in the Brazilian territory, with intermediate forms between Cx. quinquefasciatus and Culex pipiens occurring in regions of latitudes around 33°-35°S. Herein, we studied geographically distinct populations of Cx. quinquefasciatus by genetic characterization and analysis of intra-specific wing morphometrics. After morphological analysis, molecular characterization of Cx. quinquefasciatus and intermediate forms was performed by polymerase chain reaction of the polymorphic nuclear region of the second intron of the acetylcholinesterase locus. Additionally, the morphology of adult female wings collected from six locations was analyzed. Wing centroid sizes were significantly different between some geographical pairs. Mean values of R_2/R_{2+3} differed significantly after pairwise comparisons. The overall wing shape represented by morphometric characters could be divided into two main groupings. Our data suggest that Brazilian samples are morphologically and genetically distinct from the Argentinean samples and also indicated a morphological distinction between northern and southern populations of Brazilian Cx. quinquefasciatus. We suggest that wing morphology may be used for preliminary assessment of population structure of Cx. quinquefasciatus in Brazil.

Key words: *Culex pipiens* complex - *Culex quinquefasciatus* - clines - molecular identification - wing morphology

The *Culex (Culex) pipiens* complex in the Americas is composed of two main species, *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, which is adapted to tropical zones and *Cx. pipiens* L., which is found in temperate zones. In intermediate areas, these two members can mate yielding hybrids and intermediate forms (Barr 1957), through the processes of gene flow and introgression (Humeres et al. 1998, McAbee et al. 2008, Kothera et al. 2009). Mosquitoes of the *Cx. pipiens* complex are potential vectors of filarid worms in tropical and subtropical areas (Böckarie et al. 2009) and diverse arboviruses, including West Nile virus (Apperson et al. 2004, Cook et al. 2006).

Adult females and immature stages of the *Cx. pipiens* complex are morphologically similar. The differentiation of adult males can be made by analysis of genitalia, which includes measuring the DV/D ratio of the dorsal arms of the aedeagus in the phallosome, as reported by Sundararaman (1949). Because members of the *Cx. pipiens* complex have a broad geographical distribution, other phenotypical differences beyond those of the male genitalia can be found. For example, some wing characters can also been used for morphologic identification of mosquito species.

The taxonomic keys compiled by Forattini (2002) compared wing morphology of adult females. In that report, the subcosta vein (Sc) was reported to bind with the costa vein (C) before the bifurcation of the radial₂₊₃ vein (R_{2+3}) in *Cx. quinquefasciatus*, whereas in *Cx. pipiens*, the Sc vein binds to vein C at the same point or beyond the R_{2+3} bifurcation. To our knowledge, these findings have not been investigated in other geographically distant populations.

Linam and Nielsen (1962) reported that Bekku (1956), in Northern Japan, also attempted to use wing characteristics [the length of radial cell R_2 (second marginal cell) divided by the length of vein R_2] to distinguish adults of the *pipiens* group. The results of Bekku (1956) were inconclusive, which was later explained when Kamura (1958) found that these particular wing measurements varied with the temperature of the environment. Nielsen and Rees (1961) and Linam and Nielsen (1962) reported that the most reliable method of separating females of *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* was by a wing measurement value obtained by dividing the length of the cell R_2 by the length of the vein R_{2+3} (R_2/R_{2+3} ratio). These authors reported the value of this ratio to be about 5.0 in *Cx. pipiens* and 3.0 or less in *Cx. quinquefasciatus*, with intermediate values present in the hybrids. However, these studies did not evaluate morphometric data among mosquito populations and climatic/geographic gradients.

In insects, the phenotypic variations among members of species complexes have been intensely investigated, especially those concerning the size and shape of adult wings (James & Partridge 1998, Morin et al. 1999). In *Drosophila*, which has a worldwide distribution, significant morphometric wing variations were found in

Financial support: FAPESP (05/50225-2, 06/02622-5)

SAM and CM contributed equally to this work (FAPESP 06/57272-9 and 07/1665-5, respectively).

+ Corresponding author: mmarelli@usp.br

Received 24 November 2009

Accepted 29 April 2010

ARTIGO 8

Devido ao problema de ineficácia das formas químicas de controle de mosquitos vetores, novas estratégias de controle têm sido desenvolvidas. Desse modo, esta revisão discute as estratégias de controle genético de populações de mosquitos vetores baseada na técnica do inseto estéril. Uma delas consiste na liberação de machos esterilizados por radiação, a outra, na integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico de fêmeas imaturas. Entre as vantagens sobre outras técnicas biológicas e químicas de controle de vetores estão: facilidade de manutenção da colônia, separação entre machos e fêmeas, baixo custo de produção e alta eficácia. Esta técnica promissora poderá ser uma importante ferramenta do manejo integrado de vetores.

André Barreto Bruno Wilke^I
Almério de Castro Gomes^{II}
Delsio Natal^{II}
Mauro Toledo Marrelli^{II}

^I Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública (FSP). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil

^{II} Departamento de Epidemiologia. FSP-USP. São Paulo, SP, Brasil

Correspondence:
Mauro Toledo Marrelli
Departamento de Epidemiologia
Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira Cesar
01246-904 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: mmarelli@usp.br

Received: 8/19/2008
Revised: 12/3/2008
Approved: 1/28/2009

Control of vector populations using genetically modified mosquitoes

ABSTRACT

The ineffectiveness of current strategies for chemical control of mosquito vectors raises the need for developing novel approaches. Thus, we carried out a literature review of strategies for genetic control of mosquito populations based on the sterile insect technique. One of these strategies consists of releasing radiation-sterilized males into the population; another, of integrating a dominant lethal gene under the control of a specific promoter into immature females. Advantages of these approaches over other biological and chemical control strategies include: highly species-specific, environmentally safety, low production cost, and high efficacy. The use of this genetic modification technique will constitute an important tool for integrated vector management.

DESCRIPTORS: Mosquitoes, genetics. Animals, Genetically Modified, parasitology. Genetic Techniques, utilization. Mosquito Control. Review.

INTRODUCTION

We carried out a literature review in order to collect information on alternative forms of vector control, focusing on mosquitoes of the *Anopheles* and *Aedes* genera. A search in the PubMed basis was carried out using the following descriptors: Culicidae, (including *Anopheles*, *Aedes*); Vectors AND Control; Mosquitoes AND Transgenic; Mosquitoes AND SIT; Mosquitoes AND RIDL; Culicidae AND Control; Culicidae AND SIT; Culicidae AND RIDL. In addition, books, theses and government websites were consulted.

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) have been the subject of intense study since the late 19th Century, when they were first linked to the transmission of pathogens to man and other vertebrates. The *Anopheles*, *Culex*, and *Aedes* genera include vectors for the three major groups of human pathogens: parasites of the *Plasmodium* genus, which cause malaria; filariae of the *Wuchereria* and *Brugia* genera; and a variety of arboviruses, including the causing agents of dengue and yellow fever.²⁴

In the last century, during the 1950's and 60's, vector control programs in many countries were based on chemical strategies that made unrestricted use of insecticides such as DDT. These measures led to the successful eradication malaria from Southeastern Europe and Taiwan, and reduced the morbidity rate in India from roughly 75 million to about 100 thousand cases per year.⁷ Prior to this effort, pyrethroid-based insecticides were intensely used in the 1930's to fight *Anopheles gambiae*, leading to the eradication of this species from Northeastern Brazil. Furthermore, the fight against *Aedes aegypti*, which in 1956 was considered as eradicated in Brazil, was based on an active search for potential breeding sites for this mosquito.⁹

ARTIGO 9

Esta revisão aborda os avanços recentes na estratégia genética de controle de mosquitos que promete controlar o *Aedes aegypti* e tem potencial para ser aplicada a muitas outras espécies de mosquitos. Esta técnica é baseada na técnica de inseto estéril (SIT), que usa a liberação maciça de insetos estéreis em uma área de controle de pragas, sendo um método altamente eficaz e ambientalmente seguro. Várias abordagens genéticas foram propostas para aprimorar a técnica SIT para os mosquitos desde o início da década de 1950. Usando mutações induzidas, rearranjos cromossômicos, reprodução e seleção, os pesquisadores foram capazes de encontrar caracteres de resistência a inseticidas, que são sexo-específicos. Infelizmente, a seleção de tais caracteres é muito trabalhosa e pode levar décadas para alcançar um resultado com sucesso. Além disso, este processo é geralmente associado a reduções severas no *fitness* dos insetos. Embora vários estudos e programas de controle desenvolveram técnicas para a criação em massa de mosquitos, eficientemente separar os machos, esterilizar, distribuir e obter um controle local, nenhum controle em larga escala de mosquitos utilizando a SIT está sendo atualmente executada. O advento da biotecnologia moderna disponibilizou uma ampla variedade de ferramentas para manipular e expressar genes em mosquitos com facilidade e a curto prazo, com uma vasta gama de fenótipos acessíveis que não era possível através da genética clássica.

Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations

André Barretto Bruno Wilke¹, Derric David Nimmo², Oliver St John², Bianca Burini Kojin³,
Margareth Lara Capurro³, Mauro Toledo Marrelli^{1*}

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brazil

²Oxitec Ltd, 71 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire, OX14 4RX, UK

³Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brazil

Received 2 April 2009 / Accepted 30 June 2009

Abstract. The Sterile Insect Technique (SIT) uses the mass release of sterile insects as a highly effective area-wide, environmentally safe method of pest control. Various uses of genetics to enhance the sterile insect technique for mosquitoes have been proposed since the early 1950's. Using induced mutations, chromosomal rearrangements, breeding and selection researchers were able to develop traits such as sex-specific insecticide resistance and hybrid sterility. Unfortunately, selection of such traits is very laborious and can take decades to achieve. In addition this process is usually associated with severe reductions in fitness. Although several studies and control programs developed techniques to rear mosquitoes in large numbers, efficiently sort males, sterilize, distribute, and achieve localized control no large scale control of mosquitoes using SIT is currently being performed. The advent of modern biotechnology has made available a wide variety of tools to manipulate and express genes within mosquitoes on shorter time scales and with a wider range of accessible phenotypes than is possible through classical genetics. This mini review looks at a recent advance in mosquito control that promises to control *Aedes aegypti* and has the potential to be applied to many other mosquito species.

Keywords: RIDL, transgenic, sterile insect technique, SIT, mosquito, mass rearing

INTRODUCTION

The mosquitoes (Diptera: Culicidae) have been intensely studied since the end of the 1800's when their participation in the transmission of several pathogens to humans and other vertebrates had been discovered for the first time. In 1877, Manson discovered that the disease known as elephantiasis was caused by a filarial worm and transmitted by mosquitoes of *Culex* genus, which was the first demonstration that mosquitoes transmit diseases (Chernin, 1977). From this moment on, the role of other mosquitoes as vectors of agents causing diseases, such as malaria, dengue and yellow fever, was proven (Taïpe-Lagos and Natal, 2003).

In the 1950's and 60's the official programs of vector control in many countries used chemical strategies such as DDT and Paris Green combined with breeding site removal and personal protection such as bednets. This successfully eradicated malaria in southern Europe and Taiwan and reduced its morbidity in India from about 75 million to about 100,000 a year (Marchi and Munstermann, 1987; Liang, 1991). DDT was also used against *Anopheles gambiae* in the 1930's, when this species was eradicated from Northeastern Brazil (Parmakelis *et al.* 2008). In Brazil, the fight against *Aedes aegypti* was also initially a success with the mosquito being eradicated in 1956. This remarkable achievement was

due to rigorously enforced removal of all potential breeding sites and intensive insecticide spraying. The subsequent increase in epidemics of Dengue from the 1980's to today have been caused by the re-infestation of *Aedes aegypti* and the relaxing of control measures. However, the application of the same control strategies applied in the 1950's was unsuccessful (Axtell and Arends, 1990). This was mainly due to less rigorous enforcement, inappropriate application of insecticides and the development of insecticide resistance. The use of chemical strategies in vector control around the World is problematic and largely ineffective with issues such as environmental contamination, effects on non-target organisms and the selection of resistance hampering its effectiveness (Dorta *et al.*, 1993).

Many developing countries, such as Brazil, have had large urbanization projects but without proper implementation of sanitation services. This recent expansion has increased the release of untreated effluents into the environment subsequently increasing the availability of breeding sites for a variety of mosquito species. The mosquito *Culex quinquefasciatus*

* Author for correspondence:

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brazil. Telephone: 55-11-30617922, Fax: 55-11-3082-2920. Email: mmarelli@usp.br

ARTIGO 10

Esta revisão discute os possíveis custos do transgene no *fitness* dos mosquitos transformados. A geração de mosquitos transgênicos com um mínimo de efeito no *fitness* é um pré-requisito para o sucesso de estratégias de controle de doenças transmitidas por vetores utilizando insetos transgênicos. É importante reunir o máximo de informações possíveis neste assunto, pois estimativas realistas do efeito do transgene no *fitness* destes são essenciais para o planejamento de estratégias de liberação. Os mosquitos transgênicos devem apresentar um mínimo de custo no *fitness*, uma vez que tais efeitos podem reduzir a eficácia de um mecanismo genético (*drive mechanism*) utilizado para introduzir o transgene nas populações de mosquitos em campo. Vários fatores podem afetar o *fitness* dos mosquitos transgênicos, incluindo o efeito negativo em potencial do produto do transgene e o efeito mutagênico da inserção destes. São necessários ainda muitos estudos para avaliação do *fitness* dos mosquitos transgênicos em campo (não somente em laboratório).

Mosquito transgenesis: what is the fitness cost?

Mauro T. Marrelli^{1*}, Cristina K. Moreira^{1*}, David Kelly^{2,3*}, Luke Alphey^{2,3} and Marcelo Jacobs-Lorena¹

¹Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health Department of Molecular Microbiology and Immunology and Malaria Research Institute, 615 North Wolfe St, Baltimore, MD 21205, USA

²Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, UK, OX1 3PS

³Oxitec Ltd, 71 Milton Park, Oxford, UK, OX14 4RX

The generation of transgenic mosquitoes with a minimal fitness load is a prerequisite for the success of strategies for controlling mosquito-borne diseases using transgenic insects. It is important to assemble as much information as possible on this subject because realistic estimates of transgene fitness costs are essential for modeling and planning release strategies. Transgenic mosquitoes must have minimal fitness costs, because such costs would reduce the effectiveness of the genetic drive mechanisms that are used to introduce the transgenes into field mosquito populations. Several factors affect fitness of transgenic mosquitoes, including the potential negative effect of transgene products and insertional mutagenesis. Studies to assess fitness of transgenic mosquitoes in the field (as opposed to the laboratory) are still needed.

Genetic manipulation of mosquitoes for disease control

Mosquitoes are vectors of serious human infectious diseases, such as malaria, dengue and yellow fever. From the 1950s to the 1970s there was considerable optimism that such diseases could be controlled or even eradicated by the use of insecticides and drugs. However, these expectations were not realized, in part because of increasing mosquito resistance to insecticides, parasite resistance to drugs and slow progress in vaccine development. Genetic modification of mosquitoes has been proposed as an alternative strategy for disease control [1–3].

Control at the level of the insect vector can be divided into two broad categories. The first is the genetic modification of mosquito populations, which could be achieved by the release of transgenic mosquitoes carrying genes whose products impair pathogen development. This approach requires the use of a special genetic system capable of spreading the anti-pathogen gene of interest through a target vector population. Such genetic drive mechanisms have not yet been realized; various molecular systems, for example, transposable elements, have been proposed as the basis for such a system [4]. The second is population suppression, which could be achieved by use of the sterile

insect technique (SIT) [5] in conjunction with a technology known as ‘release of insects carrying a dominant lethal’ (RIDL) [6]. In RIDL, insects are transformed with a transgene whose product suppresses offspring production, leading to a decrease of the vector population.

The prospect of using transgenic mosquitoes is rapidly gaining strength, owing to the identification of transposable elements for mosquito germ line transformation, the finding of suitable transformation markers such as fluorescent proteins [7], the standardization of microinjection techniques [8–10], the characterization of promoters that can drive the expression of foreign genes in a tissue- and stage-specific manner [11–15] and the identification and characterization of effector molecules that can interfere with the development of parasites in the invertebrate host. Effector molecules include naturally occurring or synthetic antimicrobial peptides, antibodies against parasite or mosquito midgut proteins and proteins with toxic or inhibitory effects [16–27], or molecules that can interfere with the development of the invertebrate host itself [28].

One crucial issue that needs to be considered before the release of genetically manipulated organisms is the fitness of the mosquitoes carrying the transgene. This is because the transgenic insects must compete effectively with the local populations to efficiently introgress the effector genes into the wild gene pool. Fitness can be defined as the relative success with which a genotype transmits its genes to the next generation. It has two major components, survival and reproduction, and can be evaluated by analyzing several parameters, such as fecundity, fertility, larval biomass productivity, developmental rate, adult emergence, male ratio, and mating competitiveness. Additional factors that can reduce fitness are inadequate mass rearing conditions, inbreeding and hybridization with mosquitoes of different genetic backgrounds. Other issues, such as drive mechanisms, have been reviewed elsewhere (e.g. Refs [3,4]). Here, we focus on the possible fitness costs of transgenesis and draw some lessons for future studies of fitness of genetically manipulated mosquitoes.

Potential fitness costs of transgenesis

The potential fitness impact of transposon-mediated transgenesis can be broadly divided into the negative

Corresponding author: Jacobs-Lorena, M. (mlorena@jhsp.edu).

* These authors contributed equally to this publication.

Available online 24 March 2006

ARTIGO 11

Resultados anteriores do grupo do Dr. Marcelo Jacobs-Lorena mostraram que mosquitos transgênicos que expressam o peptídeo SM1 no lúmen do trato digestivo são refratários à transmissão do *Plasmodium berghei*. Neste presente trabalho, nossos experimentos mostram que estes mosquitos transgênicos são mais aptos (apresentando maior fecundidade e menor taxa de mortalidade) quando comparados com mosquitos não transgênicos, mas somente quando alimentados com camundongos infectados com *P. berghei*. Em experimentos de seguimento em gaiolas, os mosquitos transgênicos gradualmente substituíram os não transgênicos quando mantidos alimentados com camundongos infectados com cepa de *P. berghei* produtora de gametócitos (ANKA 2.34), mas não quando alimentados em camundongos infectados com cepa que não produz gametócitos (cepa ANKA 2.33). Estes resultados sugerem que quando aumentados com sangue infectado com *Plasmodium*, os mosquitos transgênicos tem uma vantagem seletiva sobre os não transgênicos. Esta vantagem no *fitness* tem importantes implicações para definir estratégias de controle da malária utilizando mosquitos geneticamente modificados.

Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood

Mauro T. Marrelli*, Chaoyang Li†, Jason L. Rasgon, and Marcelo Jacobs-Lorena*

Department of Molecular Microbiology and Immunology, Bloomberg School of Public Health and Malaria Research Institute, The Johns Hopkins University, 615 North Wolfe Street, Baltimore, MD 21205

Edited by Anthony A. James, University of California, Irvine, CA, and approved February 21, 2007 (received for review November 4, 2006)

The introduction of genes that impair *Plasmodium* development into mosquito populations is a strategy being considered for malaria control. The effect of the transgene on mosquito fitness is a crucial parameter influencing the success of this approach. We have previously shown that anopheline mosquitoes expressing the SM1 peptide in the midgut lumen are impaired for transmission of *Plasmodium berghei*. Moreover, the transgenic mosquitoes had no noticeable fitness load compared with nontransgenic mosquitoes when fed on noninfected mice. Here we show that when fed on mice infected with *P. berghei*, these transgenic mosquitoes are more fit (higher fecundity and lower mortality) than sibling nontransgenic mosquitoes. In cage experiments, transgenic mosquitoes gradually replaced nontransgenics when mosquitoes were maintained on mice infected with gametocyte-producing parasites (strain ANKA 2.34) but not when maintained on mice infected with gametocyte-deficient parasites (strain ANKA 2.33). These findings suggest that when feeding on *Plasmodium*-infected blood, transgenic malaria-resistant mosquitoes have a selective advantage over nontransgenic mosquitoes. This fitness advantage has important implications for devising malaria control strategies by means of genetic modification of mosquitoes.

malaria control | genetic modification | gene drive

The use of genetically modified mosquitoes refractory to pathogen transmission is a potential strategy for controlling vector-borne diseases (1–4). In the past few years, important technical advances, including germ-line transformation of mosquitoes, the characterization of tissue-specific promoters, and the identification of molecules that interfere with parasite development (effector molecules), have led to the generation of transgenic mosquitoes that are impaired in their capacity to transmit the malaria parasite (1, 5). However, although the feasibility of genetically modifying mosquito vector competence has been demonstrated in the laboratory, we do not yet know how transgenes can be introgressed into mosquito populations in the field. Several possible approaches have been proposed (transposable elements, *Wolbachia*, and meiotic drive), but success of any mechanism will depend in part on the fitness load that is imposed by the presence of the transgene.

Previous studies suggested that transgenic mosquitoes are less fit than wild type (WT) (6, 7). Catteruccia *et al.* (6) found that *Anopheles stephensi* homozygous transgenic lines have lower fitness compared with WT, and Irvin *et al.* (7) reached similar conclusions with transgenic lines of *Aedes aegypti*. However, these studies could not distinguish fitness effects due to the transgene itself versus insertion-site effects and/or inbreeding depression (8). In a separate study, Moreira *et al.* (2) demonstrated that hemizygous transgenic mosquitoes expressing the SM1 dodecapeptide under the control of the blood-inducible carboxypeptidase promoter were as fit as WT controls when fed on blood of noninfected mice.

Plasmodium and other pathogens, even in low numbers, are known to decrease the fertility of their insect hosts [reviewed by

Hurd (9)]. Accordingly, we hypothesized that when fed on *Plasmodium*-infected blood, transgenic mosquitoes expressing antiparasite genes would be more fit than WT on account of their reduced parasite prevalence. To investigate the validity of this premise, cage-invasion experiments were performed in which a starting population of equal numbers of WT and SM1-transgenic *A. stephensi* mosquitoes were maintained on *P. berghei*-infected blood. We found that when fed on *Plasmodium*-infected blood, the transgenic malaria-resistant mosquitoes had a significant fitness advantage over WT.

Results and Discussion

Previous experiments had shown that when transgenic and nontransgenic mosquitoes are fed noninfected blood, Hardy–Weinberg equilibrium (44% transgenic/56% WT mosquitoes; Fig. 1, neutral line) is reached and maintained after the second generation (2). In contrast, in the present experiments, when mosquitoes were fed *Plasmodium*-infected blood, transgenic mosquito frequency reached $\approx 70\%$ by the ninth generation and remained relatively constant thereafter (Fig. 1, experiments 1–3). One possible explanation for this plateau is that the transgene exhibits overdominance; i.e., there is a cost (discussed below) associated with being homozygous for the transgene, and thus the hemizygote has higher fitness than either the homozygote or the WT. This hypothesis is supported by the observation that in the last generation of the cage-invasion experiments, a significantly higher frequency of transgenic hemizygotes (and a corresponding lower frequency of homozygotes) was observed than would be expected by chance ($\chi^2 = 7.57$, $df = 2$, $P = 0.023$; data not shown).

Additional cage-invasion experiments were conducted in which mosquito feeding was switched in generation 4 or 5 from blood containing gametocyte-producing parasites (ANKA 2.34) to blood containing a gametocyte-deficient parasite strain (ANKA 2.33). The latter parasites multiply normally in the mammalian host but do not develop in the mosquito. Transgene frequency did not increase after the switch (Fig. 1, experiments 4 and 5), indicating that it was parasite development in the mosquito and not the presence of asexually dividing parasites or factors produced by the mammalian host that affected mosquito fitness.

Author contributions: M.T.M. and C.L. contributed equally to this work; M.T.M., C.L., and M.J.-L. designed research; M.T.M. and C.L. performed research; M.T.M., C.L., J.L.R., and M.J.-L. analyzed data; and M.T.M., C.L., J.L.R., and M.J.-L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

*Present address: Department of Epidemiology, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

†Present address: Department of Pathology, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: mlorena@jhsp.edu.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

ARTIGO 12

Este trabalho avalia o *fitness* de três linhagens de mosquitos transgênicos utilizando análise de tabela de vida e experimentos de competição entre transgênicos e não transgênicos. As três linhagens de *Anopheles stephensi* foram geradas expressando o peptídeo SM1 sob controle de promotor de vitelogenina, inibindo a transmissão do parasita *Plasmodium berghei*, causador da malária em camundongos. Análise da tabela de vida indicou um baixo custo no *fitness* para duas inserções únicas do transgene SM1 nas linhagens VD35 e VD26, e nenhum custo para inserções duplas na linhagem VD9. Entretanto, em experimentos de seguimento em gaiolas, onde cada uma das três linhagens, que são homozigotas para o transgene, foi misturada com mosquitos não transgênicos, a frequência do transgene diminuiu com o tempo. Experimentos sugerem que a redução na frequência do transgene é consequência de um reduzido sucesso no cruzamento, reduzida capacidade de reprodução, e/ou efeito mutagênico da inserção do transgene no genoma do mosquito, e não devido ao efeito do próprio transgene. Desse modo, para uma linhagem de mosquitos transgênicos ser liberada em campo e efetivamente reduzir a transmissão de uma doença, um mecanismo genético de introdução do gene (*driving mechanism*) deve ser requerido.

Fitness of Transgenic *Anopheles stephensi* Mosquitoes Expressing the SMI Peptide under the Control of a Vitellogenin Promoter

CHAOYANG LI*, MAURO T. MARRELLI*, GUIYUN YAN, AND MARCELO JACOBS-LORENA

From the Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health, Department of Molecular Microbiology and Immunology and Malaria Research Institute, 615 North Wolfe Street, Baltimore MD 21205 (Li, Marrelli, Yan, and Jacobs-Lorena). Chaoyang Li is now at the Case Western Reserve University, Cleveland, OH; Mauro T. Marrelli is at the Epidemiology Department, Faculdade de Saúde Pública, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and Guiyun Yan is now at the Program in Public Health, College of Health Sciences University of California, Irvine, CA 92697-4050.

*Chaoyang Li and Mauro T. Marrelli contributed equally to this work.

Address correspondence to M. Jacobs-Lorena at the address above, or e-mail: mlorena@jhsph.edu.

Abstract

Three transgenic *Anopheles stephensi* lines were established that strongly inhibit transmission of the mouse malaria parasite *Plasmodium berghei*. Fitness of the transgenic mosquitoes was assessed based on life table analysis and competition experiments between transgenic and wild-type mosquitoes. Life table analysis indicated low fitness load for the 2 single-insertion transgenic mosquito lines VD35 and VD26 and no load for the double-insertion transgenic mosquito line VD9. However, in cage experiments, where each of the 3 homozygous transgenic mosquitoes was mixed with nontransgenic mosquitoes, transgene frequency of all 3 lines decreased with time. Further experiments suggested that reduction of transgene frequency is a consequence of reduced mating success, reduced reproductive capacity, and/or insertional mutagenesis, rather than expression of the transgene itself. Thus, for transgenic mosquitoes released in the field to be effective in reducing malaria transmission, a driving mechanism will be required.

Materials and Methods

Over 3 billion people live under the threat of malaria worldwide. Malaria causes a mortality of over 1 million people each year (World Malaria Report 2005). This underscores the urgent need to develop new tools to fight the disease. The mosquito is the obligatory vector of *Plasmodium*, the causative agent of malaria. After the mosquito ingests an infected blood meal, the parasites undergo complex sporogonic development that includes invasion of 2 epithelia (midgut and salivary gland). Transmission occurs when the mosquito bites another person and inoculates sporozoites stored in the salivary gland. To control malaria transmission, early efforts have been focusing on the genetics of naturally resistant mosquitoes. The advent of mosquito germ line transformation made the creation of transgenic mosquitoes impaired in malaria transmission a reality (Ito et al. 2002; Moreira et al. 2002). The next major challenge is to devise means to introduce and spread the transgenes that confer refractoriness into

wild mosquito populations. To assess the feasibility of this strategy, it will be crucial to determine whether the transgene imposes a fitness load on the mosquito and use this information to design gene-driving strategies (Boete and Koella 2002; Scott et al. 2002; Sinkins and Gould 2006).

It has been proposed that transgenic organisms are less fit because they are evolutionary novelties with reduced viability (Tiedje et al. 1989). Catteruccia et al. (2003) have shown that homozygous transgenic *Anopheles stephensi* have lower fitness than wild type. Similar conclusions have been reached for transgenic *Aedes aegypti* (Irvin et al. 2004). Possible causes for reduced fitness observed in the transgenic population include the presence of recessive genes near the transgene insertion point that confers reduced fitness when homozygous (hitchhiking effect), overexpression of a foreign protein (e.g., green fluorescent protein [GFP]) in somatic tissues, and insertional mutagenesis (Marrelli et al. 2006). Recently, we compared the fitness of

ARTIGO 13

Este artigo descreve o projeto denominado *MosqGuide*, encomendado e financiado pelo Programa Especial da Organização Mundial da Saúde para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (WHO/TDR). O objetivo deste projeto é desenvolver um guia de orientações sobre a utilização e implantação dos diferentes tipos de estratégias de uso de mosquitos geneticamente modificados no controle de doenças transmitidas por vetores, especificamente a malária e a dengue. Este guia destina-se a apoiar principalmente os Países Endêmicos, mas outras partes interessadas em considerar a segurança e os aspectos regulamentares, bem como éticos, culturais e as questões sociais, relacionados a essa implantação.

MosqGuide: A project to develop best practice guidance for the deployment of innovative genetic vector control strategies for malaria and dengue

John Mumford^{1*}, M. Megan Quinlan¹, Camilla Beech², Luke Alphey², Vicente Bayard³, Margareth L. Capurro⁴, Pattamaporn Kittayapong⁵, Jonathan D. Knight¹, Mauro T. Marrelli⁶, Kenneth Ombongi⁷, Janine M. Ramsey⁸, Rachel Reuben⁹

¹Centre for Environmental Policy, Imperial College London, Silwood Park, Ascot, Berkshire SL5 7PY, United Kingdom;

²Oxitec Ltd., 71 Milton Park, Oxford, OX14 4RX, United Kingdom;

³Gorgas Memorial Institute of Health Studies, 0816-02593 Panama City, Panama;

⁴Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Linen Prestes, 1374, Butanta, 05508-900, São Paulo, Brazil;

⁵Center of Excellence for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science, Mahidol University at Salaya, Phutthamonthon 4 Road, Nakhonpathom, 73170 Thailand;

⁶Department of Epidemiology, Faculty of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira Cesar, 01246-904 São Paulo, Brazil;

⁷Department of History, University of Nairobi, PO Box 30197, Nairobi, Kenya;

⁸Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, 19 Calle Poniente esq 4ta Norte, Tapachula, Chiapas, 30700, México;

⁹Centre for Research in Medical Entomology, Indian Council of Medical Research, Madurai, India

Received 10 June 2009 / Accepted 30 June 2009

Abstract. The World Health Organisation Special Programme in Research and Training in Tropical Diseases (WHO/TDR) has funded a project, designated MosqGuide, to develop guidance on the potential deployment of different types of genetically modified (GM) mosquitoes to control vector borne diseases, specifically malaria and dengue. This guidance is intended to support disease endemic countries (DECs) and other stakeholders in considering the safety and legal/regulatory aspects, as well as ethical, cultural and social issues, of such deployment. Commissioned in 2008 as a three year project, MosqGuide will result in a series of best practice documents developed by the project's international team of experts in regulation, vector control and management, arthropod molecular biology, social sciences and environmental risk assessment. Using fundamental principles of risk/benefit as a foundation, the MosqGuide project will prepare guidance as a series of modules aimed at different user groups, including researchers, regulators, public health officials, funding bodies and interested public. Each module will be tested with target audiences, primarily regulators and decision makers in the DECs, and will also feed into other WHO initiatives, such as the Regional Biosafety Training Centres for GM Vectors. The guidance will also include a module that demonstrates a prototype issues/response model to assist DECs in making an informed choice about whether and under what conditions to deploy specific genetic control methods for the control of mosquito vectors for malaria and dengue.

Keywords: Malaria, Dengue, Guidance, Risk Analysis, Mosquitoes, Regulation, Safety, Genetic Modification

The prospect of genetic control methods (Alphey *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002) against mosquito vectored human diseases is rapidly approaching a reality. There have been significant advances in this field and within the next 2-5 years efficacy testing of genetically modified (GM) mosquitoes engineered for population suppression traits may take place in field cages and the open environment (e.g. Malaysia, Mexico, Panama, Brazil and India). With the potential of a promising additional method for dengue and/or malaria disease control on the horizon, many decisions will need to be made on a national, regional and international level regarding the biosafety, social, cultural and ethical aspects of the use and deployment of these vector control methods (Takken *et al.*, 2002; Knols *et al.*, 2004; Lavery *et al.*, 2008). Their relevance, effectiveness and efficiency must be judged against diverse criteria across these various dimensions and they must also stand up to comparisons with alternative, conventional measures for vector and disease management, or prove worthy as a new intervention to add to an integrated control programme.

The MosqGuide project, led by the Centre for Environmental Policy at Imperial College London, has created a network of expertise in vector biology, genetics, disease control, regulation, social science and risk analysis from the UK, Panama, Brazil, Mexico, Thailand, Kenya and India. The purpose of the network, which is funded by the WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) is to prepare guidance on best practices, peer reviewed literature, emerging data and related experiences of risk assessment and management. The project itself is not involved in any field release programmes, although partners may be under separate funding. The project was launched in July 2008 with a network meeting at Imperial College London where the parameters of the guidance were specified. The MosqGuide project will address issues

* Author for correspondence:

Mailing address: Centre for Environmental Policy, Imperial College London, Silwood Park, Ascot, Berkshire SL5 7PY, United Kingdom; Email: j.mumford@imperial.ac.uk

ARTIGO 14

Este artigo descreve as iniciativas que estão ocorrendo com respeito a biossegurança, avaliação de risco e manejo, e dos aspectos éticos–sociais–culturais que deverão ser considerados antes e durante a possível implantação de métodos de controle genético de vetores de doenças, como parte de um programa integrado de controle de vetores, capacitando os países endêmicos. Este artigo mostra ainda uma visão geral dos objetivos e cronogramas de algumas dessas iniciativas que estão sendo financiadas por instituições internacionais, incluindo o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (*United Nations Development Programme*), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e os Grand Challenges in Global Health (GCGH), iniciativa co-patrocinada pela Bill & Melinda Gates Foundation.

Deployment of Innovative Genetic Vector Control Strategies: Progress on Regulatory and Biosafety Aspects, Capacity Building and Development of Best-Practice Guidance

Camilla J. Beech¹, S.S. Vasan^{1,2}, M. Megan Quinlan³, Margareth Lara Capurro⁴, Luke Alphey^{1,5},
Vicente Bayard⁶, Madama Bouaré⁷, Maria Corena McLeod⁸, Pattamaporn Kittayapong⁹, James V. Lavery^{10,11},
Lee Han Lim¹², Mauro Toledo Marrelli¹³, J. Nagaraju¹⁴, Kenneth Ombongi¹⁵, Rofina Yasmin Othman^{16,17},
Vilasini Pillai¹⁸, Janine Ramsey¹⁹, Rachel Reuben²⁰, Robert I. Rose²¹, Brij Kishore Tyagi²⁰, and John Mumford^{3*}

¹Oxitec Limited, 71 Milton Park, Oxford OX14 4RX, UK

²University of Oxford, Department of Engineering Science, Parks Road, Oxford OX1 3PJ, UK

³Imperial College London, Centre for Environmental Policy, Silwood Campus, Ascot SL5 7PY, UK

⁴Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Butantan, São Paulo 05508-900, Brazil

⁵University of Oxford, Department of Zoology, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, UK

⁶Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama City 0816-02593, Panama

⁷Université de Bamako, Faculté des Sciences et Techniques, BP: E3206, Colline de Badalabougou, Bamako, Mali

⁸Mayo Clinic, 4500 San Pablo Road, Jacksonville, Florida 32224, USA

⁹Mahidol University, Center of Excellence for Vectors and Vector-Borne Diseases, Faculty of Science,
Mahidol University at Salaya, Phutthamonthon 4 Road, Nakhonpathom 73170, Thailand

¹⁰St. Michael's Hospital, Centre for Research on Inner City Health & Centre for Global Health Research,
Keenan Research Centre in the Li Ka Shing Knowledge Institute, 30 Bond Street, Toronto, Ontario M5B 1W8, Canada

¹¹University of Toronto, Dalla Lana School of Public Health and Joint Centre for Bioethics, 70 Richmond Street E.,
4th Floor, Toronto, Ontario M5B 1W6, Canada

¹²Institute for Medical Research (Ministry of Health Malaysia), Medical Entomology Unit, Jalan Puhang, Kuala Lumpur 50588, Malaysia

¹³Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, Av. Dr Arnaldo,
715 – CEP 01246-904, São Paulo/SP, Brazil

¹⁴Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, Laboratory of Molecular Genetics, 4-87/1, ECIL Road, Nacharam, Hyderabad, 500 076, India

¹⁵University of Nairobi, Department of History, PO Box 30197, Nairobi, Kenya

¹⁶University of Malaya, Genetics and Molecular Biology Division, Institute of Biological Sciences, Kuala Lumpur, 50603, Malaysia

¹⁷Ministry of Science, Technology and Innovation (Malaysia), National Biotechnology Division, Level 3 & 4, Block C4, Complex C,
Federal Government Administrative Centre, Putrajaya 62662, Malaysia

¹⁸Ministry of Natural Resources & Environment (Malaysia), Conservation & Environmental Management Division, Level 2, Podium 2,
No. 25, Persiaran Perdana Wisma Sumber Asli, Precinct 4, Federal Government Administrative Centre, Putrajaya, 62574, Malaysia

¹⁹Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, 19 Calle Poniente esq 4ta Norte, Tapachula, Chiapas, 30700, México

²⁰Centre for Research in Medical Entomology, Indian Council of Medical Research, 4 Sarojini Street, Chinna Chokkikulam, Madurai 625 002, India

²¹Independent Biotechnology Consultant, 8322, Sharon Drive, Frederick, Maryland 21704, USA

Received 26 Jun 2009 / Accepted 30 June 2009

Abstract. In the ongoing fight against vectors of human diseases, disease endemic countries (DECs) may soon benefit from innovative control strategies involving modified insect vectors. For instance, three promising methods (viz. RIDL* [Release of Insects with a Dominant Lethal], *Wolbachia* infection, and refractory mosquito technology) are being developed by researchers around the world to combat *Aedes aegypti*, the primary mosquito vector of viral fevers such as dengue (serotypes 1–4), chikungunya and yellow fever. Some of these techniques are already being extended to other vectors such as *Aedes albopictus* (the secondary vector of these diseases) and *Anopheles* mosquito species that transmit malaria. To enable DECs to take advantage of these promising methods, initiatives are underway that relate to biosafety, risk assessment and management, and ethical–social–cultural (ESC) aspects to consider prior to and during the possible deployment of these technologies as part of an integrated vector control programme. This is a brief overview of the objectives and timelines of some of the initiatives being championed by international institutions, including the United Nations Development Programme (UNDP), the World Health Organization (WHO) and the Grand Challenges in Global Health (GCGH) initiative co-sponsored by the Bill & Melinda Gates Foundation.

Keywords: Biosafety, Capacity building, Genetic Modification, Guidance, Insects, Regulation.

INTRODUCTION

Disease endemic countries (DECs) are showing interest in the possible benefits of innovative control methods involving modified (either as a genetic drive mechanism or through infection) insect vectors of human diseases. For instance, three promising methods Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene (viz. RIDL, *Wolbachia*, and refractory mosquito technology) are being developed by researchers around the world to combat *Aedes aegypti*, the primary mosquito vector of viral fevers such as dengue (serotypes 1–4), chikungunya and yellow fever. Some of these

techniques are already being extended to other vectors such as *Aedes albopictus* (the secondary vector of these diseases) and *Anopheles* species that spread malaria. Therefore, these innovative strategies, and their agents, are coming to the attention of the regulators, vector control agencies, and policy-makers in DECs.

To enable DECs to take advantage of these promising methods and initiatives are underway that relate to biosafety, risk assessment and management, and ESC aspects

* Author for correspondence:

Mailing add: Imperial College London, Centre for Environmental Policy,
Silwood Campus, Ascot SL5 7PY, UK email: j.mumford@imperial.ac.uk

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de espécies crípticas entre os vetores de patógenos e o desenvolvimento de técnicas que permitam a correta identificação permanece, em grande parte, um problema a ser resolvido. Atualmente são reconhecidas aproximadamente 3.500 espécies de culicídeos (HARBACH & HOWARD 2007), muitas das quais formam complexos de espécies crípticas. Além disso, estima-se que esse montante represente apenas um quarto ou, no máximo, metade de todas as espécies de mosquitos presentes na natureza (BELKIN 1962, ZAVORTINK 1990). Muitas espécies ainda serão descritas, e estudos sobre a biodiversidade de mosquitos na natureza têm sido importantes para esse tipo de investigação.

Nossos estudos indicam que marcadores moleculares como o ITS2 e o COI podem ser aplicados na identificação de algumas espécies de mosquitos, em estudos de genética de populações, na ocorrência de espécies crípticas ou relacionadas de mosquitos e em estudos de relações filogenéticas. Muitos caracteres morfológicos estão disponíveis para a identificação da maioria das espécies estudadas, porém, a distinção das espécies intimamente relacionadas é problemática e caracteres diferenciais adicionais devem ser utilizados. Os métodos baseados em DNA são vantajosos, nestes casos, porque eles podem ser aplicados aos espécimes em situações que são inadequadas para taxonomia morfológica. Por exemplo, o DNA pode ser obtido e analisado de espécimes em todas as fases de desenvolvimento, de ambos os sexos, frescos, preservados em álcool, secos ou congelados.

Devido às dificuldades de identificação correta de fêmeas de mosquitos capturados em campo, com base apenas em seus caracteres morfológicos, estudos anteriores indicam que uma série de sequências correspondentes ao ITS2 foram depositados no GenBank e atribuídas a organismos incorretamente identificados. Infelizmente, a maioria das publicações no que diz respeito às sequências de ITS2 de anofelinos neotropicais não fornece indicações de que irmãos das amostras analisadas foram preservados e se estão disponíveis para outras verificações de características morfológica e/ou molecular. Por conseguinte, essas sequências questionáveis não

podem ser reavaliadas e validadas, e ainda terem seus registros corrigidos. Em conclusão, enquanto a investigação na taxonomia de vetor da malária tem utilizado dados fornecidos por um único ou alguns mosquitos capturados em campo, os problemas assinalados anteriormente indicam que muita cautela deve ser tomada e um mínimo de requisitos deve ser considerado pelos investigadores que trabalham com mosquitos em estudos futuros. Para continuar produzindo resultados confiáveis e de alta qualidade, que fornecerão a base para as investigações e estratégias de controle mais eficazes, elaboramos a seguinte proposta, extraída da revisão de MARRELLI et al. (2006a, **ARTIGO 4**):

1) *Espécimes testemunhas (voucher) devem ser depositadas em coleções entomológicas (Museus)* – A geração de descendências de mosquitos fêmeas capturadas em campo pode ser feita facilmente em insetários. O DNA, então, pode ser extraído de alguns dos irmãos da mesma família, enquanto que outros espécimes devem ser preservados para permitir a verificação futura. Sequências de DNA devem ser de alta qualidade e relacionadas a um espécime *voucher* cuja origem e *status* deverão registrados. O posicionamento das amostras em instituições serve como uma plataforma para garantir a preservação de espécimes e comunicação entre os investigadores (HEBERT & GREGORY 2005, CORTHALS & DESALLE 2005). Atualmente, este cuidado tem sido adotado pelos pesquisadores, quando estes depositam suas sequências no GenBank. Do mesmo modo, para as análises discutidas nos artigos de VESGUEIRO et al (2011, **ARTIGO 5**) e DEMARI-SILVA et al. (2011, **ARTIGO 6**), foram tomados os devidos cuidados para que as exúvias das larvas, pupas e as genitálias masculinas dos adultos, usados para a extração de DNA, fossem montadas entre lâmina e lamínula e empregadas para a identificação das espécies. Em seguida, o material foi codificado e rotulado, sendo depositado na Coleção de Referência da Faculdade de Saúde Pública como *vouchers*.

2) *Variações intra-específicas devem ser consideradas* - A identificação das espécies é baseada em caracteres invariáveis, ou quando os caracteres são polimórficos, devem ser determinados entre os indivíduos da mesma espécie. Um número maior de amostras, compostas de vários espécimes de cada localidade, e de localidades distintas, que abrangem a distribuição geográfica conhecida de cada

espécie, deve ser analisado. Por outro lado, heterogeneidade intragenômica pode ocorrer e, nessas circunstâncias o sequenciamento direto de produtos de PCR pode ser enganoso. Na ocorrência de polimorfismo intragenômico, a clonagem de produtos do PCR e sequenciamento de seus clones individuais é um requisito para resultados confiáveis. Infelizmente, devido aos custos e tempo com as capturas de mosquito, os pesquisadores estão cada vez mais relutantes em realizar estudos em grande escala, incorrendo no risco de propor ou definir complexos de espécies, sem uma avaliação adequada da variabilidade intra-específica (VAN BORTEL & COOSEMANS 2003). Como por exemplo, FAIRLEY et al. (2005) detectaram 15 diferentes sequências de ITS2 em *A. aquasalis*, em 72 clones examinados, de amostras de mosquitos de duas localizações geográficas no Brasil, duas na Venezuela e uma localidade no Suriname. A divergência intra-específica observada poderia sugerir um complexo de espécies crípticas, no entanto, um estudo mais aprofundado levou à conclusão de que as variações nas sequências de nucleotídeos não eram informativas a ponto de distinguir as populações, apoiando o *status* do *An. aquasalis* como espécie monotípica.

3) *Vários marcadores moleculares (nucleares e mitocondriais) devem ser utilizados* – Técnicas de biologia molecular estão se tornando cada vez mais acessíveis às instituições científicas e os custos do sequenciamento de fragmentos de DNA tem diminuído significativamente. O marcador ITS2 é apenas um dos marcadores moleculares, portanto, após a extração do DNA de espécimes de mosquitos, um manancial de informações pode ser gerado, incluindo as sequências de outros genes marcadores como os do DNA ribossômico nuclear, ITS1 e IGS, e mitocondriais, como os genes COI, COII, ND4, por exemplo. A utilização de técnicas como *RAPD*, análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (*RFLP*), e análise de microssatélites podem ser utilizados para os mesmos objetivos (NORRIS 2002).

4) *Dados biológicos adicionais são necessários* – A colonização de muitas espécies de mosquitos, principalmente anofelinos, não são ainda possíveis. Muitos esforços têm sido feitos para colonizar esses mosquitos e com isso facilitar a aquisição de dados biológicos, que hoje em dia são possíveis apenas através de trabalhos de captura em campo, que são muitas vezes caros e demorados. Uma vez obtidas tais colônias, também seria importante realizar estudos de compatibilidade de

acasalamento entre espécies potencialmente próximas ou crípticas (LIMA et al. 2004a, b). Análise de cromossomos politênicos revelou-se extremamente útil para diferenciar espécies de anofelinos simpátricas, no entanto, com poucas exceções (PÉREZ & CONN 1992, RAMIREZ & DESSEN 2000 a, b), essa técnica não foi aplicada para anofelinos neotropicais. Estudos comportamentais (DA SILVA VASCONCELOS et al. 2002) e bioquímicos (PHILLIPS et al. 1988, DOS SANTOS et al. de 2003) também fornecem informações importantes para taxonomia de mosquito e devem ser incentivados.

5) *Taxonomia integrada* – Os marcadores moleculares são importantes ferramentas para auxiliar e não para substituir a taxonomia tradicional. Os resultados dos marcadores moleculares são mais confiáveis quando combinados com ferramentas taxonômicas tradicionais. A geração contínua de resultados de qualidade e a aplicação de uma taxonomia integrada, que utiliza todos os caracteres disponíveis, incluindo sequências de DNA e outros tipos de dados, para delimitar, descobrir e identificar espécies e taxa contribuirá para uma compreensão mais detalhada das espécies e complexos de espécies crípticas de mosquitos, e poderá servir como base para o controle mais eficaz de vetores (FARAN 1979, RUBIO PALIS & ZIMMERMAN 1997, LOUNIBOS & CONN 2000, WILL et al. 2005).

A perspectiva de uso dos métodos de controle genético (ALPHEY 2002, SCOTT et al. 2002) contra o mosquitos transmissores de patógenos causadores de doenças ao homem está rapidamente se aproximando de uma realidade. Avanços significativos neste campo têm levado a geração de diferentes linhagens de mosquitos geneticamente modificados (MGM). Desse modo, os países endêmicos poderão, em breve, utilizar essas estratégias inovadoras de controle que envolvem modificação genética dos insetos vetores. Por exemplo, três métodos promissores, como a RIDL (versão da SIT com insetos carregando um gene letal dominante), infecção com *Wolbachia* e a tecnologia de mosquito refratário, estão sendo desenvolvidos por pesquisadores em todo o mundo para combater o *Aedes aegypti*, vetor principal da dengue, do vírus chikungunya e da febre amarela. Algumas dessas técnicas já estão sendo estendidas para outros vetores, como o *Aedes albopictus* (o vetor secundário destas doenças) e os anofelinos.

A maioria das linhagens de anofelinos transgênicos foi produzida e testada em modelos experimentais, como por exemplo, contra o parasita *P. berghei* (ITO et al. 2002, MOREIRA et al. 2004), e a transformação de *Anopheles gambiae*, o principal vetor da malária na África e do *An. stephensi*, vetor no Sul da Ásia, tem sido feita com sucesso (ITO et al. 2002, MOREIRA et al. 2004, NOLAN et al. 2011). Estes anofelinos são facilmente colonizáveis. No entanto, existem aproximadamente 460 espécies reconhecidas, cerca de 100 estão presentes na Região Neotropical, e muitas delas pertencem a complexos de espécies crípticas (PAPAVERO & GUIMARÃES 2000, MARRELLI et al. 2006a, **ARTIGO 4**). Dessas espécies, 29 foram indicadas como vetores em potencial da malária humana, e a grande maioria dessas nunca foi colonizada com sucesso, como o *An. darlingi*, o vetor primário na Região Amazônica, onde 95% dos casos relatados na América do Sul ocorrem. Estes fatos indicam que a estratégia de uso de mosquitos transgênicos para substituição da população vetora por uma refratária ainda está longe de uma realidade. Porém, há muitos avanços no uso da estratégia RIDL para controle e supressão do *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue em todo o mundo. Atualmente testes de biossegurança e eficácia para a supressão da população alvo de *Aedes aegypti* têm sido realizados em laboratório (experimentos em gaiolas) e em ambiente aberto, ou estão em fase de execução, na Malásia, México, Ilhas Caymans, Brasil e Índia. Assim, por exemplo, um projeto de liberação da linhagem OX513, produzidas pela OXFORD INSECT TECHNIQUE (OXITEC) (PHUC et al. 2007), já foi aprovado pela COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBio), no Brasil, e estará em execução em breve, em Juazeiro, Bahia, com colaboração da MOSCAMED DO BRASIL, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (USP) e FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA (USP).

Enquanto que a produção de linhagens transgênicas de mosquitos *Culex* foi feita com sucesso por apenas um laboratório (ALLEN et al. 2001, 2004), várias tentativas de obtenção de mosquitos transgênicos de espécies desse gênero têm sido feitas por outros laboratórios, incluindo o laboratório do Dr. JASON RASGON, na Johns Hopkins University, em Baltimore, MD (comunicação pessoal), e o nosso laboratório, mas sem sucesso, devido principalmente às dificuldades no processo de microinjeção dos embriões desses mosquitos, que se caracterizam pela oviposição em forma de jangada, dificultando a sua manipulação e o sucesso da integração do transgene no

genoma desses mosquitos. Desse modo, a técnica do inseto estéril (SIT) voltou a ser uma opção, devido principalmente aos avanços no uso de novos modelos de esterilização utilizando Raios X, ao invés de Raios Gama, que são menos prejudiciais aos mosquitos. Desse modo, um dos nossos projetos em andamento (financiado pela EMAE, Empresa Metropolitana de Águas e Energia), tem como objetivo testar a produção em massa e liberação de mosquitos *Culex quinquefasciatus* utilizando a técnica SIT.

No campo, a seleção natural vai agir sobre os mosquitos transgênicos do mesmo modo que faz em todos os organismos (TIEDJE et al. 1989). Portanto, para um transgene persistir e se espalhar na população natural, os mosquitos transgênicos teriam que apresentar vantagens no *fitness* para compensar quaisquer custos que possam estar associados ao transgene. Estudos de *fitness* desses organismos são essenciais, pois os mosquitos transgênicos com maior aptidão seriam selecionados positivamente e o alelo transgênico poderia ser espalhado e fixado na população selvagem. Como alternativa, os transgenes podem estar fortemente associados a um mecanismo genético suficientemente forte para compensar o custo no *fitness*. Isso é especialmente importante em estratégias que visam a substituição da população vetora por linhagens transgênicas refratárias aos patógenos. No caso de técnica de supressão RIDL, os machos transgênicos são liberados em massa para cruzar com as fêmeas selvagens e a simples interrupção da liberação acabaria com a presença do transgene no ambiente, ou seja, este transgene nunca será fixado na população. Independentemente da estratégia empregada, as chances de sucesso dessas medidas de controle genético são maiores quando o *fitness* dos mosquitos transgênicos não sofre nenhum custo ou é mais vantajoso quando comparado ao dos mosquitos selvagens (MARRELLI et al. 2006b, **ARTIGO 10**).

Com o potencial promissor dos métodos genéticos no controle da dengue e/ou malária, muitas decisões deverão ser feitas em nível nacional, regional e internacional no que diz respeito à biossegurança, aos aspectos sociais, culturais e éticos da utilização e implantação desses métodos de controle de vetores (TAKKEN et al. 2002, KNOLS et al. 2004, LAVERY et al. 2008). Sua relevância, eficácia e eficiência devem ser julgadas com base em critérios diferentes entre estas várias dimensões e também

devem enfrentar comparações com medidas convencionais no controle de vetores de doenças, comprovando ser uma nova alternativa de intervenção a ser incluída em uma abordagem de controle integrado de vetores.

Após avaliação de riscos e benefícios, os países endêmicos podem chegar a diferentes conclusões sobre o uso dessas estratégias. Isto pode ser um grande problema, considerando que os mosquitos geneticamente modificados que forem liberados para controle não reconhecem fronteiras. Nesse sentido, o programa especial da Organização Mundial da Saúde para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (WHO/TDR) encomendou o projeto denominado *MosqGUIDE*, descrito e discutido no **ARTIGO 13** (MUMFORD et al. 2009). O objetivo do projeto é elaborar um guia de orientações sobre o potencial de implantação dos diferentes tipos de estratégias de uso de mosquitos geneticamente modificados (MGM) no controle de doenças transmitidas por vetores, especificamente a malária e a dengue. O guia destina-se a apoiar os Países Endêmicos e outras partes interessadas em considerar os benefícios e os riscos, os aspectos legais/regulamentares, bem como éticos, culturais e as questões sociais, relacionados a essa implantação.

Encomendado em 2008 como um projeto de três anos, *MosqGuide* irá resultar em uma série de documentos de boas práticas desenvolvidos por uma equipe internacional e multidisciplinar de especialistas em regulamentação, manejo e controle de vetores, biologia molecular de artrópodes, ciências sociais, epidemiologia e avaliação dos impactos ambientais. Utilizando os princípios fundamentais de risco/benefício, o projeto *MosqGuide* está elaborando o guia de orientação como uma série de módulos destinados a diferentes grupos de usuários, incluindo pesquisadores, reguladores, funcionários da saúde pública, agências de financiamento e público interessado. Cada módulo será testado e validado por um público-alvo. Primeiramente com os reguladores, que são os responsáveis pela tomada de decisões nos Países Endêmicos, e também irá fornecer subsídios para outras iniciativas da OMS, tais como os Centros Regionais de Treinamento em Biossegurança para MGM. O *MosqGuide* também incluirá um módulo do tipo questões/respostas para auxiliar os Países Endêmicos na informação e escolha sobre em que condições implantar métodos de controle genético especificamente para o controle dos mosquitos vetores da malária e

dengue.

Para capacitar os países endêmicos a tirar proveito desses métodos promissores estão em curso iniciativas que dizem respeito à biossegurança, avaliação de risco e manejo, e dos aspectos éticos–sociais–culturais que deverão ser considerados antes e durante a possível implantação dessas tecnologias como parte de um programa integrado de controle de vetores. BEECH et al. (2009, **ARTIGO 14**) mostra uma visão geral dos objetivos e cronogramas de algumas dessas iniciativas que estão sendo financiadas por instituições internacionais, incluindo o PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (*UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME*), a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) e os GRAND CHALLENGES IN GLOBAL HEALTH (GCGH), iniciativa co-patrocinada pela BILL & MELINDA GATES FOUNDATION.

A utilização das diferentes estratégias de mosquitos transgênicos para controle da transmissão de uma determinada doença está intimamente associada ao conhecimento das espécies vetoras de uma área alvo e, desse modo, investigações sobre a biologia, a ecologia, a taxonomia e a sistemática dessas espécies, com utilização de marcadores moleculares, são estudos preliminares que deverão ser empregados anteriormente a qualquer medida de controle genético que venha a ser utilizada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham EG, Donnelly-Doman M, Fujioka H, Ghosh A, Moreira L, Jacobs-Lorena M. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with AgAper1 regulatory elements. *Insect Mol Biol* 14: 271–279, 2005.
- Allen ML, Christensen BM. Flight muscle-specific expression of act88f: GFP in transgenic *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera; Culicidae). *Parasitol Int* 53: 307–314, 2004.
- Allen ML, O’Brochta DA, Atkinson PW, Levesque CS. Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 38: 701–710, 2001.
- Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1243–1247, 2002.
- Apperson CS, Hassan HK, Harrison BA, Savage HM, Aspen SE, Farajollahi A, Crans W, Daniels TJ, Falco RC, Benedict M, Anderson M, McMillen L, Unnasch TR. Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 71–82, 2004.
- Arrighi RB, Nakamura C, Miyake J, Hurd H, Burgess JG. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarías. *Antimicrob. Agents Chemother* 46: 2104–2110, 2002.
- Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 35: 873–881, 1986.
- Bahnck C, Fonseca DM. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *Am J Trop Med Hyg* 75: 251–255, 2006.
- Barr AR. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America. *Am J Trop Med Hyg* 6: 153–165, 1957.
- Beebe NW, Saul A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 478–481, 1995.
- Beech CJ, Vasan SS, Nagaraju J, Rose RI, Othman RY, Pillai V, Mohammadi A, Bouaré M, Corena M, Lim LH, Tyagi BK, Mumford J, Quinlan MM, Alphey L, Bayard V, Capurro ML, Kittayapong P, Marrelli MT, Ombongi K, Reuben R, Ramsey J, Lavery J. Deployment of innovative genetic vector control strategies: Progress on

- regulatory and biosafety aspects and development of best-practice guidance. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 17: 75-85, 2009.
- Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera: Culicidae). Berkeley: University of California Press v. 1, 1962.
- Besansky NJ, Collins FH. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. *Parasitol Today* 8: 186-192, 1992.
- Black IV WC, Munstermann LE. Molecular taxonomy and systematic of arthropod vectors. In WC Marquardt, *Biology of Disease Vectors*, Elsevier Academic Press, Burlington, p. 505-528, 2005.
- Bockarie MJ, Pedersen EM, White GB, Michael E. Role of vector control in the global program to eliminate lymphatic filariasis. *Annu Rev Entomol* 54: 469-487, 2009.
- Bram RA. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera: Culicidae). *Proc US Nat Museum* 120: 1-122, 1967.
- Branquinho MS, Araujo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha MR, Taveira FAL, Kloetzel JK. *Anopheles oswaldoi* a potential malaria vector in Acre, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 233, 1996.
- Branquinho MS, Taïpe Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JMS, Cochrane AH, Nardin E, Nussenzweig RS, Kloetzel JK. Anophelines in the State of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 391–394, 1993.
- Bushland RC, Lindquist AW, Knippling EF. Eradication of screw-worms through release of sterilized males. *Science*. 122: 287-288, 1955.
- Catteruccia F, Benton JP, Crisanti A. An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. *Nat Biotechnol* 23: 1414–1417, 2005.
- Catteruccia F, Godfray HC, Crisanti A. Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science* 299: 1225–1227, 2003.
- Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405: 959–962, 2000.
- Causey OR, Deane LM, Deane MP. Studies on Brazilian anophelines from the northeast and Amazon regions. II. An illustrated key by male genitalia characteristics for the identification of thirty-four species of anophelini, with a note on dissection technique. *Am J Hyg, Monograph Series* 18: 21–31, 1946.
- Charlwood JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 391-398, 1996.

- Christophers R. *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito: Life history, Bionomics & Struture, Cambridge University Press, 1960.
- Clements AN. The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, Nutrition and Reproduction. Chapman & Hall, 1992.
- Coates CJ, Jasinskiene N, Pott GB, James AA. Promoter-directed expression of recombinant fire-fly luciferase in the salivary glands of Hermes-transformed *Aedes aegypti*. *Gene* 226: 317–325, 1999.
- Coetzee M, Hunt RH, Braak LE. Enzyme variation at aspartate aminotransferase locus in members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 39: 303-308, 1993.
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen, MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* 37: 37-41, 1987.
- Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5: 1–9, 1996.
- Colluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human enviroments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 483-497, 1979.
- Conde R, Zamudio FZ, Rodríguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett* 471: 165–168, 2000.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1998.
- Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 87: 735-748, 2006.
- Cook S, Diallo M, Sall AA, Cooper A and. Holmes EC. Mitochondrial Markers for Molecular Identification of *Aedes* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Involved in Transmission of Arboviral Disease in West Africa. *J Med Entomol* 42: 19-28, 2005.
- Cornel AJ, Porter CH, Collins FH. A PCR species diagnostic assay for the *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* 33: 109–116, 1996.
- Corthals A, Desalle R. An application of tissue and DNA banking for genomics and conservation: The Ambrose Monell cryo-collection (AMCC). *Syst Biol* 54: 819-823, 2005.
- da Silva-Vasconcelos A, Kato MY, Mourão EN, de Souza RT, Lacerda RN, Sibajev A, Tsouris P, Pova MM, Momen H, Rosa-Freitas MG. Biting indices, host-seeking

- activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 51-61, 2002.
- Deane LM. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 5–14, 1986.
- Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MA, Marrelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the Cytochrome C Oxidase I mitochondrial gene. *J Med Entomol* 2011.
- dos Santos JM, Maia J de F, Tadei WP, Rodriguez GA. Isoenzymatic variability among five *Anopheles* species belonging to the *Nyssorhynchus* and *Anopheles* subgenera of the Amazon region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 247- 253, 2003.
- Edwards FW. Genera insectorum. Diptera. Fam. Culicidae. Fascicle 194. Desmet-Verteneuil, Brussels, 1932.
- Fairley TL, Kilpatrick CW, Conn JE. Intragenomic heterogeneity of internal transcribed spacer rDNA in neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 42: 795-800, 2005.
- Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 13: 1–81, 1981.
- Faran ME. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Cont Am Entomol Inst* 15: 61–62, 1980.
- Faran ME. The importance of an integrated approach in solving a problem in mosquito systematics. *Mosq Syst* 11: 280-288, 1979.
- Flores-Mendoza C, Peyton EL, Wilkerson RC, Lourenço-de-Oliveira R. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *konderi* Galvão and Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *Proc Entomol Soc Wash* 106: 118-132, 2004.
- Foley DH, Bryan JH. Electrophoretic keys to identify members of the *Anopheles punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea. *Med Vet Entomol* 7: 49-53, 1993.
- Fonseca MD, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer FC, Wilkerson RC. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science* 303: 1535, 2004.
- Forattini OP. Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia. v.2; São Paulo, Edusp, 2002.
- Foster WD. A history of parasitology. E. & S. Livingstone Ltd. 1965.

- Fritz GN, Conn J, Cockburn A, Seawright JA. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol Evol* 11: 406–416, 1994.
- Fritz GN. Sequence analysis of the rDNA internal transcribed spacer 2 of five species of South America human malaria mosquitoes. *DNA Sequence*, 8: 215–221, 1998.
- Galvão ALA, Damasceno RG. *Anopheles (Nyssorrhynchus) konderi* nova espécie de *Anopheles* do vale do Amazonas e considerações sobre as espécies do complexo *tarsimaculatus* (Diptera: Culicidae). *Folia Clínica e Biológica* 14: 115-135, 1942.
- Ghosh AK, Ribolla PE, Jacobs-Lorena M. Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 13278–13281, 2001.
- Green CA, Munstermann LE, Tan SG, Panyim S, Baimal V. Population genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electomorphs for their identification. *Med Vet Entomol* 6: 29-36, 1992.
- Green CA. Malaria epidemiology and anopheline cytogenetics. In *Cytogenetics and Genetic of Vectors*. Pal R, Kitzmiller JB, Kanda T eds. 1981
- Grossman GL, Rafferty CS, Clayton JR, Stevens TK, Mukabayire O, Benedict MQ. Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol Biol* 10: 597–604, 2001.
- Halligan DL, Keightley PD. How many lethal alleles? *Trends Genet* 19: 57–59, 2003.
- Harbach RE, Howard TM. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). *Eur Mosq Bull* 23: 1-66, 2007.
- Harbach RE, Peyton EL. A new subgenus of *Culex* in the Neotropical region (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 24: 242-252, 1992.
- Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668: 591-638, 2007.
- Hayes J, Calderon G, Falcon R, Zambrano V. Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru. *Journal of the American Mosq Cont Ass* 3: 418–422, 1987.
- Hebert PDN, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst Biol* 54: 852-859, 2005.
- Heinrich JC, Scott MJ. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect suitable for a sterile-release program. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8229-8232, 2000.

- Hemmert S, Slapeta J, van den Hurk AF, Cooper RD, Whelan PI, Russell RC, et al. A curious coincidence: mosquito biodiversity and the limits of the Japanese encephalitis virus in Australasia. *BMC Evol Biol* 7: 100, 2007.
- Herbert PND, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond* 270: S96-S99, 2003.
- Hill SM, Crampton JM. DNA-based methods for the identification of insect vectors. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 227-250, 1994.
- Horn C, Schmid BG, Pogoda FS, Wimmer EA. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1221–1235, 2002.
- Humeres SG, Almirón WR, Sabattini MS, Gardenal CN. Estimation of Genetic Divergence and Gene Flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 57-62, 1998.
- Hurd H. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu Rev Entomol* 48: 141–161, 2003.
- 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 USA* 101: 891-896, 2004.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417: 452-455, 2002.
- James AA. Mosquito molecular genetics. The hands that feed back. *Science* 257: 37-38, 1992.
- 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* 95: 3743–3747, 1998.
- Kasai S, Komagata O, Tomita T, Sawabe K, Tsuda Y, Kurahashi H, Ishikawa T, Motoki M, Takahashi T, Yoshida M, Shinjo G, Hashimoto T, HigaY, Kobayashi M. PCR-based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Jap J Infec Dis* 61: 184-191, 2008.
- 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* 41: 447–455, 2004.
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Mol Phylogenet Evol* 18: 479-487, 2001a.

- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. *Syst Biol* 50: 540-556, 2001b.
- Klein TA, Lima JBP, Tada MS, Miller. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondônia, Brazil, to infection by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 45, 463–470, 1991b.
- Klein TA, Lima JBP, Tada MS. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 44: 598–603, 1991a.
- Knols BGJ, Louis C, Bogers RJ. Bridging laboratory and field research for genetic control of disease vectors. *Proceedings of the Joint WHO/TDR, NIAID, IAEA and Frontis Workshop on Bridging Laboratory and Field Research for Genetic Control of Disease Vectors*, Nairobi, Kenya, 14–16 July 2004.
- Kokoza V, Ahmed A, Wimmer EA, Raikhel AS. Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1137-1143, 2001a.
- Kokoza VA, Martin D, Mienaltowski MJ, Ahmed A, Morton CM, Raikhel AS. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene* 274: 47–65, 2001b.
- Kothera L, Zimmerman EM, Richards CM, Savage HM. Microsatellite Characterization of Subspecies and Their Hybrids in *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) Mosquitoes Along a North-South Transect in Central United States. *J Med Entomol* 46: 236-248, 2009
- Kreutzer RD, Kitzmiller JB. Hybridization between *Anopheles crucians* and *Anopheles bradleyi*. *Evolution* 25: 193- 206, 1971.
- Lane J. Neotropical Culicidae I. University of Sao Paulo, Brazil, 1953.
- Lavery J, Harrington L, Scott T. Ethical, social, and cultural considerations for site selection for research with genetically modified mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 79: 312–318, 2008.
- Lenormand T, Raymond M. Analysis of clines with variable selection and variable migration. *Am Nat* 155: 70-82, 2000.
- Li C, Marrelli MT, Yan G, Jacobs-Lorena M. Fitness of transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes expressing the SM1 peptide under the control of a vitellogenin promoter. *J Hered* 1: 1-8, 2008.
- Lima JB, Valle D, Peixoto AA. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. *BMC Evol Biol* 4: 12, 2004a.

- Lima JB, Valle D, Peixoto AA. Analysis of reproductive isolation between sibling species *Anopheles albitarsis* sensu stricto and *Anopheles deaneorum*, two malaria vectors belonging to the *Albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 41: 888-893 2004b.
- Linthicum KJ. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *Mosq Syst* 20: 98–278, 1988.
- Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *BiochemBiophys Res Commun* 260: 712–717, 1999.
- Lounibos LP, Conn JE. Malaria vector heterogeneity in South America. *Am Entomologist* 46: 238-249, 2000.
- Lyman RF, Lawrence F, Nuzhdin SV, Mackay TF. Effects of single P-element insertions on bristle number and viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143: 277–292, 1996.
- Mahon RJ, Green CA, Hunt RH. Diagnostic alloenzymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* 66: 25-31, 1976.
- Malafronte RS, Marrelli MT, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 36: 631–634, 1999.
- Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg JA, Roberts DR. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *Am J Trop Med Hyg* 60: 364–376, 1999.
- Marrelli MT, Branquinho MS, Hoffmann EHE, Natal D, Taípe-Lagos CB, Kloetzel JK. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* in the population and in anophelines from the State of Acre, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 149-151, 1998.
- Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Lourenço-de-Oliveira R, Flores-Mendoza C, Marinotti. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. *Med Vet Entomol* 19: 208-218, 2005.
- Marrelli MT, Honório NA, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Marinotti O, Kloetzel JK. Comparative susceptibility of two members of *Anopheles oswaldoi* complex, *Anopheles oswaldoi* and *Anopheles konderi*, to infection by *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 381-384, 1999a.
- Marrelli MT, Li C, Rasgon JL, Jacobs-Lorena M. Transgenic malariareistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium* infected blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5580–5583, 2007.

- Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 36: 679-684, 1999b.
- Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? *Trends in Parasitol* 22: 197-202, 2006b.
- Marrelli TM, Sallum MAM, Marinotti O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as tool for Latin American anopheline taxonomy – A critical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 817-832, 2006a.
- Matson R, Rios CT, Chavez CB, Gilman RH, Florin D, Sifuentes VL, Greffa RC, Yori PP, Fernandez R, Portocarrero DV, Vinetz JM, Kosek M. Improved molecular technique for the differentiation of Neotropical Anopheline species. *Am J Trop Med Hyg* 78: 492-498, 2008.
- McAbee RD, Green EN, Holeman J, Christiansen J, Frye N, Dealey K, Mulligan FS, Braut AC, Cornel AJ. Identification of *Culex pipiens* Complex Mosquitoes in a Hybrid Zone of West Nile Virus Transmission in Fresno Country, California. *Am J Trop Med Hyg* 78: 303-310, 2008
- McLain DK, Collins FH, Brandling-Bennett AD, Were JB. Microgeographic variation in rDNA intergenic spacers of *Anopheles gambiae* in western Kenya. *Heredity* 2: 257-264, 1989.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol* 5: 93-97, 1996.
- Mitchell CJ. Environmental management for vector control. In Beaty BJ, Marquardt WC. Eds. The biology of disease vectors. University Press of Colorado, 1996.
- Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 672-676, 2010.
- Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10895-10898, 2000.
- 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* 277: 40839-40843, 2002.
- Moreira LA, Wang J, Collins FH, Jacobs-Lorena M. Fitness of anopheline mosquitoes expressing transgenes that inhibit *Plasmodium* development. *Genetics* 166: 1337-1341, 2004.

- Moritz C, Dowling TE, Brown WM. Evolution of animal mitochondrial relevance for population biology and systematics. *Ann Ver Ecol Syst* 18: 269-292, 1987.
- Mumford J, Quilan MM, Beech CJ, Alphey L, Bayard V, Capurro ML, Kittayapong P, Knight JD, Marrelli MT, Ombongi K, Ramsey J, Reuben J. MosqGuide: A project to develop best practice guidance for the deployment of innovative genetic vector control strategies for malaria and dengue. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 17: 93-95, 2009.
- Natal D, Barata JM, Lagos CB, Rocha RM. Culicidae (Diptera: Culicidae) of the Perus river basin, Acre, Amazonia (Brazil). *Rev Saude Publica* 26:129-131, 1992.
- Navarro JC, Liria J. Phylogenetic relationships among eighteen Neotropical Culicini species. *J Am Mosq Control Association* 16: 75-85, 2000.
- Need JT, Wirtz RA, Franke ED, Fernandez R, Carbajal F, Falcon R, San Roman E. *Plasmodium vivax* VK247 and VK210 circumsporozoite proteins in *Anopheles* mosquitoes from Andoas, Peru. *J Med Entomol* 30: 597-600, 1993.
- Nolan T, Papathanos P, Windbichler N, Magnusson K, Benton J, Catteruccia F, Crisanti A. Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the sterile insect technique. *Genetica* 139: 33-39, 2011.
- Norris DE. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *Int J Parasitol* 32: 1607-1615, 2002.
- Oshaghi MA, Yaaghoobi F, Abaie MR. Pattern of mitochondrial DNA variation between and within *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) biological forms suggests extensive gene flow. *Acta Tropica* 99: 226-233, 2006.
- Papavero N, Guimarães JH. The taxonomy of Brazilian insects vectors of transmissible diseases (1900-2000) – Then and now. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 109-118, 2000.
- Paskewitz SM, Collins FH. A method to distinguish mosquitoes of the *An. gambiae* complex using the polymerase chain reaction. *Med Vet Entomol* 4: 367–373, 1990.
- Paskewitz SM, Ng K, Coetzee M, Hunt RH. Evaluation of the polymerase chain reaction method for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex in Southern Africa. *J Med Entomol* 30: 953–957, 1993a.
- Paskewitz S M, Wesson DM, Collins FH. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Mol Biol* 2: 247-257, 1993b.
- Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G, Kremastinou J, Nasioulas G and Vakalis NC. Molecular and Morphological Characterization of *Aedes albopictus* in

- Northwestern Greece and Differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *Mol Biol* 43: 40-54, 2006.
- Pérez AM, Conn J. A polytene chromosome study of four populations of *Anopheles aquasalis* from Venezuela. *Genome* 35: 327-331, 1992.
- Phillips A, Milligan PJM, Broomfield G, Molyneux DH. Identification of medically important Diptera by analysis of cuticular hydrocarbons. In MW Service, *Biosystematics of Haematophagous Insects*, Oxford University Press, New York, p. 61-76, 1988.
- Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol* 5: 11, 2007.
- Porter CH, Collins FH. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 45: 271-279, 1991.
- Pringle G. A quantitative study of naturally-acquired malaria infections in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a highly malarious area of East Africa *Trans R Soc Trop Med Hyg* 60: 626-632, 1966.
- Ramirez CCL, Dessen EMB. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*. *Genome* 43: 143-151, 2000a.
- Ramirez CCL, Dessen EMB. Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*: evidence for a third sibling species. *Genetica* 108: 73-80, 2000b.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 651-655, 1998.
- Rubio-Palis Y, Wirtz RA, Curtis CF. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Trop* 52: 167-174, 1992.
- Rubio-Palis Y, Zimmerman RH. Ecoregional classification of malaria vectors in the Neotropics. *J Med Entomol* 34: 499-510, 1997.
- Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae based on morphological characters. *Ann Entomol Soc Am* 93: 745-775, 2000.
- Sallum MA, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Dos Santos CL. Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J Med Entomol* 45: 970-981, 2008.
- Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst Entomol* 27: 361-382, 2002.

- Saraste M. Structural features of cytochrome oxidase. *Quart Rev Biophysics* 23: 331-366, 1990.
- Savage HM, Anderson M, Gordon E, Mcmillen L, Colton L, Delorey M, Sutherland G, Aspen S, Charnetzky D, Burkhalter K, Godsey M. Host-Seeking Heights, Host-Seeking Activity Patterns, and West Nile Virus Infection Rates for Members of the *Culex pipiens* Complex at Different Habitat Types Within the Hybrid Zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 45: 276 -288, 2008.
- Scott TW, Takken W, Knols BGJ, Boëte C. The ecology of genetically modified mosquitoes. *Science* 298: 117-119, 2002.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520-529, 1993.
- Severini C, Silvestrini F, Mancini P, La Rosa G, Marinucci M. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol* 5: 181-186, 1996.
- Shearman DC. The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. *Genetica* 116: 25-43, 2002.
- Sibajev-Freitas MGR, Conn J, Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA, Momen H. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 27: 78-99, 1995.
- Simmons MJ, Crow JF. Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations. *Annu Rev Genet* 11: 49–78, 1977.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entol Soc Am* 87: 651-701, 1994.
- Subbarao SK, Vasantha K, Sharma VP. Responses of *Anopheles culicifacies* sibling species A and B to DDT and HCH in India: implications in malaria control. *Med Vet Entomol* 2: 219-223, 1988.
- Sundararaman S. Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States. *Am. J. Hyg* 50: 307-314, 1949.
- Tadei WP, Dutary Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42: 87-94, 2000.

- Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 59: 325-335, 1998.
- Takken W, Scott TW, Bogers RJ. Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes. Proceedings of the Frontis Workshop on Ecological Challenges Concerning the Use of Genetically Modified Mosquitoes for Disease Control, Wageningen, The Netherlands. 243p, 2002.
- Tanaka K. Studies on the pupal mosquitoes of Japan. genus *Lutzia*, with establishment of two subgenera, *Metaltutzia* and *Insultutzia*. *Japan J System Entomol* 9: 159-169, 2003.
- Theobald FV. A monograph of mosquitoes. British museum (Natural History), London. 1903.
- Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey L. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287: 2474-2476, 2000.
- Tiedje JM, Colwell RK, Grossman YL, Hodson RE, Lenski RE, Mack RN, Regal PJ. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298–315, 1989.
- van Bortel W, Coosemans M. Suggesting new species? Comments on .Evidence for a new species of *Anopheles minimus* from the Ryukyu Archipelago, Japan.. *J Am Mosq Control Assoc* 19: 261-264, 2003.
- Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Sallum MA, Malafronte RS, Marrelli MT. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera, Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011.
- Walton C, Sharpe RG, Pritchard SJ, Thelwell NJ, Butlin RK. Molecular identification of mosquito species. *Biol J Linnean Soc* 68: 241–256, 1999.
- Wesson DM, Porter CH, Collins FH. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phyl Evol* 1: 253–269, 1992.
- White GB. Malaria vectors ecology and genetics. *Brit Med Bull* 38: 207-212, 1982.
- White GB. The identification of mosquitoes as vectors of malaria and filariasis. *Symp Brit Soc Parasitol* 17: 103–143, 1979.
- White GB. The place of morphological studies in the investigation of *Anopheles* species complexes. *Mosq Syst* 9: 1–24, 1977.
- Wilke ABB, Natal D, Gomes AC, Marrelli MT. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. *Rev Saúde Pública* 43: 869-874, 2009a.

- Wilke ABB, Nimmo DD, John OS, Kojin BB, Capurro ML, Alphey L, Marrelli MT. Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 17: 65-74, 2009b.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J Med Entomol* 32: 697-704, 1995.
- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst Biol* 54: 844-851, 2005.
- Wilson AC, Cann RL, Carr SM, Steven MC, George M, Gyllensten UB. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc* 26: 375- 400, 1985.
- Zavortink TJ. Classical taxonomy of mosquitoes – A memorial to John N. Belkin. *J Amer Mosq Control Assoc* 6: 593-599, 1990.
- Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, Linthicum KJ. Cytochrome *c* Gene and Protein Expression: Developmental Regulation, Environmental Response, and Pesticide Sensitivity in *Aedes aegypti*. *J Med Entomol* 45: 401-408, 2008.
- 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 ssociation with the midgut surface. *J Exp Biol* 204: 4157–4167, 2001.