

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Química

Centro de Tecnologia

Sheila Barbara Gutiérrez López

PRODUÇÃO DE UM BIOINSETICIDA BASEADO NA TÉCNICA DE RNA DE
INTERFERÊNCIA PARA O CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Rio de Janeiro

2017

Sheila Barbara Gutiérrez López

PRODUÇÃO DE UM BIOINSETICIDA BASEADO NA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA O CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientação: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Co-orientação: Rodrigo Volcan Almeida

Rio de Janeiro

2017

FICHA CARTALOGRÁFICA

López,Gutiérrez, Sheila Barbara, 1985

Produção de um bioinseticida baseado na técnica de RNA de interferência para o controle do mosquito da dengue/ Sheila Barbara Gutiérrez López.Rio de Janeiro: UFRJ, 2017. XVIII / 136f.: il.

Bibliografia p. 86-116

Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2017

Orientador: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Co-orientador: Rodrigo Volcan Almeida

1. RNAi 2. *Aedes aegypti* 3. dsRNA 4. Controle de vetores 5. Inseticida-Tese. I. Moreira, Mônica Ferreira (Orient.) II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Produção de um bioinseticida baseado na técnica de RNA de interferência para o controle do mosquito *Aedes aegypti*

Sheila Barbara Gutiérrez López

**PRODUÇÃO DE UM BIOINSETICIDA BASEADO NA TÉCNICA DE RNA DE
INTERFÊRENCIA PARA O CONTROLE DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Aprovada em ____ de maio de 2017

Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Doutora em Química Biológica / Instituto de Química / CCMN / UFRJ

Orientadora

Rodrigo Volcan Almeida

Doutor em Engenharia Química / Instituto de Química / CCMN / UFRJ

Co-orientador

Fernando Ariel Genta

Doutor em Bioquímica / Fundação Oswaldo Cruz / Instituto Oswaldo Cruz

Kátia Calp Gondim

Doutora em Ciências Biológicas / Instituto de Bioquímica Médica / CCS / UFRJ

Gabriela de Oliveira Paiva e Silva

Doutora em Química Biológica/ Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

Luciana Pizzatti Barboza

Doutora em Ciências Biológicas/ Instituto de Química / CCMN / UFRJ

Georgia Correa Atella

Doutora em Química Biológica/ Instituto de Bioquímica Médica/ CCS/ UFRJ

Suplente Externo

Danielle Maria Perpétua de Oliveira Santos

Doutora em Ciências Biológicas Instituto de Química / CCMN / UFRJ

Suplente Interno

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores e no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, pertencentes à Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso e co-orientação do professor Rodrigo Volcan Almeida, na vigência de auxílios concedidos pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) e CNPq-INCT- EM (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Entomologia Molecular).

AGRADECIMENTOS

- Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Meu Melhor Amigo, que mesmo sendo Perfeito se fez do meu tamanho e me mostrou o melhor e mais puro amor quando me deu o presente da vida e o perdão. Ele tem sido o ombro no qual tenho me apoiado, meu Guia e meu Pastor, Meu Primeiro Amor.
- À minha orientadora, Mônica: com você tenho aprendido muito acerca de perseverar, de não ter medo de errar.
- Agradeço ao professor Rodrigo, por toda sua ajuda para a realização desse projeto, pelos valiosos conselhos, pela sua compreensão e paciência.
- A professora Isabela Ramos pela sua colaboração com a microscopia.
- Agradeço à minha mãe, uma mulher íntegra e corajosa, cuja fé e virtude tem me inspirado sempre.
- Agradeço ao meu pai, sua perseverança, inteligência e bom humor me acompanham sempre. A saudade é o amor que fica depois da partida.
- A minha querida mamãe brasileira, Tânia, obrigada por estar sempre presente e pelas conversas de arte, literatura e da vida!
- Agradeço à minha tia Ana Esther, por salientar sempre o valor da família e sua fortaleza de espírito. A Yoli, minha pequena, obrigada pelo seu carinho.
- Continuo com a família, mas dessa vez, não a de sangue, e sim aquela à qual estamos unidos por laços de amor fraterno: à minha irmã Erika, amiga sincera em todo momento, conselheira, na ciência e na vida também. Sempre quis ter uma irmã, e graças a Deus, agora tenho uma verdadeira irmã em você.
- Ao Anton, pela paciência, por me exortar e animar sempre e pela valiosa ajuda com o conhecimento de *softwares*.
- À Camila, minha peluda companhia durante a escrita e anjinho nas horas difíceis.
- Ao Jimmy, o nosso ilustre caribeño, amigo querido. Ao Rafa e ao resto dos integrantes da Unidade de Proteômica, por sempre me abrirem as portas.
- Também agradeço ao resto da equipe LaBBMOVE: Professora Ana Cláudia, Thayane, muito obrigada pela sua paciência e perda de horas de sono com o meu portunhol, e pelas conversas no busão! Dani e a Nath, obrigada pela amizade. Thiaguito, Salles, Víctor e outros que foram parte de nosso lab. Com vocês aprendi e me diverti muito! A companhia de vocês fez tudo mais legal!

- Ao João Vítor, Fernando e Dani Souza, por sua capacidade de questionar sempre, compromisso com a ciência e sua sede de conhecimento e dedicação, aprendi muito com vocês.
- Aos meus amigos do LaMMP, em especial, Rosane e Wilber, obrigada pela amizade sincera e a disposição para me ajudar sempre.
- Aos meus queridos do LABEP: Rafa, Bia, Luiz, Carol, Leo, Gui e todos, muito obrigada meus queridos vizinhos!
- Gostaria de agradecer à Professora Luciana Pizzatti, por me permitir o uso dos equipamentos do laboratório e as meninas do LABMOPS: Gabi, Nicole, Bruna e Letícia, por sempre me receberem com tanto carinho.
- Aos professores da banca, por terem aceitado o convite e pelos seus valiosos conselhos para melhorar o trabalho.
- À Rosangela e a equipe de limpeza, por fazer o ambiente do lab mais agradável.
- Aos colegas do IBEX por sua colaboração para manter a nossa colônia.
- A todos os que têm me ensinado e ajudado, até mesmo com um sorriso, minha mais sincera gratidão.

RESUMO

LÓPEZ, Sheila Barbara Gutiérrez. Produção de um bioinseticida baseado na técnica de RNA de interferência para o controle do mosquito *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Os vírus da dengue, chikungunya, zika e febre amarela causam doenças febris graves, que afetam regiões tropicais e subtropicais do mundo, levando à morbidez e à mortalidade. Estes vírus e outros agentes etiológicos de doenças graves são transmitidos pelo vetor mosquito *Aedes aegypti*. Uma das principais estratégias de controle tem sido o uso de inseticidas, mas o aumento da resistência do vetor aos diferentes compostos usados aponta a necessidade de mudar para estratégias biorracionais, específicas da população de insetos alvo do controle. A quitina, polímero de N-acetilglicosamina, abundante em estruturas importantes que garantem a sobrevivência, encontrada em todos os estágios do desenvolvimento dos insetos, é um bom alvo. As quitinas sintases A e B (CHS) são as enzimas chaves na biossíntese do polímero da quitina em tecidos de origem ectodérmica e matriz peritrófica, respectivamente. Utilizando a técnica de RNA interferente (RNAi) é possível o silenciamento gênico específico, diminuindo desta forma a expressão da proteína alvo. O objetivo deste trabalho foi procurar uma alternativa biológica, delineando um possível bioinseticida baseado na técnica de RNAi para o controle da população do mosquito. Para isso, foram produzidos dsRNAs *in vitro* que tem como alvo cinco diferentes regiões nas sequências das CHS A e B. Para a produção do dsRNA *in vivo*, as diferentes regiões alvo para cada CHS foram clonadas no vetor de expressão L4440 e o dsRNA foi expresso na bactéria *Escherichia coli* cepa HT115 (deficiente de RNase III), utilizando IPTG 1mM ou lactose 10 g/L. Foi verificada a atividade larvicida dos diferentes dsRNAs, produzidos *in vitro*, prova de conceito, e *in vivo*, colocando-os na água de criação de larvas L1. No grupo tratado com dsRNAE, produzido *in vitro* foi observada uma taxa de mortalidade significativa, 90%, associada à redução da expressão gênica das CHSA e B, de 50 e 80%, respectivamente. No tratamento com dsRNAE produzido *in vivo*, o lisado bacteriano produzido mediante indução com IPTG 1mM e previamente inativado por choque térmico, observou-se uma mortalidade significativa, em torno de 40%, redução da expressão dos genes das CHSA e B em torno de 50%, assim como alterações morfológicas que se mantiveram ao longo do desenvolvimento do inseto sobrevivente. Além disso, foi testada a capacidade adjuvante do lisado bacteriano produtor de dsRNAE, o bioinseticida, em conjunto com o diflubenzuron (DFB), um inibidor da síntese de quitina. Verificou-se efeito adjuvante, traduzido em maior mortalidade, quando administrado

o bioinseticida em conjunto com o DFB, sendo 1,7 vezes maior no que diz respeito à administração do DFB sozinho. O bioinseticida, inativado com clorexidina e utilizando lactose 10 g/L para indução da expressão, mostrou também atividade larvicida e alterações no desenvolvimento do inseto, mesmo sendo administrado em estádios avançados da fase larval. Foi constatada uma diminuição do conteúdo de quitina na cutícula e no intestino das larvas tratadas com o bioinseticida, inclusive, com duas doses menores de administração. Estes resultados apontam novas alternativas para a redução da população do mosquito. Pois, o produto desenvolvido nesse trabalho poderia ser usado sozinho ou em conjunto com outros inseticidas nas estratégias de controle de populações de vetores de doenças.

Palavras chaves: *Aedes aegypti*, inseticida, controle de vetor, RNAi.

ABSTRACT

LÓPEZ, Sheila Barbara Gutiérrez. Produção de um bioinseticida baseado na técnica de RNA de interferência para o controle do mosquito *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Dengue, chikungunya, zika and yellow fever viruses are etiological agents of severe diseases, responsible for high rate of human morbidity and mortality, mainly in tropical and subtropical countries, and are transmitted by *Aedes aegypti* mosquito's bite. Due to increasing insecticide resistance among mosquito's populations, it has become necessary to explore biorrational approaches in order to specifically control the target vector population. Chitin, a polymer of N-acetylglucosamine is a good target for biorrational control. It can be found as an abundant component of important structures that ensure survival at all stages of insect development. Chitin synthases A and B (CHS) are key enzymes in the biosynthesis of the chitin polymer in tissues of ectodermal origin and peritrophic matrix, respectively. The use of RNA interference techniques (RNAi) has made possible to achieve specific knockdown of target protein expression levels. The aim of this work was to develop a new product, a bioinsecticide, as a potential strategy to mosquito population control. The dsRNA were synthesized *in vitro*, targeting five different regions at CHSA and B sequences. The same sequences were cloned in L4440 plasmids for expression of dsRNAs in *E. coli* HT115 (RNase III deficient) induced with IPTG 1mM or lactose 10 g/L. Larvicidal activity was verified with all dsRNAs produced *in vitro* as proof of concept and, *in vivo*, placing *E. coli* lysate containing dsRNA directly in L1 larvae water. The group treated with dsRNAE produced *in vitro*, showed 90% significant mortality related to the 50 and 80% reduction of CHSA and B gene expression levels, respectively. The group treated with *E. coli* lysate containing dsRNAE after induction with 1mM IPTG and previously inactivated by thermal shock exhibited significant mortality, around 40%, and reduction of 50 % CHSA and B gene expression. Morphological changes that were maintained throughout the development of the surviving insects were also observed. In addition, the adjuvant ability of the bacterial lysate producing dsRNAE (bioinsecticide) together with diflubenzuron (DFB), an inhibitor of chitin synthesis, was tested. The association of DFB with the bioinsecticide induced a 1.7 times higher mortality rate, in comparison with DFB treatment. The bioinseticida produced by induction with lactose 10 g / L and inactivated with chlorhexidine also evinced larvicidal activity and delay in insect's development, even when administered at advanced stages of the larval phase. A

decrease in the chitin content of cuticle of the bioinsecticide-treated larvae was observed even with two lower doses of administration by microscopy techniques. Such results point to new alternatives for reducing mosquito population. The product developed in this work could be used alone or in conjunction with other insecticides in control strategies of disease vector populations.

Keywords: *Aedes aegypti*, insecticide, vector control, RNAi.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 -	Estágios de desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	6
Figura 2 -	Distribuição geográfica do vetor <i>Aedes aegypti</i> no mundo	7
Figura 3 -	Vias de biossíntese e degradação de quitina	22
Figura 4 -	Esquema geral do mecanismo de RNA de interferência (RNAi)	26
Figura 5 -	Representação esquemática do fluxograma geral da proposta de produção e avaliação do bioinseticida	44
Figura 6 -	Predição da presença de domínios transmembranares utilizando as sequências de aminoácidos das CHSs do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	46
Figura 7 -	Alinhamento das sequências de aminoácidos encontradas para CHSA e B de <i>Ae. aegypti</i> com outras sequências de CHSs de outros organismos	47
Figura 8 -	Seleção das regiões alvo do silenciamento gênico nas sequências de cDNA de CHSA e B	48
Tabela 1 -	Oligonucleotídeos que delimitam as sequências usadas como alvo do silenciamento nas CHSA e B	49
Figura 9 -	Taxa de mortalidade (%) no 3º dia após tratamento com os dsRNAs produzidos <i>in vitro</i>	50
Figura 10 -	Expressão relativa dos genes <i>CHSA</i> e <i>B</i> no grupo tratado com dsRNAE produzido <i>in vitro</i>	51
Figura 11 -	Taxa de mortalidade (%) no 3º dia após tratamentos com <i>E. coli</i> recombinante, lisada por ultrassom, contendo os diferentes dsRNA	52
Figura 12 -	Expressão relativa dos genes <i>CHSA</i> e <i>B</i> no grupo silenciado com o dsRNAE produzido por via recombinante comparado com os controles da experiência	53
Figura 13 -	Taxa de mortalidade (%) no 3º dia após tratamentos com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativado por choque térmico ou adição de etanol 75%	54
Figura 14 -	Expressão relativa dos genes <i>CHSA</i> e <i>B</i> no grupo silenciado com o dsRNAE produzido por via recombinante.	55

- Figura 15 - Imagens representativas de mosquitos adultos machos dos grupos controle (à direita) e tratados com lisado bacteriano contendo dsRNAE inativada com calor (à esquerda). 56
- Figura 16 - Efeito adjuvante do inseticida diflubenzuron (DFB) com a bactéria produtora do dsRNAE, lisada por choque térmico. 57
- Figura 17 - Inativação com clorexidina (Asseptcare[®]) na concentração 1% (v/v) à esquerda e 0.5% (v/v) à direita em solução aquosa mediante o cultivo em LB Ágar 58
- Figura 18 - Integridade da dupla fita de RNA (dsRNAE) depois de inativação por choque térmico (à esquerda) e utilizando solução de clorexidina 0.5% 59
- Figura 19 - Curva de crescimento de *E. coli* HT115 (expressão de dsRNAE) após indução com lactose 10 g/L ou IPTG 1mM durante 5 h 60
- Figura 20 - Comparação da expressão da dupla fita de RNA (dsRNAE) utilizando lactose 10 g/L e IPTG 1 mM. 60
- Figura 21 - Taxa de mortalidade (%) de larvas L1, 24 e 48h após tratamento com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativação: clorexidina 0.5%; indução: lactose 10 g/L ou IPTG 1 mM. 61
- Figura 22 - Taxa de mortalidade (%) de larvas de 4^o estágio, 24 e 72h após tratamento com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativação: clorexidina 0.5%; indução: lactose 10 g/L. 62
- Figura 23 - Expressão relativa dos genes *CHSA* e *B* em larvas de 4^o estágio silenciadas com o dsRNAE produzido por via recombinante, presente no lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina 63
- Figura 24 - Taxa de pupação (%) após serem tratadas no 4^o estágio do desenvolvimento, com dsRNAE presente no lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina 64
- Figura 25 - Taxa de larvas que evoluíram ao estágio adulto (%) após serem tratadas no 4^o estágio do desenvolvimento, com dsRNAE presente no lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina 65
- Figura 26 - Taxa de mortalidade de larvas de 1^o estágio tratadas com bioinseticida inativado com solução de clorexidina, 24 horas após os tratamentos com as três concentrações do bioinseticida 66

- Figura 27 - Expressão relativa dos genes *CHSA* (à esquerda) e *B* (à direita) em larvas de 1º estágio silenciado com o bioinseticida após tratamento com as três diferentes concentrações de bioinseticida 67
- Figura 28 - Fenótipo de silenciamento das larvas tratadas com o bioinseticida 72h após o tratamento. Microscopia óptica 68
- Figura 29 - Fenótipo de silenciamento das larvas tratadas como bioinseticida no 4º estágio. Microscopia de fluorescência (sonda FITC-WGA) 69
- Figura 30 - Hibridação do dsRNAE marcado com sonda fluorescente e hibridação *in situ* (FISH). 71
- Figura 31 - Integridade da dupla fita de RNA (dsRNA2718_3) depois de dois meses de estocagem a temperatura ambiente 72

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP- Adenosina Trifosfato

BLAST - “Basic Local Alignment Search Toll”

cDNA- DNA complementar

CHKV - Vírus da Chikungunya

CHSA- Quitina Sintase A

CHSB- Quitina sintase B

CIV- Controle integrado de vetores

DDT- Diclorodifeniltricloroetano

DENV- Vírus da dengue

DFB- Diflubenzuron

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DOPA- 3,4-dihidroxifenilalanina

dsRNA- “double-stranded RNA” (RNA dupla-fita)

FISH- “Fluorescence in situ Hybridization” (Fluorescência e hibridação in situ)

FITC-WGA- Isotiocianato de Fluoresceína ligado à Aglutinina de Germe de Trigo

GABA- Ácido γ -aminobutírico

GFTA- Glutamina-fructose-6-fosfato-aminotransferase

GST - Glutathiona-S-transferase

HIV-1- Vírus da Imunodeficiência Humana 1

IPTG- Isopropil β -D-1-Tiogalactopiranosídeo

kDa- Kilodaltons

kdr - Knockdown Resistance

LB- Meio Lúria-Bertani

MP- Matriz peritrófica

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAHO- “Pan American Health Organization” (Organização Panamericana da Saúde)

PCR - Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

qPCR- quantitative Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)

RNA- Ácido Ribonucléico

RNAi- RNA de interferência

mRNA- Ácido Ribonucléico mensageiro

RNAse III- Ribonuclease III

RPM- Rotações por Minuto

RpRd- RNA Polimerase dependente de RNA

RT-PCR- Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

siRNA- “small interfering RNA”

WHO- “World Health Organization”

ZIKV- Vírus da Zika

SUMÁRIO

	Pg.	
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Principais doenças transmitidas pelo mosquito <i>Aedes aegypti</i>. Clínica, epidemiologia e tratamento	1
1.2	Características do inseto vetor	5
1.3	Estratégias de controle	8
1.3.1	Inseticidas químicos	10
1.3.2	Métodos alternativos de controle	12
1.4	Resistência dos insetos aos inseticidas	16
1.5	Metabolismo da quitina	18
1.6	Mecanismo de silenciamento por RNA de interferência (RNAi)	23
1.7	Objetivos	30
1.7.1	Objetivo Geral	30
1.7.2	Objetivos específicos	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Condições de criação dos mosquitos	32
2.2	Alimentação e manutenção dos insetos	32
2.3	Avaliar a eficácia de duplas fitas de RNA, produzidos, <i>in vitro</i> em larvas de mosquito <i>Ae. Aegypti</i> (prova de conceito)	32
2.3.1	Busca dos genes de CHSs no genoma do mosquito <i>Ae aegypti</i>: seleção das regiões alvo do silenciamento	32
2.3.2	Preparação do dsRNA <i>in vitro</i>	34
2.3.3	Indução do silenciamento com os dsRNAs produzidos <i>in vitro</i>: prova de conceito	34
2.4	Obtenção de um sistema de expressão de dsRNA em células de <i>E.</i> <i>coli</i>, cepa HT115	35
2.4.1	Desenho das construções para produção de dsRNA <i>in vivo</i>	35
2.4.2	Expressão dos dsRNAs por via recombinante no sistema de expressão <i>E. coli</i> HT115. Comparação de indutores da expressão de dsRNA: IPTG e lactose	35
2.4.3	Curva de peso seco da biomassa para a determinação da	36

	concentração celular	
2.5	Avaliação da capacidade bioinseticida do lisado de <i>E. coli</i> recombinante, produtora de dsRNA	37
2.5.1	Inativação da biomassa bacteriana produtora de dsRNA: choque térmico e etanol 75%	37
2.6	Avaliação do tipo de indutor da expressão de dsRNA	38
2.7	Ação adjuvante do lisado bacteriano contendo dsRNAE e diflubenzuron	40
2.8	Capacidade de indução do fenótipo de silenciamento do bioinseticida em estágios avançados do desenvolvimento do inseto	40
2.9	Efeito da concentração do bioinseticida na indução do fenótipo de silenciamento	41
2.10	Avaliação do fenótipo dos insetos após o tratamento com o bioinseticida utilizando técnicas de microscopia e biologia molecular	41
2.10.1	Quantificação relativa da redução da expressão dos genes <i>CHSA</i> e <i>B</i> após a indução do silenciamento	41
2.10.2	Microscopia	42
2.10.3	Microscopia de fluorescência	42
2.10.4	Fluorescência por hibridação <i>in situ</i> (FISH)	43
2.11	Estabilidade do bioinseticida em condições ambientais. Prova de estocagem	43
3	RESULTADOS	45
3.1	Eficácia dos dsRNA, produzidos, <i>in vitro</i> , para induzir o silenciamento de genes de <i>CHSs</i> em larvas de <i>Ae. aegypti</i> , prova de conceito	45
3.1.1	Caracterização <i>in silico</i> das <i>CHSs</i> e seleção das regiões alvo do silenciamento	45
3.2	Indução do silenciamento com os dsRNAs produzidos <i>in vitro</i> : Prova de conceito	49
3.3	Atividade bioinseticida, de <i>E. coli</i> recombinante contendo dsRNAs correspondentes às regiões alvo nos genes de <i>CHSA</i> e <i>B</i> .	51
3.4	Estudo de métodos de inativação da biomassa bacteriana produtora de dsRNA: choque térmico e etanol 75%	53

3.5	Avaliações do potencial do bioinseticida como adjuvante de inseticida associado com diflubenzuron, inibidor da síntese de quitina	56
3.6	Diminuição dos custos de produção do bioinseticida: estudo de métodos de inativação da bactéria e indutores da expressão de dsRNA	58
3.6.1	Inativação da <i>E. coli</i> recombinante com solução de clorexidina comercial	58
3.7	Comparação da atividade larvicida do bioinseticida com dois indutores para a expressão de dsRNAE: IPTG 1mM e lactose 10 g/L	59
3.8	Comprovação da capacidade de indução do fenótipo de silenciamento do bioinseticida em estágios avançados do desenvolvimento do inseto	62
3.9	Efeito da concentração do bioinseticida no silenciamento gênico das CHSA e B	65
3.10	Observação da alteração da morfologia das larvas após tratamento com bioinseticida	67
3.11	Diminuição do conteúdo de quitina, relacionada com o silenciamento das CHSA e B, utilizando sonda fluorescente de ligação específica à quitina (FITC-WGA)	68
3.12	Diminuição do transcrito de CHSB relacionada ao silenciamento gênico, utilizando a técnica de fluorescência por hibridação <i>in situ</i> (FISH)	70
3.13	Comprovação da estabilidade do bioinseticida em condições ambientais. Prova de estocagem	71
4	DISCUSSÃO	73
5	CONCLUSÃO	84
6	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Principais doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*. Clínica, epidemiologia e tratamento

O mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) é o principal vetor dos agentes etiológicos da dengue, da febre Amarela, da febre Zika, da febre Chikungunya.

A dengue é uma doença febril que pode manifestar quadro clínico e progressão diferente entre os pacientes. É responsável por numerosos casos de morbidez e mortalidade em regiões endêmicas no mundo. Aproximadamente 390 milhões de pessoas são infectadas anualmente, dessas, 96 milhões tem manifestações clínicas com algum grau de severidade e 200.000 morrem por causa de manifestações clínicas severas (BHATT et al., 2013).

O vírus da dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Possui como material genético uma fita simples de RNA, polaridade positiva. O nucleocapsídeo viral é constituído pelas proteínas M (proteínas de membrana) e E (proteína de envelope), além de sete proteínas não estruturais. Destas proteínas, a proteína não estrutural 1(NS1) é capaz de induzir resposta de células T no indivíduo infectado e tem sido usada como marcador diagnóstico de infecção. O DENV apresenta quatro sorotipos, que são conhecidos como DENV1-4. Estes sorotipos são similares quanto à antigenicidade, mas a infecção com apenas um deles não confere proteção cruzada contra o resto dos sorotipos em longo prazo (DIAMON, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

De acordo com classificação clínica para definição de casos, a doença por dengue pode ser: não severa ou severa. De modo geral, a sintomatologia da forma não severa consiste em febre alta, mialgia, artralgia, dor retroorbital, cefaléia, anorexia, náuseas, vômitos, prova do torniquete positiva, *rush* cutâneo, leucopenia e outros sinais de alarme. Estes sintomas, no entanto, podem evoluir à forma severa, com tendência a hemorragias, dores abdominais intensas, alteração do estado de consciência, acumulação de líquido ou sangramento, dificuldade respiratória, alteração dos níveis de transaminases hepáticas, pulso rápido e fraco e alterações em órgãos internos podendo evoluir ao choque e à morte (BELTRÁN-SILVA et al, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009)

A doença por infecção com vírus da Zika (ZIKV) possui sintomas inespecíficos, muito semelhantes aos sintomas das doenças anteriormente mencionadas, são autolimitados e a

maioria das pessoas infectadas não apresenta sintomas por ZIKV na Ásia e no Caribe. Em 2009, foi registrado um surto na Micronésia. Em 2015, foram reportados vários casos de infecção por ZIKV no Brasil, América do Sul, América Central e Caribe. Atualmente, 39 países das Américas apresentam transmissão ativa deste vírus (ATTAWAY et al, 2017; WHO/PAHO, 2016).

Alguns dos sintomas mais frequentes são: exantema maculopapular, febre e conjuntivite não purulenta. ZIKV possui um neurotropismo acentuado e por isso, causa complicações associadas à infecção como aparição da Síndrome de Guilláin-Barré e casos de microcefalia em neonatos (CAO-LORMEAU et al, 2016; WHO/PAHO, 2016).

O ZIKV possui genoma com características comuns aos genomas do gênero *Flavivirus*, com um RNA de fita simples e polaridade positiva, com um único marco aberto de leitura para 10 proteínas, três estruturais CprM, M, E e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) com funções no ciclo de replicação viral e na resposta imunopatogênica no hospedeiro. A partícula viral com capacidade de infecção foi isolada do sêmen, 69 dias após o início dos sintomas, sugerindo a via sexual como potencialmente efetiva para a transmissão do vírus (ARMSTRONG e HOU, 2017; MOREIRA et al, 2017). Além do mosquito *Ae. aegypti*, este vírus tem sido isolado de *Aedes apicoargenteus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes vitattus* e *Aedes furcifer*.

A febre chikungunya é uma doença viral caracterizada por aparição de febre repentina, rush cutâneo e dores articulares. O termo chikungunya provém da raiz verbal kungunyala, e significa "tornar-se dobrado ou contorcido", em referência à aparência curvada dos pacientes, motivada pelas intensas dores articulares e musculares, características da doença. É causada pelo vírus chikungunya (CHKV). Em 2015 a Organização Panamericana da Saúde reportou 693.489 casos suspeitos de infecção pelo o CHKV e 37.480 casos confirmados. No início de 2016 houve um decréscimo na frequência de infecção. A partir de 18 de março foram reportados pela mesma organização 31.000 casos, sendo um número menor quando comparado ao mesmo período no ano anterior (BELTRÁN-SILVA et al, 2016; WHO/PAHO, 2016). O genoma deste vírus consiste em uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva e pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* (WHO/PAHO, 2016). Têm sido identificadas três linhagens de CHKV, com características antigênicas diferentes: linhagem da África ocidental (WA, siglas em inglês), linhagem da África Centro Oriental (ECSA, siglas em inglês) e linhagem da Ásia (POWERS et al, 2000).

Os sintomas da doença por chikungunya são caracterizados pela aparição súbita de febre alta associada à poliartralgia, mialgia/artralgia e dor de cabeça em 76-100% dos infectados e em casos mais severos, aparecem manifestações hemorrágicas como, por exemplo, *rush* cutâneo. Alguns pacientes podem apresentar manifestações não usuais como complicações cardíacas e neurológicas, assim como hipertensão arterial (ARMSTRONG e HOU, 2017; BORGHERINI et al, 2007; ECONOMOPOULOU et al, 2009). Além disso, pessoas com sintomas pré-existent de dores nas articulações possuem predisposição para desenvolver reumatismo crônico após a infecção viral (JAVELLE et al, 2015). Indivíduos infectados em idades extremas da vida, como neonatos e idosos, são mais propensos a desenvolver a forma mais severa da doença (ECONOMOPOULOU et al, 2009). As manifestações da infecção por este vírus em neonatos incluem anomalias neurológicas, sangramento e doenças cardíacas. O estudo denominado CHIMERE, reportou manifestações severas da infecção quando adquirida *in útero*. Neste estudo, foram observadas convulsões em alguns pacientes, que necessitaram de ventilação mecânica e juntamente foram confirmados casos de encefalite utilizando o exame de ressonância magnética nuclear (GÉRARDIN et al, 2014).

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, de curta duração (no máximo 10 dias), gravidade variável, causada pelo vírus da febre amarela (vírus RNA do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), que ocorre na América do Sul e na África. As primeiras manifestações da doença são repentinas: febre alta, calafrios, cansaço, dor de cabeça, dor muscular, náuseas e vômitos. Na forma mais grave da doença, podem ocorrer insuficiências hepáticas e renais, icterícia (olhos e pele amarelados), manifestações hemorrágicas e cansaço intenso. O vetor da febre amarela é principalmente o mosquito do gênero *Haemagogus* (ciclo silvestre). Já no meio urbano, a transmissão se dá através do mosquito *Ae. aegypti* (o mesmo vetor da dengue). A infecção acontece quando uma pessoa que nunca tenha contraído a febre amarela ou tomado a vacina circula em áreas florestais e é picada por um mosquito infectado. Ao contrair a doença, a pessoa pode se tornar fonte de infecção para o mosquito *Ae. aegypti* no meio urbano (RAFFERTY et al, 2013; THOMAS, 2016). Em julho de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) notificou 876 casos confirmados de febre amarela em Angola e 68 casos confirmados na República Democrática do Congo, dos quais 59 foram importados da Angola. A OMS também notificou surtos não relacionados com a situação da Angola em sete países, na mesma época, entre eles, o Brasil.

Atualmente não existem tratamentos eficazes para estas arboviroses. A literatura dispõe de vários estudos que descrevem diversos compostos que tem mostrado atividade antiviral contra alguns destes vírus, mas até o momento o sistema de saúde não conta com nenhum fármaco licenciado para estes fins (PACCA et al, 2017; RAUSCH et al, 2017)

Até o passado recente, nenhuma destas doenças virais transmitidas pelo mosquito possuíam vacinas licenciadas ou tratamentos antivirais eficazes. Recentemente, a divisão de vacinas Sanofi Pasteur, da multinacional farmacêutica Sanofi, anunciou o sucesso do seu candidato quimérico contra a doença dengue, distribuído no Brasil com o nome comercial DENG VAXIA®. A proposta da Sanofi Pasteur consiste na imunização simultânea dos quatro sorotipos virais utilizando o vírus quimérico recombinante e atenuado 17-D da febre amarela. A vacina demonstrou eficácia em casos sintomáticos confirmados de dengue durante a fase ativa de vigilância (mais de 25 meses após a primeira dose). Esta eficácia foi demonstrada em dois estudos de fase III em 10 países de América Latina e Ásia, tais como Indonésia, Vietnã, Filipinas, Brasil, Colômbia, Honduras, México e Porto Rico (CAPEDING et al, 2014; VILLAR et al, 2014). Porém, o custo da vacina ainda é elevado e os países com maior demanda, como por exemplo, o Brasil não possui os recursos necessários para fornecer o esquema de vacinação completo à população pelo Sistema Único de Saúde. Além disso, são necessários estudos de longa prospecção para verificar a eficácia da vacina em diferentes cenários epidemiológicos (IP et al., 2017).

Para febre amarela, existe uma vacina usada na prevenção contra a infecção, porém esta apresenta contra-indicações importantes, não podendo ser administrada em crianças abaixo de quatro meses, pelo risco de provocar encefalite viral e em pessoas com imunodeficiência resultante de doenças ou em terapia para infecção pelo HIV/AIDS (AVELINO-SILVA et al, 2016). Também foi descrito um caso de doença neurotrópica associada à vacina (FLORCZAK-WYSPIAŃSKA et al, 2016) e não é recomendada a administração em pessoas com disfunção do timo (retirada cirúrgica ou doenças como miastenia gravis, síndrome de DiGeorge ou timoma) e em geral doenças viscerotrópicas (THOMAS, 2016). Apesar da disponibilidade da vacina para prevenção da infecção com o vírus, a OMS manifestou sua preocupação devido à persistência da transmissão, particularmente nas províncias com maior densidade populacional e pouca disponibilidade de vacina, sendo necessário adotar um protocolo de dose fracionada (em inglês, *fractioning dose*) para conter a situação nesses países (WHO/PAHO, 2016).

Não havendo terapias efetivas para os sorotipos do DENV, ZIKV e CHKV, e também pelas contra-indicações da vacina da febre amarela e pelo alto custo da vacina contra a dengue, recentemente desenvolvida, o combate ao vetor continua sendo a principal forma para evitar a disseminação destas doenças.

1.2 Características do inseto vetor

O mosquito *Ae. aegypti* (Fig. 1) é o principal vetor da dengue e outras arboviroses no Brasil; este vetor pertence ao Reino *Animalia*, Filo *Arthropoda*, Subfilo *Hexapoda*, Classe *Insecta*, Ordem *Diptera*, Família *Culicidae*, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia*. É um inseto holometábolo, de hábitos oportunistas e que vive dentro ou nas redondezas de residências ou locais frequentados por seres humanos. Este inseto possui corpo de cor escura, com faixas brancas nos segmentos laterais do abdômen e nas patas. As principais diferenças na aparência entre machos e fêmeas estão no tamanho dos palpos maxilares e a ornamentação das antenas: os machos possuem palpos maiores e antenas com maior número de cerdas (LOPES, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O ciclo de vida deste inseto compreende quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 1). A fêmea deposita seus ovos em locais úmidos. Quando os ovos entram em contato com a água, as larvas eclodem após algumas horas, mas eles podem permanecer até 450 dias após a postura em locais secos e ainda permanecerem viáveis. Esta característica permite a disseminação do vetor. Após a eclosão dos ovos os recém-nascidos passam por quatro estádios de desenvolvimento (primeiro estágio ou L1, segundo estágio ou L2, terceiro estágio ou L3 e quarto estágio ou L4), em um período de aproximadamente sete dias, e então entram no estágio de pupa. Estas sofrem metamorfose e dão origem à forma adulta alada do inseto que apresenta maturidade reprodutiva e é capaz de transmitir as doenças. A regulação da metamorfose do inseto é realizada pela ação da ecdisona, hormônio chave no controle do desenvolvimento de insetos: desenvolvimento de embriões, ecdise, metamorfose e desenvolvimento adulto (HORODYSKI, 1989; NITA et al 2009; MUTHUKRISHNAN et al, 2016).

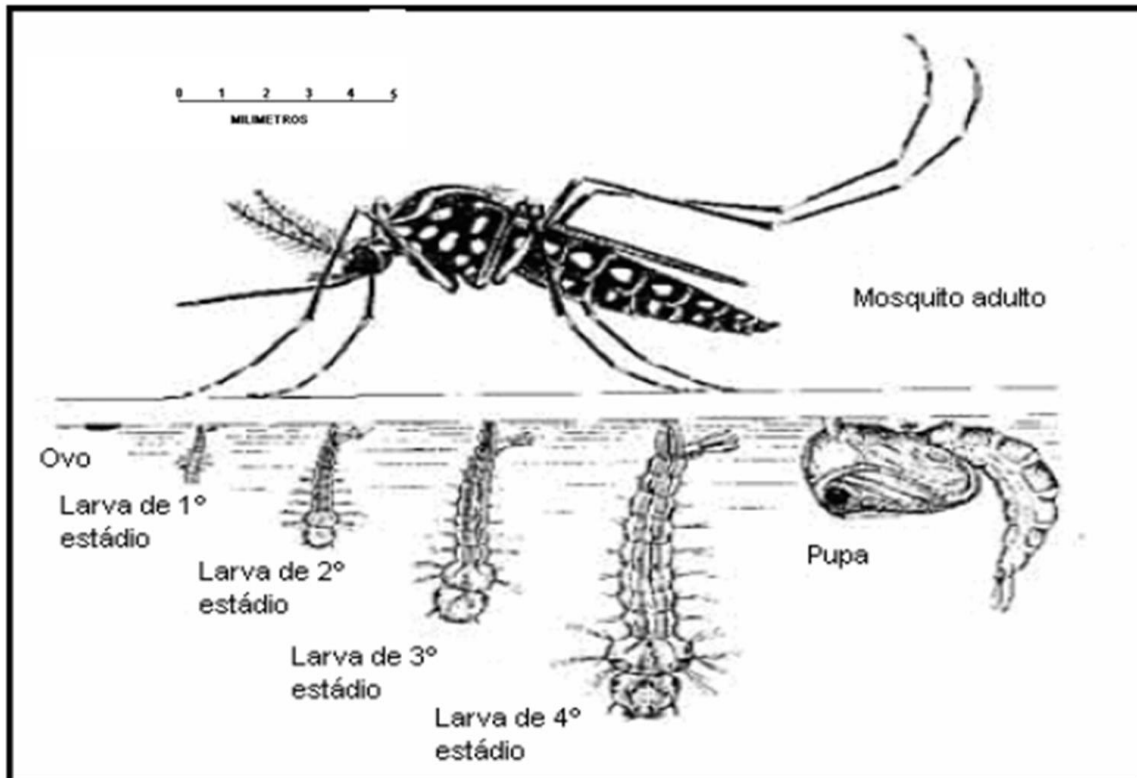


Figura 1. Estágios de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: www.cecom.unicamp.br/dengue/mosquito.html

Durante toda a fase adulta, os mosquitos, fêmeas e machos, se alimentam de seiva, mas as fêmeas da espécie precisam do repasto sanguíneo para produção dos ovos. A quantidade de ovos que uma fêmea é capaz de colocar depende da quantidade de sangue ingerida, colocando em média 120 ovos a cada postura, sendo dispersos em diversos locais, essa postura particionada aumenta a chance de sobrevivência da espécie vetora (CONSOLI, 1994; FORATTINI, 2002). O hábito hematófago da fêmea, para obtenção de nutrientes necessários para a produção de ovos é fundamental na transmissão das doenças virais provocada pelo mosquito *Ae. aegypti*, pois, no momento do repasto, a fêmea se infecta com os diferentes vírus e posteriormente, os transmite. As fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* são antropofílicas, com hábitos domésticos e diurnos. A estreita associação dessa espécie com o homem torna o mosquito essencialmente urbano, apesar de existirem notificações de surtos de dengue em regiões rurais (MEHENDALE et al, 1991; NGUYEN et al, 2001).

O dióxido de carbono liberado na respiração e o ácido láctico presente no suor são exemplos de substâncias que possuem efeito de atração para o mosquito. Estes compostos, exalados por vertebrados, atraem a fêmea para realizar o repasto sanguíneo (FORATTINI, 2002; POH et al, 2017). Técnicas de *knockdown* e *knockout* de genes, como CRISPR/Cas9 e

RNAi, têm sido valiosas ferramentas para desvendar mecanismos e produtos gênicos associados ao comportamento do inseto na procura do hospedeiro (ERDELYAN et al, 2012; KISTLER et al, 2015) e dos sítios de oviposição (PELLETIER et al, 2010).

Com o desenvolvimento das técnicas de seqüenciamento de DNA, têm sido esclarecidos alguns pontos da chegada do mosquito *Ae. aegypti* às Américas. Embarcações vindas de Portugal e Espanha, trazendo escravos da África, traziam também mosquitos a bordo. Não é conhecido se a forma doméstica da doença foi adquirida na África Ocidental ou se já estava na Europa (POWELL, 2013). Um estudo de filogenia e genética utilizando insetos capturados em ilhas do Pacífico relacionou as migrações humanas, nesta área, com o surgimento das populações de *Ae. aegypti*, inferindo que o padrão encontrado é específico das condições de ilhas e de cada ecossistema em particular (CALVEZ et al, 2016). Outra espécie, *Ae. albopictus*, (SKUSE, 1894), reconhecida como transmissora da dengue em regiões do mundo como a Ásia e a África, foi introduzida no Brasil, e sabe-se que é um vetor em potencial (SERUFO et al, 1993). A figura 2 mostra a distribuição do vetor *Ae. aegypti* pelo mundo, evidenciando que existe uma grande área geográfica em risco de surtos e epidemias de dengue provocadas por quaisquer sorotipos.

Ae. aegypti map

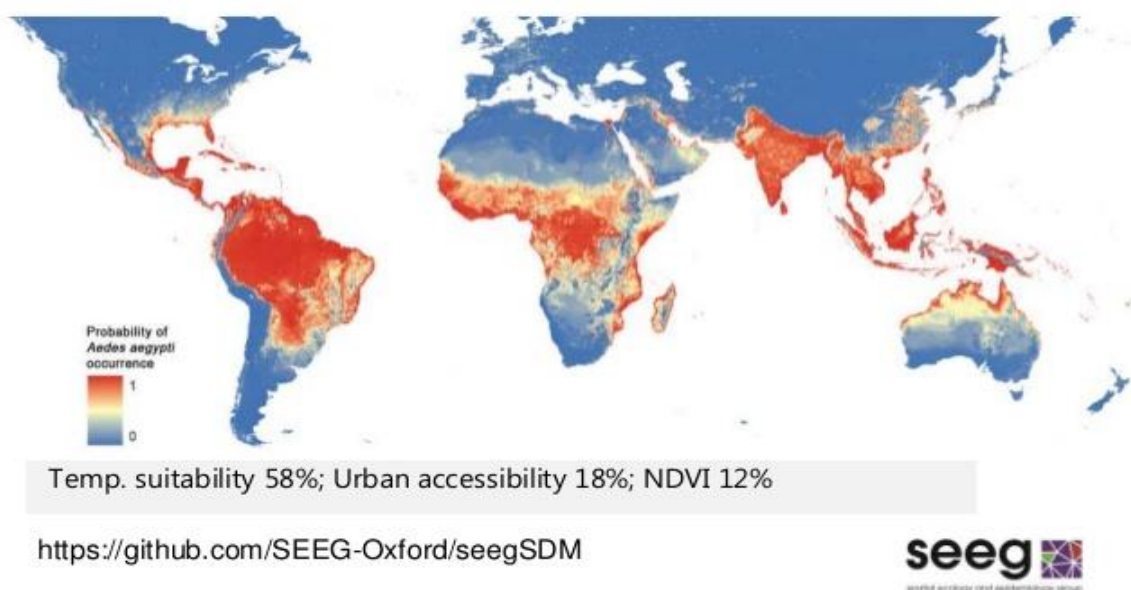


Figura 2. Distribuição geográfica do vetor *Aedes aegypti* no mundo.
<https://www.google.com.br/search?biw=1600&bih=745&tbm=isch&sa=1&q=aedes+aegypti+world+distribution>

A. albopictus é considerado um vetor secundário em relação ao *Ae. aegypti*, em termos de endemicidade, mas ele possui um papel relevante em áreas com emergência de dengue. Pois, estudos de infecção viral *in vitro*, realizados com ambas as espécies de mosquito, tanto uma espécie quanto a outra mostrou capacidade de se infectar nas condições testadas. Porém, utilizando pacientes infectados, as taxas de infecção na saliva de *Ae. aegypti* foram maiores quando comparada às taxas de infecção na saliva de *Ae. albopictus*, esta experiência é uma aproximação mais exata das condições reais ao que acontece à infecção pelo ciclo natural (WHITEHORN et al, 2015).

O espalhamento do *Ae. aegypti* fora da África precisou de adaptação das larvas para se desenvolverem em reservatórios gerados pelos humanos. Obviamente, isso significou mudanças no comportamento da oviposição, pois nos ambientes humanos, os mosquitos passaram a colocar ovos em reservatórios de metal, borracha e outros, ausentes no seu hábitat natural (TABACHNICK, 1991).

Nas cidades modernas, este mosquito encontrou um ambiente favorável para sua expansão, pois a urbanização acelerada gerou cidades deficientes em saneamento básico e ricas em criadouros artificiais. Por isso, uma das principais medidas para eliminação do vetor é diminuir o acúmulo de recipientes que possam servir como criadouros e locais de oviposição (CONSOLI, 1994; DONALÍSIO e GLASSER, 2002; VILLELA, 2016).

1.3 Estratégias de controle

O controle efetivo de insetos é uma empreitada complexa, não existindo um protocolo padrão que possa ser aplicado para uma determinada população de inseto, em qualquer região do mundo. Por isso, deve-se dispor de várias estratégias de controle para que a execução seja integrada, seletiva, econômica e adequada à realidade de cada região (BRAGA e VALLE, 2007).

O controle de insetos visa à redução de populações, com relevância econômica, em geral, insetos pragas de lavoura, de estoque e vetores de doenças. Para um controle mais efetivo é necessário conhecer fatores abióticos como regime climático, umidade, temperatura, pressão, intensidade de luz e período de chuvas do ecossistema em que se encontra a espécie que se deseja controlar. Conhecer os fatores bióticos, também é importante, aspectos básicos sobre a biologia e ecologia do inseto tais como o ciclo de vida, as relações de predatismo, as características de dispersão de população, os marcadores de resistência e as relações com

outros seres vivos com os quais convivem, são fundamentais para que o controle seja executado com sucesso (ARAÚJO, 2013).

O uso de substâncias para controlar populações de insetos nocivas à saúde humana é uma prática antiga. O emprego de enxofre inorgânico para o combate a insetos data de aproximadamente um milênio a.C. e posteriormente outros compostos químicos como o arsênio, arsenato, o ácido bórico também foram utilizados. Compostos de origem botânica que apresentavam capacidade de repelir ou matar insetos, como o piretro, a nicotina e a rotenona, passaram, então, a ser adotadas. A utilização de compostos extraídos de plantas como inseticida foi vantajosa, devido ao fato de que estes compostos apresentavam potência e seletividade no controle de insetos, mas por outro lado, o uso era limitado por sua disponibilidade e alto custo de obtenção (CASIDA e QUISTAD, 1998).

Para um procedimento racional, o controle seletivo deve ter como alvo uma particularidade fisiológica do inseto, preferencialmente, não encontrada em plantas e mamíferos hospedeiros. Os componentes bioquímicos ou vias bioquímicas que são únicos em insetos são considerados bons alvos para o controle, como apresentado neste trabalho. A iniciativa regional, que utiliza a estratégia de gestão integrada para a prevenção oferece uma abordagem mais promissora para o controle.

O Controle integrado de vetores (CIV) é a abordagem estratégica para o controle de vetores promovido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e inclui o controle do mosquito *Ae. aegypti*. Definido como "um processo racional para a utilização otimizada dos recursos para o controle de vetores de tomada de decisão", CIV considera cinco elementos-chave no processo de gestão, a saber: **1-** advocacia, mobilização social e legislação para promoção destes princípios em políticas de desenvolvimento de todas as agências, organizações relevantes e sociedade civil; a criação ou o reforço de controle regulamentar e legislativo para a saúde pública e o envolvimento das comunidades; **2-** colaboração dentro do setor da saúde e com outros setores considerando todas as opções dentro e entre os setores públicos e privados; planejamento e tomada de decisão delegada ao nível administrativo mais baixo possível; fortalecimento de comunicação entre os gestores de programas para o controle de doenças transmitidas por vetores e outros parceiros-chave; **3-** abordagem integrada para o controle da doença assegurando a utilização racional dos recursos disponíveis através da aplicação de uma abordagem de controle multi-doença; integração de métodos de controle de vetores químicos e não químicos; e integração com outras medidas de controle da doença; **4-**

tomada de decisão baseada em evidências, adaptando as estratégias e intervenções para vetor à ecologia local, epidemiologia e recursos, orientados por pesquisa operacional e objeto de acompanhamento e avaliação de rotina; 5- o reforço das capacidades, assim como o desenvolvimento de infra-estruturas essenciais, recursos financeiros e recursos humanos adequados aos níveis nacionais e locais para gerir CIV com base em uma análise da situação. (WHO, 2014).

1.3.1 Inseticidas químicos

Em 1955, a OMS propôs a erradicação da maioria das doenças humanas transmitidas por vetores e o inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) foi considerado o inseticida de excelência, principal arma no controle das populações de insetos, sendo extensamente empregado no processo de erradicação da malária, transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles*. No ano de 1976, a OMS resolveu mudar o objetivo de seu Programa de Erradicação da Malária para Programa de Controle da Malária, visto que muitas espécies de mosquito vetores adquiriram resistência ao DDT (HEMINGWAY e RANSON, 2000). O desenvolvimento de resistência em insetos continuou mesmo com a utilização de novas classes de inseticida como: organofosforados, carbamatos e piretróides sintéticos (BROGDON e MCALLISTER, 1998).

No Brasil, o controle do mosquito *Ae. aegypti* tem sido feito utilizando dois principais procedimentos: campanhas de Saúde Pública que visam eliminar os reservatórios artificiais como pneus, vasos, garrafas, etc, em domicílios. E através do uso de inseticidas químicos convencionais, que em sua maioria, são ineficazes para controlar o mosquito devido ao desenvolvimento de resistência. Os inseticidas utilizados, comumente, no combate a vetores de doenças podem ser classificados como: inseticidas químicos, inseticidas de origem botânica (e seus análogos sintéticos), inseticidas reguladores do crescimento dos insetos e agentes de controle biológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Os inseticidas químicos são classificados em três classes principais: organoclorados, organofosforados e carbamatos.

Os organoclorados são moléculas de hidrocarbonetos clorados, que apresentam baixa solubilidade em água, sendo bastante lipossolúveis (COATS, 1990). Neste grupo estão os inseticidas mais utilizados na história, tais com: DDT, lindano, dieldrin e aldrin. Devido a algumas características, tais como persistência ambiental (até 30 anos no solo), tendência ao

acúmulo nos organismos, alto grau de toxicidade e ao aumento da resistência ao inseticida por parte dos insetos, estes compostos tiveram sua utilização reduzida em muitos países (BEATY, e MARQUARDT, 1996).

Os organofosforados são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo (ácido fosfórico, ácido tiosfosfórico, ácido ditiosfosfórico e outros). Estes compostos possuem diversas combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Nesta classe de inseticidas estão incluídos o malation, metil paration, clorpirifos e temephos. Estes compostos, por serem biodegradáveis, são amplamente utilizados em campanhas de Saúde Pública, por não se acumularem nos organismos e no solo (BEATY e MARQUARDT, 1996). Entretanto, estes inseticidas são pouco estáveis, necessitando de constantes reaplicações. O temephos, membro desse grupo é utilizado como larvicida recomendado pela OMS para utilização em água potável.

Os carbamatos são praguicidas orgânicos derivados do ácido carbâmico. Possuem pequeno espectro de atividade inseticida. Os mais conhecidos são: carbaril-metomil, carbofuran, metiocarb, primicarb, indoxacarb, alanicarb e furatiocarb. Estes inseticidas são solúveis em água e seu poder residual é curto, entretanto, seu efeito letal é rápido sobre os insetos, assim como os organofosforados (BRAGA e VALLE, 2007). Tanto os organofosforados como os carbamatos agem inibindo a enzima acetilcolinesterase e causam, respectivamente, fosforilação ou carbamilação da enzima, impedindo que ocorra degradação da acetilcolina, presente na fenda sináptica. Por esta razão, são gerados impulsos nervosos contínuos, e posteriormente, o receptor de acetilcolina fica dessensibilizado, levando o inseto à morte (ALDRIDGE, 1950; FUKUTO, 1990; METCALF, 1971; NISHIOKA et al, 1977).

Entre os inseticidas botânicos, os mais utilizados, atualmente, são os piretróides, que foram introduzidos no mercado em 1976, devido à resistência desenvolvida pelos insetos aos inseticidas organoclorados e organofosforados. São compostos naturais obtidos a partir do piréto, extraídos de flores de crisântemo (ELLIOT e FARNHAM, 1973). Também têm sido utilizados análogos sintéticos, como a aletrina, resmetrina, cipermetrina, etc (ZERBA, 1988). Estes compostos são, amplamente, utilizados na área da Saúde e da Agricultura, por possuírem alta letalidade e alta eficiência, pois são necessárias menores quantidades do produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações e por serem mais seguros para os mamíferos.

Os inseticidas reguladores do crescimento dos insetos são compostos alternativos, sintéticos ou naturais, capazes de interferir com os processos de crescimento, desenvolvimento e metamorfose dos insetos (BRAGA e VALLE, 2007; CONSOLI, 1994). Estes inseticidas têm como vantagem principal o fato de serem praticamente atóxicos para os mamíferos, atuando sobre a praga-alvo. Normalmente, o hormônio juvenil regula a metamorfose de larva para pupa, porém a adição deste hormônio inibe o processo de muda, provocam retardo no desenvolvimento das larvas até a morte, pois o inseto permanece no estágio de larva. Alguns destes compostos são análogos de hormônios: metoprene, hidroprene, piriproxifen e o fenoxicarb. Outros compostos, as benzofeniluréias, reguladores do desenvolvimento (fluazuron, diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron e o lufenuron), inibem a síntese de quitina, e o grupo das diaminotriazinas (ciromazinas), endurecem a cutícula do inseto (BRAGA e VALLE, 2007; TASEI, 2001).

O controle ambiental seguro de larvas de mosquitos é particularmente necessário para águas altamente produtivas como, por exemplo, bacias hidrográficas, instalações de tratamento de água e sistemas sépticos, assim como para outros *habitats*. Encontrar métodos alternativos de controle de insetos irá reduzir custos de produção de inseticidas químicos e seu impacto no meio ambiente. Os pesticidas bioracionais comuns incluem análogos do hormônio juvenil de inseto como o metopreno. Em um estudo realizado para determinar a toxicidade do metopreno em espécies não alvo, foi observado que as quantidades utilizadas não foram tóxicas para a maioria dos vertebrados e invertebrados testados em escala de laboratório, com exceção de algumas espécies de zooplâncton, crustáceos em estádios larvais e pequenos dípteros, nos quais foram documentadas reduções de população (LAWLER, 2017).

1.3.2 Métodos alternativos de controle

Perante o cenário da crescente aparição de resistência aos inseticidas químicos, a dificuldade do custo de produção dos mesmos e o impacto ambiental, outros métodos utilizados na luta contra o vetor têm sido os agentes de controle biológico.

Peixes, crustáceos e espécies de insetos predadores de larvas têm sido utilizados como métodos de controle biológico na luta contra o vetor da dengue. Entre as espécies predatórias pode-se citar *Gambusia affinis*, cujo uso com estes fins data de mais de cem anos atrás. Este peixe é liberado em corpos d'água que servem como criadouros de larvas de mosquito e têm sido efetivos no controle e eliminação destes insetos. Em alguns países da Ásia, utiliza-se a estratégia de combinar várias espécies de peixes predadores de larvas como *Gambusia affinis*,

Poecilia reticulata, *Tilapia mossambica* e *Sarotherodon niloticus* em reservatórios domésticos de água, com excelentes resultados no controle de *Ae. aegypti* e *A. albopictus* (LIU et al, 2017; WANG e WANG, 1990). O uso desta estratégia popularizou-se em função de seus positivos resultados, porém o estudo do comportamento do vetor tem revelado uma maior complexidade em relação ao esperado em termos de resposta às condições impostas pelo ecossistema. As fêmeas de certas espécies de mosquitos como *Culex pipiens*, *Culex tarsalis* e *Culex quinquefasciatus* podem detectar a presença destes predadores e não colocar seus ovos no local onde habitam estas espécies de peixes predatórios, embora este tipo de comportamento ainda não tenha sido comprovado para *Ae. aegypti* e *A. albopictus*, sempre pode existir esta possibilidade. Em geral, estas espécies de mosquitos colocam seus ovos em reservatórios artificiais de água, onde peixes predadores não se encontram; o uso desta estratégia para controle dos mosquitos, neste caso, permanece sob questionamento. Outra limitação deste método deve-se ao fato de que estas espécies seriam introduzidas em ambientes onde elas não habitam de forma natural, o que pode afetar o equilíbrio do ecossistema em questão (WANG e WANG, 1990). A característica predatória de várias espécies de mosquitos, pertencentes ao gênero *Toxorhynchites* tem sido aproveitada como alternativa de método de controle. Estas espécies não precisam de se alimentar de sangue em seu ciclo de vida e são predadores do mosquito *Ae. aegypti*, podendo ser utilizados no controle deste vetor sem aumentar o risco de transmissão. De fato, estudos comprovam a sua efetividade na redução da população do mosquito da dengue. Porém, a principal desvantagem deste método é que o comportamento predatório acontece durante o estado larval, o que requer que haja coincidência desta fase entre as duas espécies de mosquito no mesmo corpo de água, limitando a aplicação do controle por *Toxorhynchites* (FOCKS, 2007).

Algumas espécies de fungos entomopatogênicos têm sido utilizadas com sucesso no controle da proliferação do vetor das citadas arboviroses. Por exemplo, foi demonstrado que a infecção com *Beauveria bassiana* reduz a sobrevivência, a frequência no repasto sanguíneo e fecundidade do *Ae. aegypti* (DARBRO et al, 2012). Outra espécie de fungo, *Lagenidium giganteum*, tem sido usada com sucesso na redução do vetor do vírus do Nilo Ocidental, *Culex tarsalis* (KERWIN et al, 1987). O uso de ambas as espécies de fungos também é mencionado para a redução das populações de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em reservatórios artificiais (GUZMAN, 1987; RUEDA e PATEL, 1990). As espécies do gênero *Metarhizidium* também são utilizadas de forma eficiente no controle de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Estas espécies de fungos possuem diversos mecanismos de patogênese através dos

quais afetam a viabilidade do inseto (SCHOLTE et al, 2004; BUTT et al, 2013; ALKHAIBARI et al, 2016).

O uso de toxinas, produzidas por bactérias, é muito útil no controle destes vetores. Endotoxinas produzidas por micro-organismos como *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) e *Bacillus thuringiensis* são exemplos deste método que surgiu como alternativa de bioinseticida para o controle do mosquito e são amplamente comercializados (SANAD et al, 2013) *Bacillus thuringiensis* pertence à família *Bacillaceae*, que engloba mais de 82 sorotipos. A transformação de proteínas Cry a partir de uma proteína relativamente inerte passando de uma forma de protoxina cristalina a uma forma citotóxica, um processo com várias etapas: as inclusões, quando ingeridas pela larva chegam ao ambiente do intestino médio onde é promovida a solubilização e consequente liberação de protoxinas. Estas protoxinas são reconhecidas e clivadas pelas proteases do inseto hospedeiro. As toxinas ativas posteriormente se ligam aos receptores no epitélio do intestino médio. De forma geral, é aceito na literatura que as subunidades de toxina oligomerizam-se para formar estruturas em forma de poros, capazes de inserir-se na membrana do inseto. Esses poros permitem que íons e água passem livremente para o interior das células, promovendo a lise e morte eventual do inseto hospedeiro. Outra hipótese deste mecanismo sugere que a toxina é independente de oligomerização. Outros autores reportam que existem vários fatores que influenciam a atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* (PIGOTT et al, 2007; GOMEZ et al, 2014). A análise do transcriptoma de *Ae. aegypti* mostrou que a resposta fisiológica às toxinas Cry só pode ser iniciada na presença do tipo selvagem da mesma pois, a interrupção na formação dos poros, provocada pela presença dos monômeros de Cry elimina o efeito da toxicidade e a resposta fisiológica do inseto à toxina (CANTON et al, 2015).

A bactéria *Wolbachia*, que pertence à ordem dos *Rickettsiales*, é um micro-organismo endossimbionte de vários artrópodes e nematódeos parasitas, inibe a transmissão de alguns Flavivirus, como o vírus da dengue, chikungunya, febre amarela e vírus do Nilo Ocidental, e também a infecção com certos parasitos, oferecendo uma possível solução para diminuir o espalhamento destas doenças. O primeiro reporte do micro-organismo endossimbionte *Wolbachia pipientis* em *Culex pipiens* foi realizado em 1924 (HERTIG e WOLBACH, 1924). Uma das razões do uso de *Wolbachia* para o controle vetorial foi formulado baseado na indução de alteração citoplasmática no mosquito, que impossibilita a formação de um embrião viável, como resultado da infecção com *Wolbachia*, em órgãos de reprodução do inseto. Os machos e fêmeas infectados utilizam diferentes mecanismos para manter as vantagens na

reprodução. Estes mecanismos não estão limitados somente aos mosquitos, são compartilhados por todas as relações de simbiose estabelecidas pela *Wolbachia* com os insetos que ela infecta (HERTIG, 1924; HUANG et al, 2017). Mostrou-se também, que o bloqueio do vírus da dengue e outros parasitos que infectam o mosquito pela bactéria *Wolbachia* não é específico de algum tecido, assim, os autores sugerem que o efeito é sistêmico (AMUZU e McGRAW, 2016). Em contraste com os numerosos esforços realizados para introduzir a *Wolbachia* nas populações de *Ae. aegypti*, o progresso nas populações de *A. albopictus* tem sido lento, pois nesta última espécie a infecção por *Wolbachia* acontece de forma natural. Neste sentido, a superinfecção com *Wolbachia* dificulta a introdução deste método de controle (ROUSSET e BRAIG, 1999; FU et al, 2010). No Brasil, tivemos algumas iniciativas no controle do mosquito *Ae. aegypti* com *Wolbachia*, um esforço internacional do Programa ‘Eliminate Dengue: Our Challenge’ (Eliminar a Dengue: Nosso Desafio), que estuda uma abordagem inovadora para reduzir a transmissão do vírus da dengue pelo mosquito *Ae. aegypti* de forma natural e autossustentável. Alguns fatores impediram o completo sucesso do programa: inicialmente, os machos infectados com a bactéria eram oriundos de cepas de laboratório, insetos mais frágeis, quando liberados na natureza morriam antes de cruzarem com fêmeas selvagens e transmitirem a bactéria. Outro problema foi a tradição do uso de inseticidas por parte da população, quando as pessoas detectaram a presença de mais mosquitos em uma determinada área aplicavam mais inseticidas para eliminação do mosquito (comunicação pessoal-Dr. Luciano Moreira/FIOCRUZ).

Com o avanço das tecnologias do DNA recombinante, a obtenção dos genomas e transcriptomas completos de vetores e os avanços nas técnicas de edição gênica, a introdução de mosquitos geneticamente modificados também tem sido uma alternativa explorada para o controle. Essa alternativa visa substituir as populações de mosquitos vetores de doenças por mosquitos geneticamente modificados e tem sido abordada de duas formas: primeiramente, criando mosquitos com imunidade intracelular através da expressão de genes antivirais. Apesar da diminuição da transmissão, esta característica teve reprodutibilidade reduzida na natureza. A segunda alternativa experimentada foi liberação de mosquitos machos esterilizados por radiação ou por compostos químicos. Esta abordagem foi bem-sucedida no controle de pestes agrícolas, o desenvolvimento desta técnica foi limitado por alguns fatores para insetos vetores: irradiação de machos durante a fase de pupa mostrou ser ineficiente para evitar a cópula no estado adulto e a esterilização com compostos químicos como thiotepa e tepa mostrou que a persistência dos mesmos poderia resultar em prejuízo ambiental (DAME

et al, 2009; LABRECQUE et al, 1972; HUANG et al, 2017). Além disso, o método eficaz de introdução do elemento genético para modificar o genoma do mosquito continua sendo um passo crítico, pois até o momento, a forma mais eficaz tem sido a microinjeção, cuja utilização, em larga escala, não é viável (MILLER et al, 1987; MCGRANE et al, 1988; MORRIS e EGGLESTON, 1989). Apesar de ter alcançado sucesso com estas abordagens no controle da população de mosquitos em territórios como Grand Cayman e no Brasil, é preciso manter um controle estrito da logística e do compromisso com estas abordagens, que muitas vezes fogem do alcance das possibilidades reais de controle. Além disso, estudos conduzidos no Panamá mostraram que não houve uma diminuição significativa nas populações de *A. albopictus* nem de *Ae. aegypti* (GORMAN et al, 2016). Outro fator que compromete o sucesso desta abordagem é a migração de mosquitos não modificados provenientes de áreas próximas, observação que também foi feita com a liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia* na Austrália (HOFFMANN et al, 2011). Todas as evidências expostas indicam a importância de desenvolver novos métodos, com menor custo e maior efetividade, que possam ser utilizados sozinhos ou combinados com outras estratégias para o controle da população de mosquitos vetores.

1.4 Resistência dos insetos aos inseticidas

A resistência é uma diminuição na susceptibilidade a um composto inseticida, causada por exposição prolongada da população de insetos no campo. Esta característica pode ser herdada pela prole (TABASHNIK et al, 2014).

A característica dos insetos de ter um ciclo de vida curto e prole abundante favorece o surgimento de populações com diferentes características genéticas. A resistência a inseticidas em populações de insetos também está relacionada com a frequência de utilização dos inseticidas e é resultante da pressão seletiva desses compostos tóxicos sobre estas populações (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

Existem vários mecanismos através dos quais pode se desenvolver o fenômeno da resistência em populações de insetos. Os insetos podem modificar o seu comportamento a partir do reconhecimento da presença do inseticida. Os insetos podem evitar contato com ele, por exemplo, reduzindo sua entrada em domicílios tratados (MBOGO et al, 1996; MATHENGE et al, 2001). Outra forma de adaptação para resistência é a redução na penetração cuticular, devido às modificações na composição da cutícula, podendo estar relacionado, por exemplo, com a idade do inseto (STONE e BROWN, 1969). Os insetos

também podem desenvolver resistência metabólica, aumentando a capacidade de metabolização dos inseticidas, pela ação de enzimas de detoxificação: glutathione-S-transferases, esterases e citocromo P450 (HEMINGWAY e KARUNARATNE, 1998; RANSON e HEMINGWAY, 2005; FEYEREISEN, 2006). A resistência também pode ocorrer a partir de modificação nos sítios-alvo dos inseticidas por mutações genéticas, tais como fenótipo kdr e super kdr, mutações nos canais de sódio e também alterações no receptor de GABA (VILLANI e HEMINGWAY, 1987; FRENCH-CONSTANT e PITTENDRIGH, 1998; GOMES et al, 2017).

Com o avanço das técnicas de sequenciamento de genomas e genômica funcional, foram identificados diversos genes relacionados com a resistência e também observado que este fenômeno está associado com o aumento de número de cópias e a superexpressão de sequências codificantes para resistência, sendo esta uma característica que envolve a interação de vários genes (BALAKRISHNA e NAGARAJAN, 2017; RIVERO et al, 2010). Estudos utilizando a técnica de RNAi permitiram elucidar mecanismos e produtos gênicos relacionados ao fenômeno de resistência a inseticidas em mosquitos, por exemplo, pode-se citar a relação da glutathione-S-transferase com mecanismos de resistência em *Ae. aegypti* (BALAKRISHNA e NAGARAJAN, 2017; LUMJUAN et al, 2011).

Considerando que o mosquito *Ae. aegypti* tem desenvolvido resistência a diversos compostos utilizados nas estratégias de controle, tem sido empregadas abordagens alternativas, como, por exemplo, o larvicida natural *Bacillus thuringiensis*. Porém, tem sido observado o desenvolvimento do fenômeno da resistência também, além do fato de que *Bacillus thuringiensis* apresenta baixo poder residual quando exposto ao meio ambiente, sendo necessárias várias aplicações (PARIS et al, 2011; TETREAU et al, 2012). Recentemente, tem-se observado que o polimorfismo de sequências e padrões de expressão de determinados genes possuem associação com resistência às toxinas de *Bacillus thuringiensis israelensis* (DESPRÉS et al, 2014; STALINSKI et al, 2016).

Por último, cabe ressaltar que um problema adicional relacionado à resistência é o fenômeno de resistência cruzada e resistência múltipla. A resistência cruzada refere-se aos casos nos quais um único mecanismo de defesa confere resistência a inseticidas de uma mesma classe ou a classes diferentes. A resistência múltipla é a defesa contra inseticidas através de mecanismos múltiplos e coexistentes (MILANI, 1963; BUSVINE, 1968).

Outro problema associado ao controle foi observado na utilização da bactéria *Wolbachia*, para controle de *Ae. Aegypti*, como descrito anteriormente. A liberação no ambiente de mosquitos infectados com *Wolbachia* para o cruzamento com a população natural foi afetada pela aplicação de técnicas de controle vetorial tradicionais como o uso de inseticidas e a remoção de habitats de larvas, tais estratégias reduzem a população infectada com *Wolbachia* prejudicando a eficácia deste controle (SLATKO et al, 2014).

No Brasil, o principal inseticida químico utilizado no controle do vetor é o larvicida temefós, um organofosforado. Este vem sendo substituído pelo diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, em regiões onde existem populações de *Ae. aegypti* resistentes ao primeiro. Porém a síntese do diflubenzuron tem alto custo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.5 Metabolismo da quitina

A quitina, polímero de N-acetilglicosamina é o segundo polímero mais abundante na natureza e um dos principais constituintes de barreiras extracelulares importantes como o exoesqueleto (cutícula), a matriz peritrófica (MP) no intestino (KRAMER e MUTHUKRISHNA, 2005) e a casca de ovos que protegem os insetos e garantem suas sobrevivências no meio ambiente (MOREIRA et al, 2007). As propriedades de dureza, rigidez e resistência dessas barreiras extracelulares são atribuídas principalmente à presença de quitina. O crescimento e desenvolvimento dos insetos estão intimamente ligados à síntese, degradação e modificações na quitina. As matrizes contendo quitina são dinamicamente modificadas em cada fase do desenvolvimento e estão sujeitas ao controle fisiológico. Em pupas recém-eclodidas, por exemplo, o conteúdo de quitina é de apenas 2% antes do processo de esclerotização, aumentando em torno de 10 vezes depois deste processo. As proteínas cuticulares (e a quitina) são reticuladas por orto-quinonas, que são catecolaminas oxidadas, derivadas da ação de diferentes enzimas, incluindo lacase-2 (ARAKANE et al, 2005; GORMAN, 2010; ZHU et al, 2016).

A cutícula do inseto é composta de três camadas consecutivas: o envelope, epicutícula e procutícula. Devido à sua assimetria intrínseca a cutícula exhibe propriedades físicas anisotrópicas. O último passo da formação da cutícula envolve a modificação de três aminoácidos livres de tirosina, que são sequestrados como conjugados da glicose na hemolinfa. Primeiramente a tirosina é hidroxilada a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e depois descarboxilado para formar 3,4-dihidroxifenetilamina (dopamina) (HOLL et al, 1992; MUTHUKRISHNAN et al, 2016). A dopamina é então N-acetilada com acetato ou β -alanina

nas células da epiderme e logo é sequestrada na hemolinfa como um conjugado da glicose, sulfato ou outro composto hidrofílico. O conjugado de dopamina N-acetilada é translocada por poros até a epicutícula onde é hidrolisada e convertida, pela ação das fenoloxidasas, em quinonas altamente reativas. Estes compostos transientes interligam proteínas e taninos durante o processo de esclerose. Por outro lado, também tem sido observado que os oligossacarídeos produzidos a partir da degradação da quitina pelas enzimas quitinases, parecem ter um papel importante na imunidade dos insetos contra micro-organismos patógenos (KRAMER e MUTHUKRISHNA, 2005).

O metabolismo da quitina ocorre nos lados intra e extracelular das células epiteliais, essencialmente, em ambiente não aquoso. As células da epiderme são responsáveis pela deposição de quitina na nova cutícula a cada muda. Pela evidência experimental, supõe-se que as nanofibrilas de quitina formam um núcleo de quitina, que se associam com várias proteínas para formar fibras com um diâmetro 50-250 nm e comprimentos de 300 nm (FABRITIUS et al, 2016). Uma vez que este tamanho é significativamente menor que a largura de uma célula epidérmica, em torno de 10 μm , vários feixes de quitina devem ser ligados de ponta a ponta para cobrir a célula epidérmica. Estas fibras maiores são dispostas em paralelo para formar uma lâmina de quitina, paralela à superfície apical das células epidérmicas subjacentes (MUTHUKRISHNAN et al, 2016).

O polímero de quitina também tem sido associado com outros tecidos como intestino anterior, posterior, traqueias, asas, glândulas salivares e estruturas bucais das larvas e adultos. A epiderme e o intestino médio são tecidos aonde ocorre a síntese de quitina nos insetos, majoritariamente. As células do intestino médio estão associadas com a síntese de quitina no processo de formação da MP durante a alimentação do inseto (WANG e GRANADOS, 2000; HOPKINS E HARPER, 2001).

A MP dos insetos, composta de quitina, proteínas e glicosaminoglicanos, funciona como barreira permeável entre o alimento e o epitélio do intestino médio, protegendo de dano mecânico, toxinas e entrada de patógenos. Utilizando técnicas de microscopia óptica e eletrônica, é possível obter informação detalhada da MP de insetos lepidópteros (WANG e GRANADOS, 2000 ;HOPKINS e HARPER, 2001). As matrizes extracelulares de quitina da cutícula e da MP têm propriedades muito diferentes. No intestino, em particular, algumas células ao redor da cardia contribuem à síntese e secreção de quitina da MP do tipo II, presente em larva e alguns insetos adultos, enquanto outras células, localizadas em diferentes

partes do intestino, são responsáveis pela síntese da quitina associadas à MP do tipo I presente em adultos (HOGENKAMP et al, 2005).

A presença de quitina na MP nascente tem sido estudada utilizando métodos de microscopia utilizando ouro ligado à aglutinina de germe de trigo (WGA), esta se une aos resíduos de N-Acetil-glicosamina no polímero de quitina e às glicoproteínas. A MP se faz mais grossa e adquire multicamadas nas regiões médias e posteriores do mesentério. Algumas observações sugerem que as microvilosidades servem como local e molde para a organização da MP, servindo com suporte para a deposição da matriz de microfibrilas de quitina sobre as proteínas da MP (HOPKINS e HARPER, 2001). Na medida em que as fibrilas de quitina são depositadas em superfícies extracelulares, mais cadeias de quitina nascente são translocadas através da membrana plasmática (MORGAN e STRUMILLO, 2013).

Diferentemente da MP do adulto que é dita do tipo I e sintetizada apenas após o estímulo da alimentação com sangue, a MP da larva, denominada do tipo II, é produzida de forma constitutiva, o que sugere intensa atividade da quitina sintase (CHS) B, ou 2, nessa matriz. Observou-se também que a MP tem um papel importante na detoxificação do grupamento heme após o repasto sanguíneo (PASCOA et al, 2002), similar ao papel descrito em *Rhodnius prolixus* (ALVARENGA et al., 2015) e limita a taxa de alimentação com sangue no mosquito (MOSKALYK e OO, 1996). A CHS2 ou B não é sintetizada durante o estágio de pupa, mas sim durante a fase larval, especialmente durante a alimentação da larva e de algumas espécies de adultos em resposta ao repasto sanguíneo (KATO et al, 2006). As MP de insetos usualmente contêm entre 3-13% de quitina do tipo α e β e consistem em uma mistura de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos. Esta MP é formada quando as microfibrilas de quitina se associam às matrizes de proteoglicanos altamente hidratados (IBRAHIM et al., 2000; ZIMOCH e MERZENDORFER, 2002; ARAKANE et al., 2004). Durante seu desenvolvimento, a larva do mosquito *Ae. aegypti* passa por quatro estádios, portanto a atividade da enzima CHSA, ou 1, da cutícula deve ser intensa de modo a permitir as trocas do exoesqueleto (CLEMENTS, 1992; KATO et al, 2006). A síntese de quitina acontece durante os estágios de larva, pupa e adulto, possibilitando a deposição das camadas de quitina na cutícula e a formação da MP no adulto, por essa razão a inibição da síntese de quitina como método de controle, utilizando mecanismos de indução de silenciamento destas CHSs, pode afetar o desenvolvimento do inseto em vários níveis (HOGENKAMP et al, 2005) ou pela utilização de compostos inibidores da síntese de quitina (MOREIRA et al, 2007).

No metabolismo da quitina, várias isoformas de enzimas podem realizar funções essenciais e não redundantes. A natureza das proteínas é crítica para determinar as propriedades estruturais, físico-químicas, mecânicas e biológicas das matrizes contendo quitina. O conhecimento detalhado dos genes e proteínas envolvidos no metabolismo da quitina é essencial para desenvolver novos alvos e novas abordagens para o controle de insetos (ZHU et al, 2016). Tanto a molécula de quitina, como enzimas e proteínas reguladoras envolvidas com o seu metabolismo são consideradas bons alvos para o controle de mosquitos. De modo geral, o mecanismo de biossíntese de quitina em insetos é muito similar aos mecanismos descritos em fungos e outros micro-organismos. Existem pequenos detalhes que diferem, como é o caso da fonte de açúcar, proveniente do corpo gorduroso, liberada pela ação da enzima glicogênio fosforilase (KRAMER e MUTHUKRISHNA, 2005; MEYER-FERNANDES e ARRESE, 2000).

O mecanismo de biossíntese de quitina pode ser estudado em dois segmentos: no primeiro, tem lugar uma série de reações para a formação do açúcar N-acetil-glicosamina e o segundo segmento, composto pelas reações que permitem a formação do polímero de quitina a partir do aminoaçúcar. A figura 3 apresenta as vias de síntese e degradação de quitina. A última etapa da via de biossíntese é feita pela proteína quitina sintase (CHS), pertencente à família das enzimas glicosiltransferases (COUTINHO et al, 2003; MERZENDORFER, 2011). Esta enzima é uma proteína de aproximadamente 160-180 kDa e possui um ponto isoelétrico ligeiramente ácido, entre 6,1 e 6,7. As CHSs A e B (E 2.4.1.16) são transferases, glicosiltransferases, hexosiltransferases, quitina sintases cujo papel na biossíntese de quitina é a incorporação do UDP-N-acetilglicosamina no último passo da síntese do polímero de quitina, na cutícula e matriz peritrófica do intestino, respectivamente.

A quitina sintase (CHS) é uma proteína integral de membrana. As propriedades estruturais e catalíticas das enzimas de síntese quitina são difíceis de estudar, pela dificuldade de obtenção da enzima CHS em preparações solúveis e pela instabilidade da glutamina-fructose-6-fosfato-aminotransferase (GFTA), enzima que produz o precursor da N-acetilglicosamina. Apesar disso, esta enzima tem sido identificada em vários organismos, incluindo nematódios, fungos e insetos. A similaridade entre as sequências de aminoácidos tem sido a principal ferramenta para o estudo e identificação das CHSs, alocando-as em uma grande superfamília de glicosiltransferases (COUTINHO et al, 2003).

O alinhamento das sequências de CHSs de vários insetos tem mostrado uma estrutura em que se identificam três domínios, onde a região catalítica está flanqueada por dois domínios transmembranas (TELLAM et al, 2000). O domínio A, localizado no extremo aminoterminal é pouco conservado. O domínio catalítico ou domínio B é hidrofílico, com alto grau de conservação, especificamente nas regiões supostamente envolvidas na atividade catalítica. O domínio C, localizado no carboxiterminal, tem sido associado com a interação proteína-proteína ou oligomerização (MERZENDORFER, 2006).

Estudos acerca da localização celular das CHSs mostraram a presença de altos níveis de transcritos destes genes nas regiões apicais das células colunares de larvas de *Manduca sexta*, utilizando hibridação *in situ* com sondas de DNA. Ensaio de microscopia eletrônica e imunolocalização de CHS têm mostrado que esta enzima se encontra associada à epiderme durante o processo de deposição da cutícula, evidenciando as funções previamente descritas (ZIMOCH e MERZENDORFER, 2002). O desenvolvimento do inseto é determinado pela regulação da expressão das proteínas relacionadas com a síntese e degradação de quitina, permitindo as ecdises e por consequência o passo de um estágio do ciclo de vida ao outro (MERZENDORFER, 2006; MUTHUKRISHNAN et al, 2016).

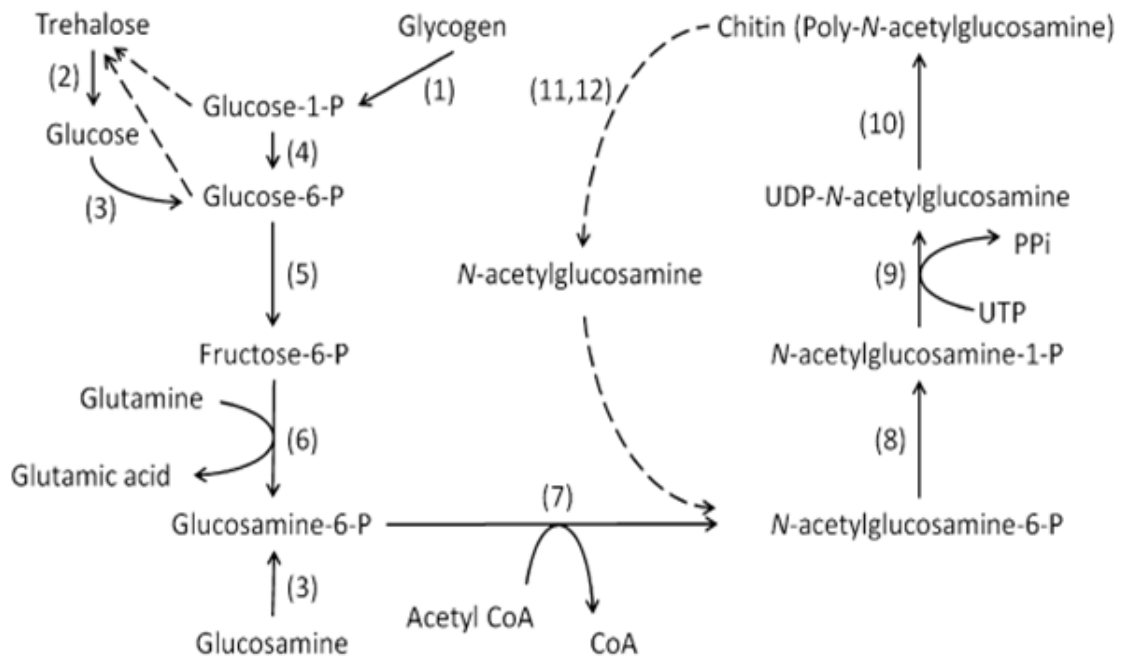


Figura 3. Vias de biossíntese e degradação de quitina. Fonte: Modificado de MERZENDORFER, 2011.

Em insetos é comum a presença de dois genes relacionados à síntese de quitina, *CHS1* ou *CHSA* envolvido primariamente na síntese de quitina da cutícula do exoesqueleto (ARAKANE et al., 2004; HOGENKAMP et al, 2005; TELLAM et al, 2000) e dos ovos (ARAKANE et al., 2008; SOUZA-FERREIRA et al, 2014) e o outro *CHS2* ou *CHSB* responsável pela síntese de quitina da MP no intestino (ARAKANE et al., 2004; HOGENKAMP et al, 2005; IBRAHIM et al, 2000; ZIMOCHE e MERZENDORFER, 2002). Os transcritos de *CHSA* de muitas espécies de insectos sofrem *splicing* alternativo. Dois transcritos diferentes, resultantes do uso de um dos dois exons alternados, foram relatados em pelo menos nove espécies de insetos: um em coleóptero, (ARAKANE et al, 2004), três em lepidópteros (ASHFAQ e SONODA, 2007; HOGENKAMP et al, 2005), dois em dípteros (YANG et al, 2013; ZHANG et al, 2012) e dois em hemípteros (WANG et al, 2012). A presença de exons alternativos é uma característica dos genes que codificam *CHSA* e não foram identificados nos genes que codificam *CHSB* (ARAKANE et al, 2004).

Estudos de hibridização *in situ* para *CHS* utilizando amostras de intestino revelaram que o teor de mRNA, localizado na periferia das células epiteliais que faceiam o lúmen do intestino médio, aumenta após a alimentação com sangue (IBRAHIM et al, 2000). O genoma do mosquito *Ae. aegypti* apresenta duas sequências preditas para a enzima *CHS* (NENE et al, 2007). Pela dificuldade do estudo das *CHSs*, como fora anteriormente citado, as estratégias baseadas em técnicas de função reversa, como por exemplo, o RNAi, resultam alternativas mais adequadas para o estudo das suas funções (KRAMER e MUTHUKRISHNA, 2005).

Devido à importância da quitina em todas as fases de vida dos mosquitos, esta molécula se torna um bom alvo na tentativa de inviabilizar o desenvolvimento do mosquito, tanto na formação da cutícula como da MP no estágio de larva e adulto ou em ovos. A escolha do gene de *CHS* como alvo para o controle do vetor, como apresentada neste trabalho, se deve ao fato, de que a molécula de quitina está presente nas diversas barreiras que protegem o mosquito no meio ambiente e em todos os estágios do ciclo, ou seja, a quitina é fundamental para a viabilidade do mosquito. A molécula de quitina não está presente em plantas e vertebrados, o que permite o controle seletivo do mosquito.

1.6 Mecanismo de silenciamento por RNA de interferência (RNAi)

O mecanismo de RNA de interferência (RNAi), também conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), tem sido observado na quase totalidade dos organismos eucarióticos. O processo de RNAi foi, inicialmente, observado em plantas

transgênicas nas quais procurava-se realizar a super expressão de genes endógeno. Seu mecanismo de ativação através de uma dupla fita de RNA (dsRNA) foi descrito pela primeira vez utilizando como modelo biológico o nematódio *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al, 1998; FINNEGAN et al, 2003).

O processo tem início, a partir da formação de moléculas dsRNA, seja no núcleo ou no citoplasma da célula. As moléculas de dsRNA são reconhecidas e clivadas pela enzima DICER, uma RNase III. Pequenos fragmentos com 20 a 26 nucleotídeos (small interfering RNAs ou siRNAs), de fita dupla, são carregadas no complexo de indução do silenciamento (RISC) e posteriormente desenovelados. As proteínas argonautas (AGO) degradam a fita senso, denominada como *passenger strand* e a fita antisenso (guide strand) reconhece a moléculas de RNA mensageiro (RNAm) alvo cujas sequências sejam homólogas a dos siRNAs, promovendo a sua degradação (SEMIZAROV et al, 2003; JOGA et al, 2016) ou pela inibição da tradução de moléculas de mRNA alvo (GROSSHANS e SLACK, 2001), resultando em redução ou total supressão na expressão destes genes (CHI et al, 2003; SCHWARZ et al, 2002) (Figura 5).

Os três principais mecanismos de RNAi, caracterizados até o momento são: piwi RNA que interagem com proteínas PIWI (piRNA), microRNA (miRNA) e pequenos RNA interferentes (*small interfering RNA*, siRNA) (JOGA et al, 2016). A biogênese destas moléculas, indutoras do silenciamento e a sua interação com as proteínas argonautas são critérios utilizados para sua classificação (KIM e HAN, 2009). Os RNAs que interagem com PIWI (piRNAs) são uma classe de RNAs pequenos entre 24-31 nucleotídeos de comprimento. Associam-se a proteínas PIWI, uma subclade específica da linha germinativa da família de proteínas AGO, para formar complexos efectores conhecidos como complexos de silenciamento induzidos por piRNA, que reprimem transposões através de mecanismos transcricionais ou pós-transcricionais (IWASAKI e SIOMI, 2015).

O mecanismo de silenciamento mediante miRNA ocorre pela geração, através de uma via especializada envolvendo a enzima DICER, de duplas fitas de RNA de aproximadamente 21 pb de comprimento, miRNA maduro. O efeito do silenciamento individual por miRNA é baixo, porém eles podem silenciar centenas de genes alvo e ter múltiplos sítios de união, pelo qual sua função tem sido associada com mecanismos de sinergismos, voltados à regulação da expressão gênica (FRIEDMAN, 2009; TURNER e SCHNORFEIL, 2011). Estes miRNAs

interagem com as proteínas da família AGO, especificamente com as do tipo 1-4 (KIM e HAN, 2009).

"RNA pequeno" (siRNA) é um termo bastante arbitrário que foi anteriormente utilizado para outros RNAs não codificantes, tais como RNAs nucleares (snRNAs) e RNAs de transferência (tRNAs). RNAs reguladores curtos bacterianos também foram classificados como RNAs pequenos, mas não estão relacionados com RNAs eucarióticos pequenos. O que distingue e define siRNA eucarióticos na via de silenciamento do RNA é a seu tamanho, em torno de 20-30 nucleotídeos e sua interação com as proteínas da família AGO, embora também possam ser subclassificados de acordo com sua origem. Acerca deste último aspecto, no modelo de *Arabidopsis thaliana*, tem sido descrito que os siRNA podem interagir com as proteínas AGO1, 4 ou 6 (KIM e HAN, 2009). Apesar de ter um tamanho similar, os miRNAs e siRNAs apresentam diferenças importantes. Os miRNAs parecem ter sua origem a partir de precursores de dupla fita com estrutura secundária e pareamento incompleto. Porém os siRNAs, parecem ser originados a partir de RNAs de cadeia dupla longos, completamente complementares (dsRNAs) (CARTHEW e SONTHEMEIER, 2009). No entanto, as semelhanças das funções inibitórias específicas da sequência de miRNAs e siRNAs sugerem relação na biogênese e mecanismo de indução de silenciamento (CARTHEW e SONTHEMEIER, 2009).

A aplicação da tecnologia de RNAi no controle de pestes e insetos vetores está baseada, majoritariamente, na introdução do dsRNA para silenciar um gene de interesse mediante a estimulação do mecanismo de siRNA (AGRAWAL et al, 2003; JOGA et al, 2016).

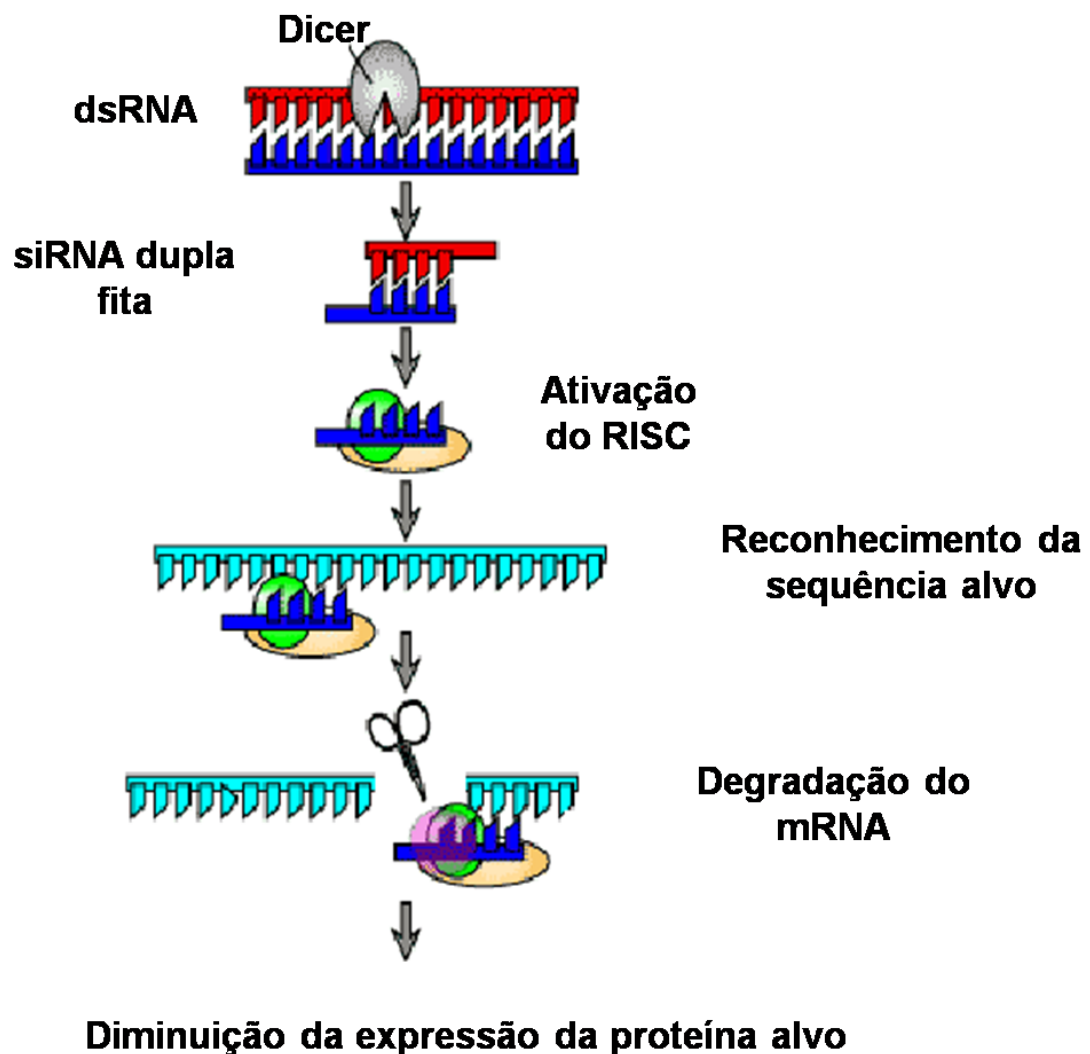


Figura 4. Esquema geral do mecanismo de RNA interferente (RNAi): dsRNA (dupla fita de RNA); siRNA (pequenos RNA interferentes: processados a partir do dsRNA); Dicer (RNase III, enzima que processa o dsRNA); RISC (Complexo enzimático indutor do silenciamento); mRNA (RNA mensageiro alvo). Fonte: Modificado de www.google.com.br/search?q=RNAi+mechanism

O mecanismo de RNAi tem sido relacionado diretamente com a regulação da expressão gênica em plantas e animais, assim como com a execução dos mecanismos antivirais. Em plantas e nematódios o mecanismo de RNAi é conservado e seu efeito de amplificação está relacionado com uma enzima RNA polimerase RNA dependente (RpRd) (SIJEN et al, 2001). Em outros animais examinados até o momento, não tem sido verificado a presença desta molécula amplificando a resposta de silenciamento, como por exemplo, vários membros da classe *Insecta* (BALAKRISHNA e NAGARAJAN e, 2017; SCHWARZ et al, 2002). O mecanismo de internalização do dsRNA também tem sido amplamente estudado

particularmente em *C. elegans*, onde foi descrito um transportador de RNA nomeado SID que facilita a entrada dos dsRNA, e a enzima RpRd, responsável pela amplificação do efeito de silenciamento. Em outras espécies de animais têm sido descritos ortólogos destes genes, SID e da enzima RpRd, e também não tem sido comprovada a relação direta entre eles e a internalização e a amplificação de dsRNA (SHIU e HUNTER, 2017). Embora o mecanismo de RNAi seja um mecanismo conservado, existem diferenças de acordo com a classificação taxonômica do organismo, principalmente nos mecanismos envolvidos na internalização celular do dsRNA e nos mecanismos envolvidos na amplificação sistêmica do silenciamento, que ocorre quando, a partir da administração local do dsRNA é produzida uma resposta de silenciamento no organismo como um todo e não somente no local onde aconteceu a entrada da dupla fita de RNA (JOGA et al, 2016; TERENIUS ET AL., 2011).

Em *Drosophila* tem sido descrito mecanismo de RNAi sistêmico, mas não foram descritos os genes *SID-1* ou *RpRd*, como descrito para *C. elegans* (ROIGNANT et al, 2003). Com base neste estudo, os genes relacionados com a internalização do dsRNA e a amplificação do silenciamento foram estudados por TOMOYASU e colaboradores (2008) em *Tribolium*, que apresentam uma forte resposta de RNAi sistêmico. Como conclusão, os autores sugerem mecanismos alternativos para a resposta de silenciamento sistêmica (TOMOYASU e MILLER, 2008). Consequentemente, as vias exatas mediante as quais o mecanismo acontece nos insetos precisam ainda ser esclarecidas, embora tenha sido induzido com sucesso o silenciamento por RNAi em vários membros da classe *Insecta* (ALVARENGA et al, 2015; FIGUEIRA-MANSUR et al, 2013; MAJEROWICZ et al, 2016; TARACENA et al, 2015).

Em invertebrados, tais como *C. elegans* e *D. melanogaster* foi observado que o processo de RNAi pode ser desencadeado pelo fornecimento exógeno de moléculas de dsRNAs, através da injeção de transcritos produzidos *in vitro*. No caso específico de *C. elegans* verificou-se que o processo de RNAi também pode ser induzido pela ingestão de bactérias que estejam expressando moléculas de RNAm do próprio invertebrado na forma de dsRNAs (DENNIS, 2002; GRISHOK et al, 2001; NEWMARK, et al, 2003; ROIGNANT et al, 2003). Também em larvas de mosquito, observou-se silenciamento pela administração de dsRNA na água de criação, com notável redução na expressão dos genes alvo do silenciamento (FIGUEIRA-MANSUR et al, 2013; SINGH et al, 2013).

Em mosquitos, o mecanismo de RNAi tem sido amplamente utilizado para estudos de função gênica e como nova alternativa para controle populacional (CATTERUCCIA e LEVASHINA, 2009). Com a disponibilidade do genoma de vetores de doença como *Anopheles gambiae*, *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* esta técnica tem se convertido em uma poderosa ferramenta para a caracterização funcional de genes e potencial uso para o controle da população de insetos (MENDES et al, 2011). O RNAi também foi identificado como mecanismo antiviral em mosquito, pois, até recentemente só era considerado um mecanismo de regulação da expressão gênica nestes organismos (BLAIR, 2011; KHOO et al, 2013). Um dos principais desafios para os estudos de RNAi e principalmente para o controle de vetores por esta via é o método de entrega do dsRNA ao inseto. A técnica mais exitosa até o momento tem sido a microinjeção, pois é possível saber exatamente a dose que foi administrada no inseto, utilizando este método. Diversas moléculas, vias metabólicas e comportamento estão sendo estudados. Pode-se citar, em *Ae. aegypti*, os estudos de receptores de resposta de dióxido de carbono (CO₂) para a busca de hospedeiro vertebrado (ERDELYAN et al, 2012), assim como o estudo do gene que codifica para a enzima GFTA demonstrando-se sua relação com a via de biossíntese de quitina (KATO et al, 2006). No entanto, este método, apesar destas vantagens, requer pessoal treinado para sua execução e equipamento específico e por esta razão é pouco reprodutível. Além disso, consome muito tempo e deve ser desconsiderado dependendo do tamanho do inseto e não poderia ser usado em larga escala, por exemplo, em controle de populações de insetos (BALAKRISHNA e NAGARAJAN, 2017).

O usos destes métodos mais simples de administração do dsRNA, têm aberto a possibilidade de explorar o uso do dsRNA como biopesticida ou bioinseticida, devido a diversas vantagens em relação aos inseticidas químicos. Pois, estes métodos de controle são ambientalmente mais seguros, minimizando a toxicidade sobre espécies não alvos e reduzindo a possibilidade de aparição de resistência (BALAKRISHNA e NAGARAJAN, 2017; ZHANG et al, 2015). Em função de superar estas dificuldades, além da administração na água de criação, outros métodos de entrega do dsRNA ao inseto estão sendo testados, entre os quais pode ser destacada a aplicação tópica no abdômen do inseto (EL-SHESHENY et al, 2013), ingestão oral, como citado acima e o uso de nanopartículas e lipídeos, como carreadores do dsRNA. ZHANG e colaboradores (2010; 2015) utilizaram dsRNA associado a nanopartículas de quitosana para induzir o silenciamento de CHS por RNAi em larvas de *A. gambiae*. Por este método pôde ser comprovado que RNAi era eficiente para diminuir a

viabilidade do inseto, demonstrando que este método pode ser uma alternativa interessante para controle de população de insetos vetores de doenças (ZHANG e ZHANG, 2010; ZHANG e KESHAVA, 2015). Recentemente, outros estudos têm mostrado o potencial desta técnica para ser utilizada no controle de vetores, desta vez, utilizando como modelo experimental *Ae. aegypti* (KUMAR et al, 2016). Porém, o uso de nanopartículas como veículo do dsRNA possui como desvantagem que as mesmas podem ser tóxicas ao ambiente, causando prejuízo em espécies não alvo, pelo qual tem sido proposto o uso de partículas de hidrogel para a veiculação do dsRNA, pois estas possuem baixa toxicidade (PHANSE et al, 2015). A técnica de RNAi como alternativa para o controle de populações de mosquitos pode ser utilizada na intervenção em diferentes momentos do ciclo de vida do inseto e em aspectos relacionado ao comportamento, mostrando seu amplo espectro de utilização e seu potencial na luta contra o vetor da dengue e outras doenças.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e uso de micro-organismo recombinante produtor de dupla fita de ácido ribonucleico (dsRNA), como bioinseticida para silenciamento dos genes de CHSs visando o controle do vetor de doenças, o mosquito *Ae. aegypti*.

1.7.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de dsRNA, produzidos, *in vitro*, para induzir o fenótipo de silenciamento de genes de CHSs em larvas de mosquito *Ae. aegypti*, prova de conceito.
- Obtenção de um sistema de expressão de moléculas de dsRNA, correspondentes a diversas regiões alvo selecionadas nos genes de *CHS A* e *B*, em células de *Escherichia coli*, cepa HT115, a ser usado como bioinseticida.
- Adicionar o bioinseticida, células íntegras ou lisadas de *E. coli*, contendo dsRNAs correspondentes às regiões alvo nos genes de *CHS* diretamente na água de criação das larvas de 1º estágio para silenciamento gênico.
- Caracterizar o fenótipo dos insetos após tratamento com o bioinseticida.
- Avaliar o potencial do bioinseticida como adjuvante de inseticidas, como por exemplo, diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina.
- Caracterizar o fenótipo de silenciamento no tratamento do bioinseticida em estágios avançados do desenvolvimento da larva.
- Comparar expressão de dsRNA na produção do bioinseticida, utilizando lactose em substituição de IPTG para a indução da expressão dos dsRNAs.
- Avaliar diferentes métodos de inativação do lisado bacteriano: choque térmico, inativação com etanol 75% e inativação da bactéria com solução de clorexidina comercial.
- Verificar a redução dos transcritos de *CHSA* e *B* por técnica de PCR quantitativo utilizando diferentes doses do bioinseticida (qPCR).
- Avaliar o fenótipo dos insetos, após o tratamento com o bioinseticida utilizando fotografia, técnicas de microscopia: utilizando a sonda aglutinina de germe de trigo

marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-WGA) para identificar quitina e a técnica de fluorescência por hibridação *in situ* (FISH) para verificar a redução dos transcritos de *CHSA* e *B* nos tecidos.

- Comprovar a estabilidade do bioinseticida, do dsRNA, em gel de agarose 1,5% após 2 meses da produção, teste de prateleira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de criação dos mosquitos

Os mosquitos, *Aedes aegypti* da cepa Rockfeller, adultos e larvas, foram criados em insetário no Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro a 28 °C com umidade relativa de 85% e foto-período claro e escuro de 12 horas.

2.2 Alimentação e manutenção dos insetos

Adultos: As colônias de mosquito adulto foram mantidas com dieta composta de solução de sacarose 10%. As fêmeas dos mosquitos são alimentadas com sangue de ave, durante 40 minutos, para produção de ovos.

Larvas: As larvas foram mantidas em bandejas de 20cm x 40 cm em água da torneira e alimentadas com ração de cachorro à base de galinha, simulando as condições naturais de criação.

2.3 Avaliar a eficácia de duplas fitas de RNA, produzidos, *in vitro* em larvas de mosquito *Ae. Aegypti* (prova de conceito)

2.3.1 Busca dos genes de CHSs no genoma do mosquito *Ae aegypti*: seleção das regiões alvo do silenciamento

Para selecionar as regiões alvo do silenciamento, a primeira etapa do trabalho foi à busca pelas sequências protéicas e gênicas das *CHSs* no banco de dados VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) (NENE et al, 2007). As sequências encontradas foram alinhadas no banco de genes do NCBI utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Tool protein (Blastp) disponível no site NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar homologia de sequências com as *CHSs* descritas para outros organismos e comprovar a relação das sequências encontradas com a superfamília de enzimas glicosiltransferases, como descrito previamente (MERZENDORFER, 2006; MERZENDORFER, 2003).

Para comprovar a presença dos domínios transmembranares descritos na literatura (ARAKANE et al, 2005; IBRAHIM et al, 2000; MERZENDORFER, 2003; TELLAM et al, 2000), as sequências de aminoácidos correspondentes às CHSA e CHSB foram analisadas utilizando a ferramenta de predição *on line* TMHMM (KROGH et al, 2001), para comparar a predição de formação de hélices transmembranares das sequências encontradas para CHSA e B com a informação existente na literatura. Os valores de probabilidades obtidos foram plotados utilizando o programa Sigma plot, para gerar os gráficos correspondentes às estruturas secundárias mais prováveis.

A seguir, as sequências de aminoácidos correspondentes à CHSA e CHSB identificadas anteriormente foram alinhadas também utilizando o programa MULTIALIN (CORPET, 1988) juntamente com as sequências de CHSs de outros insetos: *Tribolium castaneum* (NP_001034491.1 CHS A e AAQ62692.1 CHSB), *Anasa tristis* (AFM38193.1 CHS) e outros organismos: *Caenorhabditis elegans* (NP_492113.2 CHS) e *Saccharomyces cerevisiae* (NP_009594.1 CHSB) para a identificar os motivos QRRRW e EDR descritos como assinatura molecular de CHSs (IBRAHIM et al, 2000; MERZENDORFER, 2011).

Em seguida, as sequências das CHSs A e B foram alinhadas entre si para selecionar as regiões alvo do silenciamento. Foram selecionadas no total cinco sequências em diferentes regiões dos genes de CHSA e B para a síntese de dsRNA *in vitro* (prova de conceito) e *in vivo* (produção na bactéria *Escherichia coli* cepa HT115, deficiente de RNase III). Como descrito por ZIMOCH E MENZENDORFER em (2003) e MENZENDORFER (2011), ambas as CHSs apresentam alto grau de homologia de sequência. Baseado nos resultados do alinhamento entre as sequências protéicas e de cDNA das CHSA e B do mosquito, no programa MULTIALIN (CORPET, 1988), foram escolhidas regiões alvo para síntese, *in vitro*, e expressão recombinante dos dsRNAs, tendo como critério a continuidade das regiões com similaridade entre as sequências das duas CHSs.

Uma vez que as regiões alvo foram selecionadas, o próximo passo foi o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificar estas regiões e produzir o dsRNAs *in vitro*. Foi incluída a sequência do promotor T7. Para este passo foi utilizada a ferramenta disponível na página web (<https://www.idtdna.com/pages/products/gene-expression/molecular-beacons>).

2.3.2 Preparação do dsRNA *in vitro*

Para amplificar as regiões alvo do silenciamento para a síntese de dsRNA, foi extraído RNA total de larvas em estágio L4 utilizando TriZol e sintetizado o cDNA correspondente com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem), seguindo as instruções do fabricante. As PCR foram feitas usando o *Pfu* Polymerase Reaction Kit (USB) e seguindo as instruções do fabricante. Os produtos amplificados foram purificados pelo método do fenol-clorofórmio. Brevemente, foram adicionados 45 µl de fenol-clorofórmio, em um tubo tipo *Eppendorf* contendo 45 µl, proveniente da reação de PCR, as amostras foram submetidas à agitação por *vortex* e centrifugadas por 2 minutos. Em um novo tubo tipo *Eppendorf* foram adicionados 9 µl de acetato de amônia 2 mM ao sobrenadante, suavemente agitadas e em seguida foram adicionados 45 µl de isopropanol. As amostras foram mantidas em -20°C por 15 minutos e posteriormente centrifugadas. Foi adicionado 1mL de etanol 70-75% gelado e em seguida, as amostras foram centrifugadas. Uma vez descartado o sobrenadante e eliminado o etanol por evaporação, foram adicionados 25 µl de água livre de nucleases. Posteriormente estas amostras foram dosadas por espectrofotometria (Shimadzu) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Para a síntese do dsRNA *in vitro*, foi utilizado o MegaScript RNAi kit (Ambion) seguindo as instruções do fabricante. O produto da reação foi purificado pelo mesmo método do fenol-clorofórmio, como descrito anteriormente, e dosado por espectrofotometria.

2.3.3 Indução do silenciamento com os dsRNAs produzidos *in vitro*: prova de conceito

A eficácia dos dsRNAs, alvo das cinco diferentes regiões dos genes *CHSA* e *B*, foi testada adicionando a dupla fita de RNA, produzida *in vitro*, diretamente na água de criação da larva. Este experimento foi feito em triplicata biológica, utilizando 10 larvas L1 por grupo em um volume de 1 mL de água da torneira, concentração de 2 µg de dsRNA/mL. Os grupos de tratamento foram: (1) controle (sem tratamento com dsRNA), (2) adicionados com dsRNAMalE, gene da proteína ligadora de maltose (*maltose binding protein*) de *E. coli*, gene não relacionado e com os dsRNAs específicos: (A) 2718_1 localizado do nucleotídeo número 1550 ao 1750 (dsRNAA) ; (B) 2718_2 localizado do nucleotídeo número 1205 ao 1384 (dsRNAB); (C) 5618_1 localizado do nucleotídeo número 1064 ao 1291 (dsRNAC); (D) 5618_2 localizado do nucleotídeo número 693 ao 940 (dsRNAD); (E) 2718_3 localizado do nucleotídeo número 1928 ao 2114 (dsRNAE).

Vinte e quatro horas após adição dos dsRNA na água, separados, as larvas de todos os grupos de tratamento foram alimentadas com ração de cachorro a base de galinha. A observação do fenótipo foi feita diariamente no mesmo horário e a mortalidade registrada. No 3º dia após o tratamento com os diferentes dsRNAs, foi extraído o RNA total de três indivíduos de cada replicata e sintetizado o cDNA para a quantificação da expressão relativa dos genes *CHSA* e *CHSB* após o silenciamento, como descrito no tópico **2.10.1**.

2.4 Obtenção de um sistema de expressão de dsRNA em células de *E. coli*, cepa HT115

2.4.1 Desenho das construções para produção de dsRNA *in vivo*

A análise dos sítios de restrição enzimática para a clonagem no vetor de expressão de dsRNA foi feita utilizando a ferramenta NEBcutter disponível no sítio web (<http://www.neb.uk.com>). O vetor escolhido para a expressão de dsRNA foi o vetor L4440, desenvolvido e gentilmente cedido pelo Dr. Andrew Fire (Addgene plasmid # 1654: organização não lucrativa de reposição de plasmídeos dedicada ao desenvolvimento científico).

Os clones em vetor L4440 contendo as diferentes regiões de silenciamento, para cada um dos genes, foi feita pela empresa EPOCH LIFE (Estados Unidos). Os oligonucleotídeos para a clonagem no vetor de expressão de dsRNA no vetor L4440 foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas *SmaI* (forward) e *XhoI* (reverse). A cepa de *E. coli* HT115, utilizada como sistema de expressão, foi doada gentilmente pela Universidade de Minnessota, Estados Unidos.

2.4.2 Expressão dos dsRNAs por via recombinante no sistema de expressão *E. coli* HT115. Comparação de indutores da expressão de dsRNA: IPTG e lactose

Os plasmídeos contendo as diferentes construções, sintetizadas na EPOCH Biolabs, para silenciar os genes de CHS foram introduzidos na bactéria através da técnica de choque térmico, em bactérias quimio-competentes pelo método de cloreto de cálcio (Ca₂Cl). Após a transformação, o produto foi cultivado em placas de Ágar LB com adição de ampicilina na concentração final de 100 µg/mL e crescido a 37 °C durante 16 horas em estufa. A partir de uma colônia, foi feito o crescimento em 10 mL de meio LB líquido com adição de ampicilina (100 µg/mL), durante 16 h, em agitação de 170 rotações por minuto (RPM) a 37 °C. A partir deste crescimento foi preparado estoque das células, em glicerol 20%, com um volume final

de 1 mL. Estes estoques foram armazenados em criotubos, congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e guardados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem utilizados.

Para o crescimento bacteriano e posterior indução de expressão da dupla fita de RNA, foi realizado o crescimento do pré-inóculo em meio líquido LB com adição de ampicilina ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) inoculando $200\text{ }\mu\text{L}$ de uma alíquota de estoque em glicerol em 20 mL de meio LB. O crescimento foi realizado durante 16 horas em agitação de 170 RPM. Depois de transcorrido esse tempo, o pré-inóculo foi colocado em 200 mL de LB líquido também com adição de ampicilina ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$). O crescimento foi realizado em agitação de 200 RPM a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingir uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,3-0,5. Uma vez neste ponto, foi coletado o ponto 0 hora (0h) do experimento de indução. Foram coletadas alíquotas a cada hora, para construir a curva de crescimento para cada uma das condições de indução. A expressão do dsRNA foi induzida com isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração de 1 mM ou lactose 10 g/L, como descrito por Einsfeldt (2014) para a expressão de asparaginase e como descrito por Bashir e colaboradores (2015), para a produção de interferon para uso humano. O experimento foi realizado para comparar o rendimento na expressão de dsRNA com cada um dos indutores, lactose e IPTG. Cinco horas após a indução, a biomassa contendo o dsRNA foi coletada e separada por centrifugação. Para cada ensaio de expressão foi utilizada a metodologia descrita acima.

2.4.3 Curva de peso seco da biomassa para a determinação da concentração celular

Para determinar a concentração celular relacionando à absorvância do crescimento bacteriano com cada um dos indutores, foi realizada uma curva de peso seco. As condições de crescimento foram realizadas como descrito anteriormente. O experimento foi realizado em triplicata biológica e experimental. Para a construção da curva, foram realizadas sete diluições das células em água MilliQ e a turbidez celular foi determinada por absorvância a 600 nm. Uma vez completadas às 6 horas de crescimento após a indução, a suspensão foi centrifugada e distribuída em tubos estéreis e secos, previamente pesados em balança analítica (Sartorius). Depois de eliminar o meio de cultura as células foram pesadas para determinar o peso úmido.

O precipitado foi colocado em estufa de secagem durante mais de 10 horas, transcorrido esse tempo, os tubos contendo o precipitado foram novamente pesados e foi comprovada a perda de água por redução do peso, até peso constante. Utilizando os volumes conhecidos foi construída a curva de peso seco para cada um dos indutores e achada à equação da reta para cada caso. A equação da reta na indução com lactose 10 g/L foi:

$y=2,603x$ e a equação da reta na indução com IPTG foi $y=1,744x$. Estas equações foram utilizadas para determinar o aumento da concentração celular ao longo do tempo de crescimento estudado.

2.5 Avaliação da capacidade bioinseticida do lisado de *E. coli* recombinante, produtora de dsRNA

A eficácia dos dsRNA, alvo das diferentes regiões dos genes *CHSA* e *B*, foi testada adicionando a suspensão bacteriana contendo a dupla fita de RNA correspondente a cada região alvo, produzida *in vivo*, diretamente na água de criação. A suspensão bacteriana foi tratada por sonicação com 5 ciclos de 1 min. com intervalos de 30 s para evitar a proliferação das bactérias na água de criação. Este experimento foi feito em triplicata biológica, utilizando 15 larvas L1 por grupo em um volume de 1 mL de água da torneira. Foi utilizado, em todos os casos, uma concentração de 2×10^{-2} µg/mL de células. Os grupos de tratamento foram: controle (sem tratamento com dsRNA); adicionados com a suspensão bacteriana contendo o vetor L4440 sem inserto, e grupos tratados com lisado bacteriano contendo os diferentes dsRNAs: dsRNA2718_1(dsRNAA), dsRNA2718_2(dsRNAB), dsRNA5618_1 (dsRNAC), dsRNA5618_2 (dsRNAD) e dsRNA2718_3 (dsRNAE).

Vinte e quatro horas após o tratamento com os diferentes dsRNAs na água, as larvas de todos os grupos de tratamento foram alimentadas com ração de cachorro a base de galinha. A observação do fenótipo foi feita diariamente no mesmo horário e a mortalidade registrada. No 3º dia após o tratamento com os diferentes dsRNAs, foi extraído o RNA total de três indivíduos de cada grupo e sintetizado o cDNA para a quantificação da expressão relativa dos genes *CHSA* e *CHSB* após o silenciamento.

2.5.1 Inativação da biomassa bacteriana produtora de dsRNA: choque térmico e etanol 75%

Para evitar o crescimento bacteriano e facilitar o acesso das larvas à molécula de dsRNA produzida pela bactéria, foram testados outros dois métodos de inativação antes de adicionar na água de criação. A biomassa foi inativada por choque térmico, utilizando 5 ciclos de 30 s, alternando incubação em gelo e em banho de 100° C. A inativação por etanol foi realizada ressuspensando a biomassa em uma solução aquosa de etanol 75% (v/v), como descrito por ATTASART e colaboradores em 2013.

O lisado bacteriano contendo o dsRNAE (concentração de suspensão bacteriana 2×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$) inativada pelos métodos descritos, acima, foi administrada em criadouros contendo larvas de 1º estágio (L1) em um volume final de 2 mL de água da torneira. Foram utilizados os seguintes grupos de tratamento com 15 larvas cada: (1) larvas controle, sem administração de bactérias; (2) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo L4440 vazio (sem inserto) inativado por choque térmico; (3) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativadas por choque térmico; (4) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo L4440 vazio (sem inserto) inativada com etanol 75% e, (5) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativada com etanol 75%. A experiência foi repetida 3 vezes.

Vinte e quatro horas após adição de cada um dos dsRNAs, separadamente, na água, as larvas de todos os grupos de tratamento foram alimentadas com ração de cachorro a base de galinha. A observação do fenótipo foi feita diariamente no mesmo horário e a mortalidade registrada. No 3º dia após os tratamentos, foi extraído o RNA total de três indivíduos de cada grupo e sintetizado o cDNA para a quantificação da expressão relativa dos genes *CHSA* e *CHSB* após o silenciamento, como descrito anteriormente.

Os insetos que sobreviveram ao tratamento foram acompanhados até a fase adulta, com o objetivo de verificar se, de fato, o efeito do silenciamento era mantido ao longo da vida do inseto.

Como o choque térmico, descrito anteriormente, resultaria em um método com alto custo energético, foram testados métodos alternativos, como por exemplo, a inativação por solução de clorexidina. O precipitado foi inativado usando solução clorexidina comercial da marca Asseptcare[®], vendido como antiséptico de uso humano, para desinfecção de ferimentos, uso externo. Foram testadas as concentrações 0.5% e 1% (v/v) em solução aquosa, com água milliQ. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL desta solução para cada concentração e permaneceu durante uma hora a temperatura ambiente, protegido da luz. Transcorrido esse tempo, 50 μL foram plaqueados em LB Ágar e encubado a 37 °C durante 16 horas na estufa para avaliar a inativação da célula bacteriana.

2.6 Avaliação do tipo de indutor da expressão de dsRNA

Na tentativa de diminuir os custos de produção do bioinseticida, foram comparados também os indutores da expressão do dsRNA, IPTG (1 mM) e lactose (10 g/L), com as condições de crescimento descritas anteriormente.

Para comparar a eficácia na indução do fenótipo de silenciamento utilizando os diferentes indutores para a expressão do dsRNAE, a suspensão bacteriana, inativada por solução aquosa de clorexidina comercial (0.5 % v/v) foi administrada na concentração de 2×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ em criadouros contendo larvas de primeiro estágio (L1) em um volume final de 2 mL de água da torneira. Foram utilizados os seguintes grupos de tratamento com quinze larvas cada: (1) larvas controle, sem administração de bactérias; (2) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo L4440 vazio (sem inserto); (3) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE, o bioinseticida, cuja expressão foi induzida com lactose (10 g/L); (4) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE, cuja expressão foi induzida com IPTG (1 mM) e (5) larvas inativadas com a solução clorexidina, como controle de toxicidade. A experiência foi repetida 3 vezes. A mortalidade foi quantificada após 24 e 48 horas de iniciado o experimento. Vinte e quatro horas depois de iniciado o experimento, foi extraído RNA para quantificar a redução da expressão dos genes *CHSA* e *B* foi verificada por qPCR como descrito anteriormente.

Após selecionar o melhor tratamento de inativação da bactéria, o dsRNA foi purificado, para comprovar a expressão em *E. coli* HT115 após a indução. Para isso foi utilizado o método de precipitação por fenol ácido como descrito por FLEGR em 1987. Brevemente, após a lise das células, as mesmas são ressuspensas em fenol pH 4, previamente equilibrado com 50 mM de acetato de sódio pH 4. Depois de misturar vigorosamente por 3 minutos, a fase aquosa foi extraída com 8 volumes de clorofórmio e álcool isoamílico (4:11). As fases foram separadas por centrifugação e precipitadas com isopropanol, utilizando três ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido. O precipitado obtido foi lavado com etanol 60% em solução aquosa (v/v) e seco à temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em água para uso de biologia molecular. Ambos os métodos de extração foram realizados em triplicata experimental. O produto do isolamento do dsRNA por ambos métodos foi dosado utilizando Qubit RNA HS kit (Qubit fluorimeter v 2.0), seguindo as instruções do fabricante. A estimativa da produção de número de cópias de dsRNA foi feita utilizando a relação:

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias} = [\text{X}(\text{ng}) \times (6.0221 \times 10^{23} \text{ moléculas /mol}) / 1 \times 10^9 \text{ ng/g} \times \text{AMW}(\text{g/mol})];$$

Sendo: X (ng) a massa RNA e AMW a média da contribuição de massa de cada nucleotídeo da sequência específica de dsRNA que se quer calcular, achando este valor pela fórmula:

$$\text{AMW (Average Molecular Weight)} = (\text{An} \times 392) + (\text{Un} \times 306.2) + (\text{Cn} \times 305.2) + (\text{Gn} \times 345.2) + 159;$$

Sendo An, Un, Cn e Gn o número de nucleotídeos Adenina, Uracila, Citocina e Guanina presentes na sequência, respectivamente (WHELAN e RUSSELL, 2003).

O produto também foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). A corrida foi realizada em voltagem constante de 90 V (BioRad) e as bandas resultantes da separação eletroforética foram visualizadas sob luz UV.

2.7 Ação adjuvante do lisado bacteriano contendo dsRNAE e diflubenzuron

Para testar o potencial adjuvante do bioinseticida, este foi associado a outro inseticida, o diflubenzuron (DFB), inibidor da síntese de quitina. Três grupos de quinze larvas cada, foram tratados da seguinte forma: (1) Larvas sem tratamento alimentadas com ração; (2) as larvas de 1º estágio foram alimentadas com ração durante três dias, no 3º dia foram adicionados o inseticida DFB na concentração de 10^{-4} mg/L em solvente acetona; (3) as larvas de 1º estágio foram tratadas com bactéria produtora de dsRNAE, inativada por choque térmico, na concentração final de 2×10^{-2} µg/mL e no 3º dia foi adicionado o solvente acetona; (4) as larvas foram tratadas no 1º estágio com lisado bacteriano contendo dsRNAE e ao atingir o 3º estágio foram tratadas com DFB (10^{-4} mg/L); (5) as larvas foram tratadas com solvente acetona, adicionado no 3º estágio.

Vinte e quatro horas após adição dos dsRNA na água, separados, as larvas de todos os grupos de tratamento foram alimentadas com ração de cachorro a base de galinha. A observação do fenótipo foi feita diariamente no mesmo horário e a mortalidade foi registrada.

2.8 Capacidade de indução do fenótipo de silenciamento do bioinseticida em estágios avançados do desenvolvimento do inseto

Para comprovar que o bioinseticida, suspensão bacteriana inativada por solução aquosa de clorexidina comercial, era efetivo mesmo em estágios avançados do desenvolvimento da larva, o mesmo foi administrado na concentração de concentração final de 2×10^{-2} µg/mL (0.5% v/v) em uma em criadouros contendo larvas de 4º estágio (L4) com volume final de 2 mL de água da torneira. Foram utilizados os seguintes grupos de tratamento com quinze larvas cada: (1) larvas controle, sem administração de bactérias; (2) larvas tratadas com lisado bacteriano contendo L4440 vazio (sem inserto); (3) larvas tratadas com

lisado bacteriano contendo dsRNAE, cuja expressão foi induzida com lactose 10 g/L (p/v). Foi incluído um grupo tratado somente com solução aquosa de clorexidina comercial (0.5% v/v), para descartar a toxicidade da solução de clorexidina na larva (5). A experiência foi repetida 3 vezes. A mortalidade foi quantificada 24 e 72 h depois do início do experimento. Foi observado desenvolvimento nos indivíduos que sobreviveram ao tratamento. A redução da expressão dos genes *CHSA* e *B* foi verificada por qPCR como descrito em **2.10.1**.

2.9 Efeito da concentração do bioinseticida na indução do fenótipo de silenciamento

Para comprovar se o fenótipo de silenciamento gênico era induzido, inclusive, com doses inferiores do bioinseticida, o mesmo foi administrado também nas concentrações 2×10^{-3} e 2×10^{-4} µg/mL de células utilizando quintuplicata biológica de 20 larvas de 1º estágio (L1). Em todos os casos, a inativação foi realizada com solução aquosa de clorexidina 0.5% (v/v).

Foram realizados os seguintes grupos de tratamento: (1) larvas controle, sem administração de bactérias; (2) larvas tratadas com lisado bacteriano na concentração de 2×10^{-2} µg/mL, contendo L4440 vazio (sem inserto); (3) larvas tratadas com bioinseticida na concentração de 2×10^{-2} µg/mL; (4) larvas tratadas com bioinseticida na concentração 2×10^{-3} µg/mL (5) larvas tratadas com bioinseticida na concentração 2×10^{-4} µg/mL. Vinte e quatro horas após adição dos dsRNA na água, separados, as larvas de todos os grupos de tratamento foram alimentadas com ração de cachorro a base de galinha. A observação do fenótipo foi feita diariamente no mesmo horário e a mortalidade registrada. No 3º dia após o tratamento com o bioinseticida, foi extraído o RNA total de três indivíduos de cada três grupos e sintetizado o cDNA para a quantificação da expressão relativa dos genes *CHSA* e *CHSB* após o silenciamento, como descrito em **2.10.1**.

2.10 Avaliação do fenótipo dos insetos após o tratamento com o bioinseticida utilizando técnicas de microscopia e biologia molecular

2.10.1 Quantificação relativa da redução da expressão dos genes *CHSA* e *B* após a indução do silenciamento

Para verificar a associação do fenótipo de mortalidade das larvas tratadas com o silenciamento dos genes *CHSA* e *B* induzido por dsRNA produzidos *in vitro* e *in vivo*, a expressão dos genes de CHS foi medida por reação em cadeia da polimerase em tempo real

(PCR quantitativo, qPCR, siglas em inglês). Após 72h da indução do silenciamento, o RNA total de três larvas de cada réplica dos grupos experimentais foi extraído. A partir do RNA extraído foi sintetizado o cDNA para as reações de quantificação por técnica de RT-PCR. As reações foram feitas utilizando 7,5 µL da mistura de reação do reagente SYBR-GREEN PCR master MIX (Applied Biosystems, EUA), 5 µL de cDNA diluído 1:50 e 2,5 µL da mistura de iniciadores específicos desenhados para o gene *CHS* A ou B ou iniciadores específicos para o gene ribossomal 6 (*RPS6*) (AAEL000032-PA), utilizado como controle endógeno, por não apresentar mudanças na sua expressão para as condições estudadas (FIGUEIRA-MANSUR, 2013). As reações foram feitas no termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) com o ciclo: 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min; seguido pelas etapas de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a 53 °C por 15 s e extensão a 72 °C por 1 min, que foram repetidas 35 vezes; seguidas por curva de dissociação, em condições padrão do aparelho. Os valores de Ct foram normalizados usando como referência o gene ribossomal 6 (*RPS6*). Os Cts normalizados foram usados para calcular o nível de expressão gênica relativa nas amostras usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK K.J., 2001). A expressão nos controles foi considerada como nível basal (ou 1).

2.10.2 Microscopia

Para a observação dos efeitos do silenciamento nas estruturas compostas por quitina, cutícula e intestino, as larvas de 1º estágio foram tratadas com lisado bacteriano na concentração de 2×10^{-2} µg/mL contendo dsRNAE, previamente inativado com solução aquosa de clorexidina 0.5% (v/v). As larvas que sobreviveram ao tratamento foram observadas utilizando microscópio estereoscópico, do tipo Leica M205-FA, de luz visível 48 horas após a indução do silenciamento, com barra de escala de tamanho de 1 mm e 2 mm.

2.10.3 Microscopia de fluorescência

As larvas que sobreviveram, foram analisadas por técnica de microscopia de fluorescência com a sonda específica, aglutinina de germe de trigo, ligada à isotiocianato de fluoresceína (FITC-WGA) para detecção de quitina. A sonda foi reconstituída, com PBS 20 mM, seguindo as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich) e as larvas foram deixadas em contato com a solução contendo a sonda durante uma hora, protegidas da luz. Transcorrido esse tempo, a

observação foi feita sob $\lambda_{\text{ex}}=495$ nm e $\lambda_{\text{em}}=521$ nm, no microscópio de luz invertida (Evos) com aumento de quatro vezes do tamanho do espécime e barra de escala de 1 mm.

2.10.4 Fluorescência por hibridação *in situ* (FISH)

A tecnologia de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) permite a detecção de ácidos nucleicos alvo de uma molécula específica marcada com uma sonda fuorescente dentro de um espécime biológico, mostrando onde este alvo se encontra. Para esta técnica, foi utilizado o FISH Tag™ RNA Kits (Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, foi realizada a linearização por digestão enzimática do plasmídeo L4440 contendo o inserto (dsRNAE) com a enzima de restrição *SmaI*. O produto desta digestão foi purificado, logo foi realizada a transcrição *in vitro* para introduzir uma modificação no grupamento amino do nucleotídeo UTP do dsRNAE. Posteriormente, o produto modificado e purificado é incubado com a sonda. Estes compostos ésteres ativos reagem com as amins primárias incorporadas no molde da sonda, conjugando covalentemente o corante com a base modificada.

O protocolo de hibridação foi realizado como sugerido pelo fabricante, sendo modificado com a adição de um passo prévio de *bleaching* (branqueamento), feito utilizando uma solução de etanol e peróxido de hidrogênio 6% como descrito por KOGA e colaboradores (2009), com o objetivo de minimizar a autofluorescência da larva. Os espécimes selecionados para a hibridação foram larvas de 4º estágio (L4), criadas sob as condições da colônia, descritas previamente. Como controle da especificidade da hibridação foi utilizado um dsRNA não relacionado que tem como alvo o receptor olfatório OR80 de *Rhodnius prolixus* (dsRNAOR80). Para verificar a diminuição do transcrito da CHSB, após o tratamento com o bioinseticida, foram também utilizadas larvas L4, sobreviventes ao tratamento feito com o bioinseticida, no 1º estágio da fase larval, na concentração de 2×10^{-2} µg/mL de células, previamente inativadas com solução de clorexidina. A observação do sinal de fluorescência foi feita sob $\lambda_{\text{ex}}=590$ nm e $\lambda_{\text{em}}=615$ nm, respectivamente, no microscópio de luz invertida (Evos) com aumento de quatro vezes do tamanho do espécime e escala de 1 mm.

2.11 Estabilidade do bioinseticida em condições ambientais. Prova de estocagem

O desenvolvimento de um bioinseticida contra o mosquito *Ae. aegypti* deve visar, entre outros aspectos, a persistência da dupla fita de RNA no ambiente. Para verificar o tempo de

resistência da dupla fita de RNA nas condições ambientais, o lisado bacteriano contendo dsRNAE, após ser inativado com solução aquosa de clorexidina 0.5% (v/v), foi ressuspenso em 1 litro de água da torneira, na concentração de 2×10^{-2} µg/mL e colocado a temperatura ambiente durante dois meses. Transcorrido esse tempo, foi separada uma alíquota de 1 mL e o isolamento do dsRNA foi realizado por precipitação com fenol ácido, como descrito anteriormente (FLEGR, 1987). O mesmo procedimento de isolamento do dsRNA foi realizado a partir de uma suspensão bacteriana obtida da cultura fresca. O produto também foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

Em sequência, uma representação esquemática, resumida, dos experimentos conduzidos para produção e indução de silenciamento gênico com o bioinseticida neste trabalho, como proposta para o controle da população do mosquito *Ae. aegypti*.

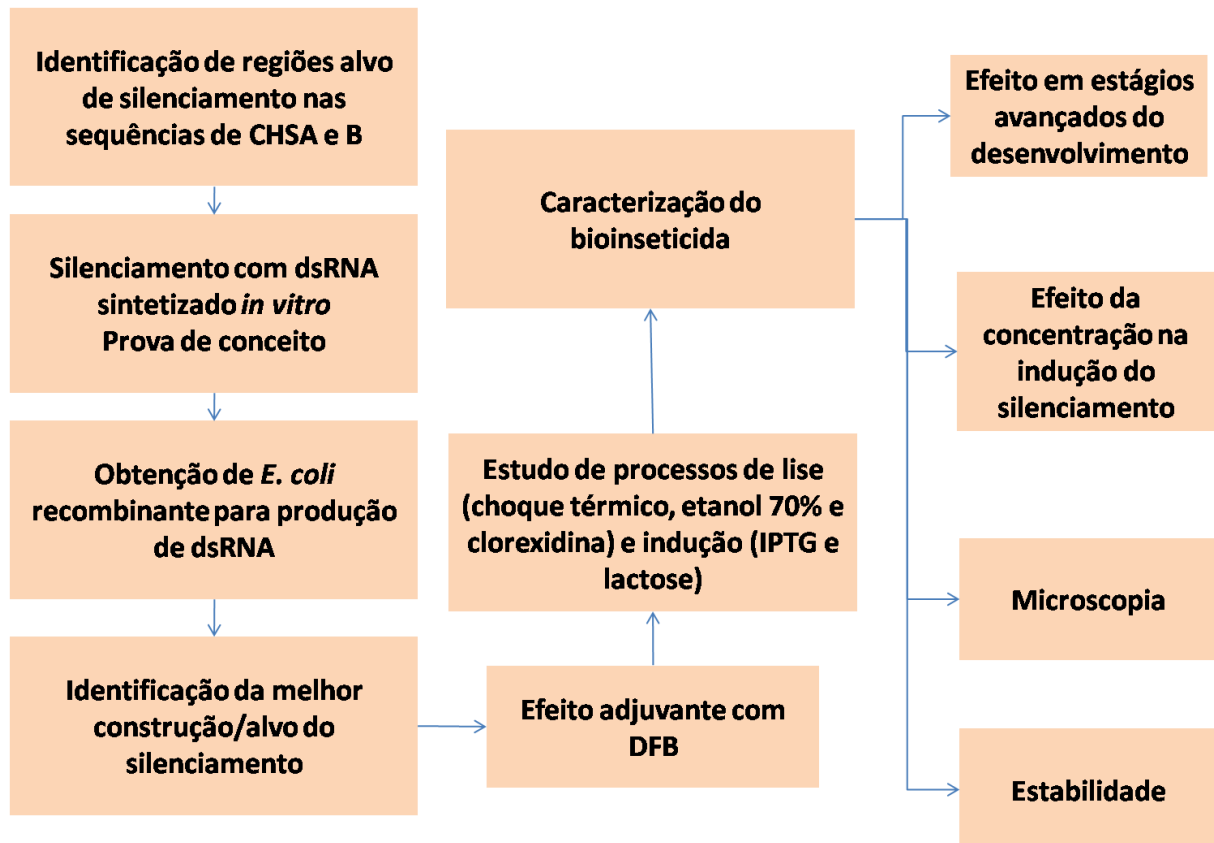


Figura 5. Representação esquemática do fluxograma geral da proposta de produção e avaliação do bioinseticida: efeito larvicida, pelo silenciamento gênico das enzimas CHSA e B, a través do mecanismo de RNAi.

3. RESULTADOS

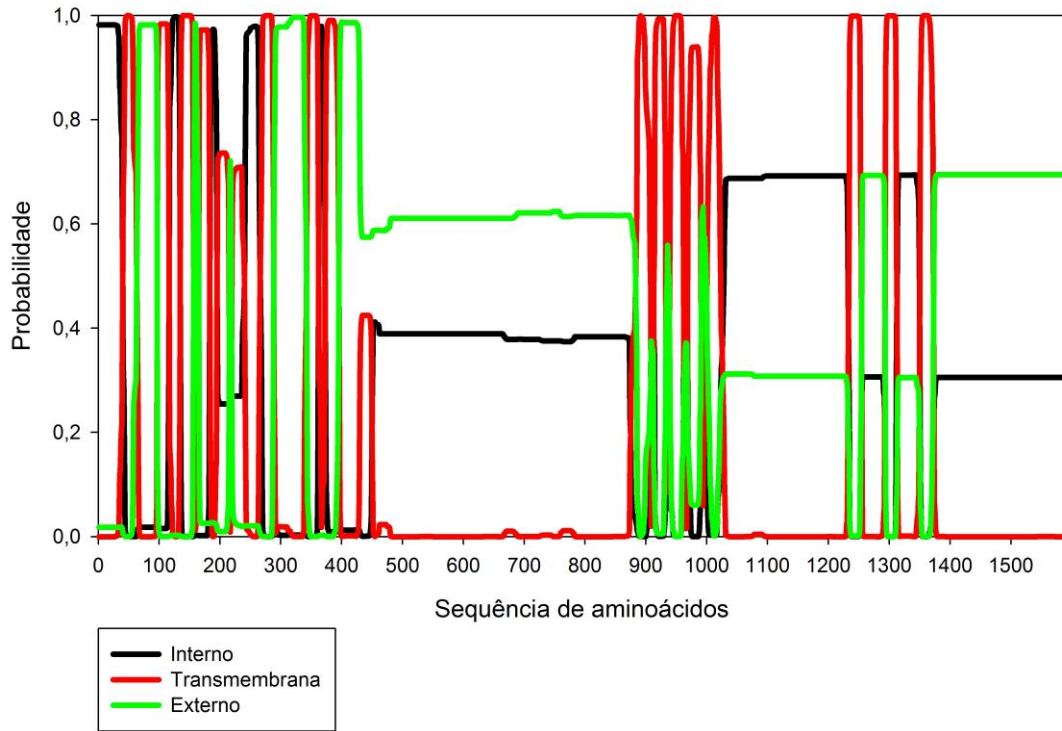
3.1 Eficácia dos dsRNA, produzidos, *in vitro*, para induzir o silenciamento de genes de CHSs em larvas de *Ae. aegypti*, prova de conceito

3.1.1 Caracterização *in silico* das CHSs e seleção das regiões alvo do silenciamento

A primeira etapa deste trabalho foi a busca das sequências proteicas e de cDNA correspondentes às CHSA e B do mosquito *Ae. aegypti* (NENE et al, 2007) para escolher as regiões alvo de silenciamento por RNAi. O resultado da busca no banco de dados Vector Base revelou a presença de dois genes, AAEL002718-RA e AAEL005618-RA, pertencente ao mosquito *Ae. aegypti*, sendo que esse último gene já havia sido caracterizado para o intestino do inseto (IBRAHIM et al, 2000). Na busca foram obtidas as sequências proteicas e de cDNA correspondentes aos genes. As duas sequências proteicas encontradas foram analisadas por BLASTp (blast.ncbi.nlm.nih.gov), observando-se que havia mais de 70% de similaridade das sequências de CHSs do mosquito com outras descritas para organismos como *Apis mellifera*, *Culex quinquefasciatus*, várias espécies do gênero *Drosophila*, entre outras. Como forma de comprovar se as sequências de proteicas de CHSs preditas eram, de fato, CHSs do mosquito *Ae. aegypti*, foram feitas avaliações de regiões transmembranas e dos motivos conservados, identificação de assinatura, *in silico*.

Para comprovar a presença dos domínios transmembranas, característicos de CHSs, as sequências de aminoácidos correspondentes às CHSA (AAEL002718-PA) e CHSB (AAEL005618-PA) foram analisadas utilizando a ferramenta de predição TMHMM (KROGH et al, 2001). Na Figura 6, é apresentado um gráfico com a maior probabilidade de predição dos domínios transmembranas, sendo sete domínios transmembranas para CHSA (Figura 6A) e CHSB (Figura 6B), como descrito na literatura para outras CHSs (MERZENDORFER, 2006).

A



B

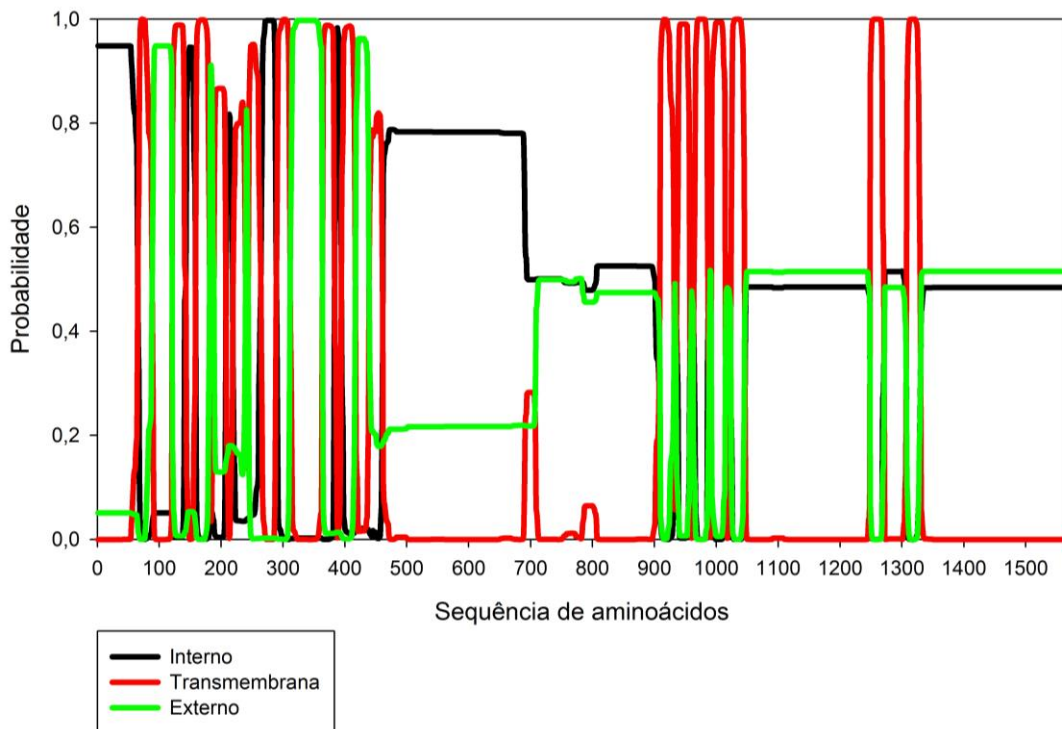


Figura 6. Predição da presença de domínios transmembranas utilizando as sequências de aminoácidos das CHSs do mosquito *Ae. aegypti*. Probabilidade de formação de domínios transmembranas para CHSA (A) e para CHSB (B).

Após a identificação destas estruturas transmembranas, o próximo passo foi verificar a presença dos motivos EDR e QRRRW, descritos como assinaturas moleculares das CHSs. Para isso, foram alinhadas as sequências de CHSs A e B de *Aedes aegypti*, com as sequências de CHSs de vários organismos descritos na literatura: *T. castaneum* (NP_001034491.1 CHSA e AAQ62692.1 CHS B), *A. tristis* (AFM38193.1 CHS) e outros organismos não pertencente à classe *Insecta* (*C. elegans* (NP_492113.2 CHS) e *S. cereviciae* (NP_009594.1 CHS2) utilizando a ferramenta MULTIALIN (CORPET, 1988). Na Figura 7 é apresentado parte do alinhamento das sequências AAEL002718-PA e AAEL005618-PA do mosquito com as demais sequências citadas acima, destacando-se os motivos da assinatura molecular, como descritos por IBRAHIM e colaboradores (2000) e MEZERDORFER (2011), verificando assim a identidade das proteínas do mosquito como CHSs.

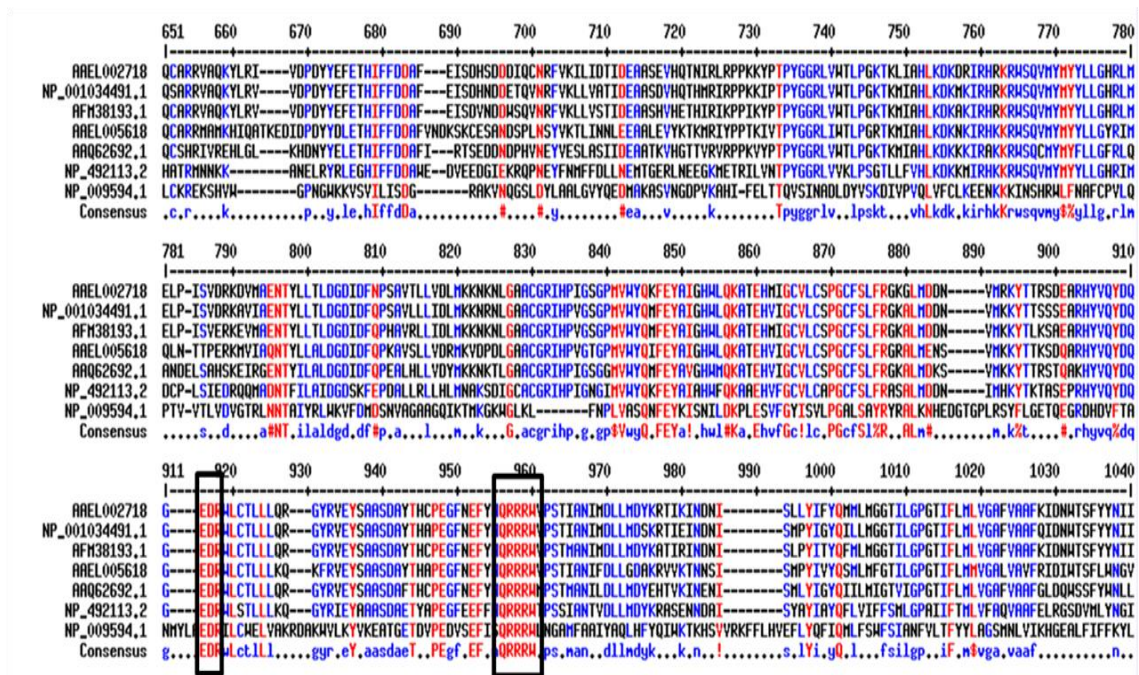


Figura 7. Alinhamento das sequências de aminoácidos encontradas para CHSA e B de *Ae. aegypti*, com outras sequências de inseto: *T. castaneum* (NP_001034491.1 CHSA e AAQ62692.1 CHSB), *A. tristis* (AFM38193.1 CHS) e outros organismos não pertencente à classe *Insecta* (*C. elegans* NP_492113.2 CHS) e *S. cereviciae* (NP_009594.1 CHS2). Identificação dos motivos QRRRW e EDR, descritos como assinatura molecular das CHSs (destacados em caixas na cor preta).

Considerando as sequências de cDNA de CHSA e B encontradas no mosquito *Ae. aegypti*, o próximo passo foi a seleção das regiões alvo de silenciamento gênico. Estas regiões foram escolhidas levando em consideração a similaridade entre as sequências de cDNA de ambas as CHSA e B. As sequências de cDNA foram alinhadas utilizando a ferramenta MULTIALIN (CORPET, 1988) e as regiões foram selecionadas. A Figura 8 mostra as regiões utilizadas como alvo de silenciamento nas sequências identificadas, AAEL002718-RA (CHSA) e AAEL005618-RA (CHSB) do mosquito *Ae. aegypti*.

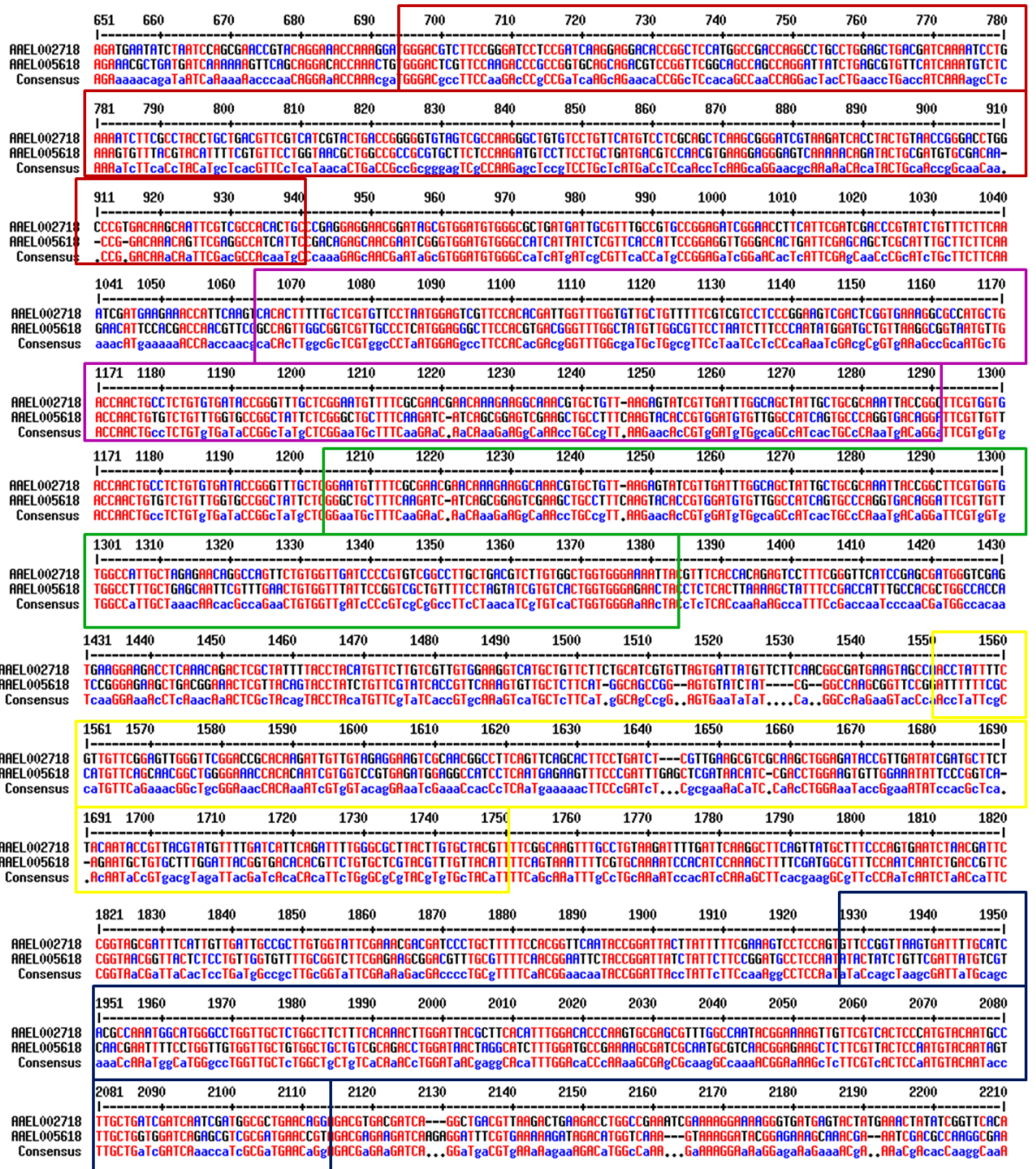


Figura 8. Seleção das regiões alvo do silenciamento gênico. Alinhamento parcial das sequências de cDNA das CHSs A (AAEL002718-RA) e B (AAEL005618-RA). Regiões selecionadas para CHSA, na sequência de nucleotídeos (nt): 2718_1 (1550 nt-1750 nt) dentro da caixa de cor amarela; 2718_2 (1064 nt-1291 nt), caixa de

cor roxa. Para CHSB: 5618_1 (1205 nt-1384 nt), caixa de cor verde; 5618_2 (693 nt-940 nt) caixa de cor vermelha. A região homóloga entre as CHS A e B, 2718_3, tendo como referência à CHSA (2718: 1928 nt-2114 nt) dentro da caixa de cor azul escuro.

Em seguida foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a síntese dos dsRNAs, *in vitro* e para a clonagem das sequências de cDNA, selecionadas como alvo para o silenciamento gênico, no vetor de expressão L4440, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos que delimitam as sequências usadas como alvo de silenciamento das CHSA e B.

Região alvo do silenciamento gênico	Oligonucleotídeos para silenciamento
2718_1 (dsRNAA)	F_5' TAATACGACTCACTATAGGG CCTATTTTCGTTGTTCCGGAG 3' R_5' TAATACGACTCACTATAGGG CCGAAAACGTAGCACAAGTA 3'
2718_2 (dsRNAB)	F_5' TAATACGACTCACTATAGGG ACACTTTTTCGTCGTGTTTC 3' R_5' TAATACGACTCACTATAGGG AAGCCGGTAATTTGCGCAG 3'
5618_1 (dsRNAC)	F_5' TAATACGACTCACTATAGGG TTTCGCCATGTTTCAGCAACG 3' R_5' TAATACGACTCACTATAGGG TACGAGCACAGAACGTGTGT 3'
5618_2 (dsRNAD)	F_5' TAATACGACTCACTATAGGG TTCTTCAAGAACATTCCAC 3' R_5' TAATACGACTCACTATAGGG TGGCACTGATGCCA 3'
2718_3 (dsRNAE)	F_5' TAATACGACTCACTATAGGG GTAAAGTGATTTTCATCA 3' R_5' TAATACGACTCACTATAGGG ACGTCCTGTTTCAGCGCC 3'

3.2 Indução do silenciamento com os dsRNAs produzidos *in vitro*: Prova de conceito

Uma vez sintetizado os dsRNAs, *in vitro*, correspondentes a cada região alvo de silenciamento, foi verificado o efeito larvicida destas moléculas, adicionadas separadamente, na água de criação das larvas de 1º estágio (L1). As larvas em L1 foram tratadas com 2 µg/mL de cada dsRNA e a taxa de mortalidade determinada. A Figura 9 mostra que o grupo tratado com dsRNAE, alvo da região nomeada 2718_3, apresentou uma taxa de mortalidade em torno

de 90 %, enquanto que os demais tratamentos induziram uma taxa em torno de 70% quando comparados aos grupos controles (sem adição de dsRNA e com adição de dsRNA para o gene *maltose binding protein* de *E. coli*, gene não relacionado, dsRNAMalE). Entre os grupos controles não foram observadas diferenças significativas na taxa de mortalidade. Também foi acompanhado o desenvolvimento das larvas nos grupos tratados com os diferentes dsRNAs e foi observado que as larvas sobreviventes atrasaram o processo de pupação (resultado não apresentado). Na Figura 9 pode ser observado que todos os dsRNAs sintetizados *in vitro*, tendo como alvo as regiões de CHSs para silenciamento, foram capazes de induzir a mortalidade, tendo assim potencial inseticida.

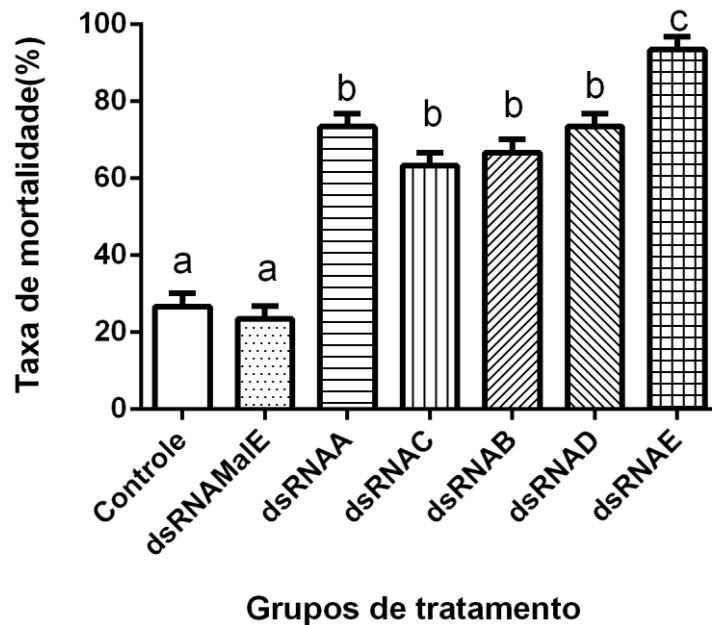


Figura 9. Taxa de mortalidade (%) no 3º dia após tratamento com os diferentes dsRNAs: dsRNAMalE, dsRNA2718_1 (dsRNAA), dsRNA2718_2 (dsRNAB), dsRNA5618_1 (dsRNAC), dsRNA5618_2 (dsRNAD) e dsRNA2718_3 (dsRNAE) produzidos, *in vitro*, e grupos controles, sem adição de dsRNA e com adição de dsRNA para o gene MalE (*maltose binding protein* de *E. coli*, gene não relacionado). A taxa de mortalidade para cada grupo foi obtida com três réplicas de 10 larvas cada. A barra representa a média da mortalidade \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

Em seguida foi verificado, mediante qPCR, se a taxa de mortalidade estava diretamente relacionada à redução da expressão relativa dos transcritos das CHSs, usando o dsRNAE sintetizado *in vitro*. Como apresentado na Figura 10, o grupo tratado com dsRNAE, teve uma redução da expressão do gene que codifica para CHSA em torno de 50 % enquanto a expressão do gene que codifica para CHSB foi em torno de 80 % menor quando

comparados as larvas dos controles, sem tratamento com dsRNA e com o tratamento com dsRNAMaIE.

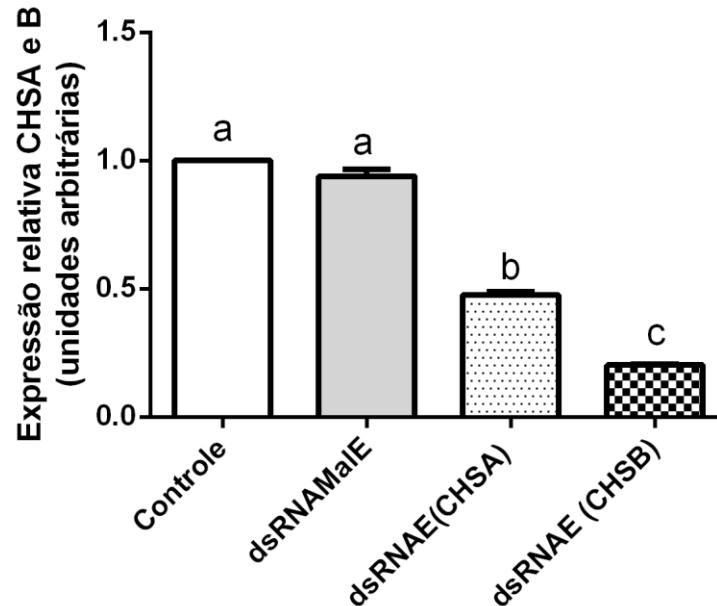


Figura 10. Expressão relativa dos genes CHSA e B no grupo silenciado com o dsRNAE, produzido *in vitro*, comparado com os controles da experiência: controle, (alimentado só com ração) e controle com dsRNAMaIE (dsRNA). A expressão relativa foi obtida com 3 réplicas de 3 larvas cada. A expressão das larvas controle foi considerada como nível basal (ou 1). O gene *RPS6* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

3.3 Atividade bioinseticida, de *E. coli* recombinante contendo dsRNAs correspondentes às regiões alvo nos genes de CHSA e B.

Uma vez estabelecidas as condições iniciais da expressão dos dsRNAs, tendo como alvo cada região selecionada nas sequências das CHSs A e B, foi verificada a capacidade de induzir mortalidade utilizando a suspensão bacteriana que expressa o dsRNA, administrada na água de criação, como bioinseticida, objetivo deste trabalho. Em uma primeira tentativa, a suspensão de bactérias contendo os dsRNAs foi adicionada sem ser inativada na água de criação da larva. Nesta experiência foi observada proliferação bacteriana na água de criação das larvas e mortalidade absoluta em todos os grupos em que foi adicionada a suspensão, inclusive no controle, bactéria sem dsRNA (resultado não apresentado). Por esta razão, a suspensão bacteriana, após expressão com o indutor IPTG 1 mM, foi sonicada para a inativação e foi adicionada diretamente na água de criação das larvas de 1º estágio, na concentração de 2×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ sendo verificada a viabilidade das larvas. Os resultados obtidos

são apresentados na figura 11. A taxa de mortalidade foi significativa, para todos os grupos tratados quando comparados aos controles: sem adição de lisado bacteriano e o segundo controle, a bactéria transformada com o plasmídeo L4440 vazio. Estes grupos controles não apresentaram diferenças de mortalidade entre si. No entanto, a maior taxa de mortalidade foi alcançada no grupo de tratamento dsRNAE, sendo em torno de 90%, com diferenças significativas quando comparado ao resto dos grupos tratados com o lisado bacteriano contendo os dsRNAs, nos quais a mortalidade esteve em torno de 40%. O resultado dessa experiência demonstra que a suspensão bacteriana, contendo todas as duplas fitas de RNA, tendo como alvo as regiões selecionadas são capazes de induzir a mortalidade das larvas, potenciais inseticidas.

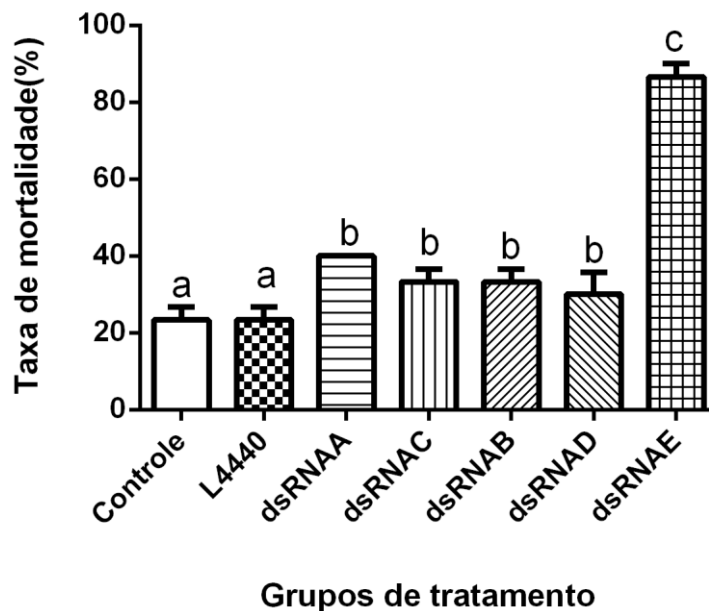


Figura 11. Taxa de mortalidade (%) no 3º dia após tratamentos com *E. coli* recombinante, lisada por ultrassom, contendo os diferentes dsRNAs: dsRNA2718_1 (dsRNAA), dsRNA2718_2 (dsRNAB), dsRNA5618_1 (dsRNAC), dsRNA5618_2 (dsRNAD) e dsRNAE (dsRNAE) produzidos *in vivo* e grupos controles, sem adição de dsRNA e com adição de *E. coli* transformada com o vetor L4440 sem inserto. A taxa de mortalidade para cada grupo foi obtida com três réplicas de 15 larvas cada. A barra representa a média da mortalidade \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0.05$.

Para comprovar se a construção (dsRNAE) que provocou maior mortalidade estava diretamente relacionada à redução na expressão gênica relativa das duas CHSs foi realizada a quantificação relativa dos transcritos de *CHSA* e *B* por qPCR. Como mostrado na figura 12, o grupo tratado com dsRNAE, desenhado com o objetivo de silenciar simultaneamente a expressão das duas CHSs, teve uma redução da expressão do gene que codifica para CHSA

em torno de 40% enquanto a expressão do gene que codifica para CHSB foi em torno de 75% menor quando comparados as larvas dos controles, sem tratamento com dsRNA e com o tratamento com L4440.

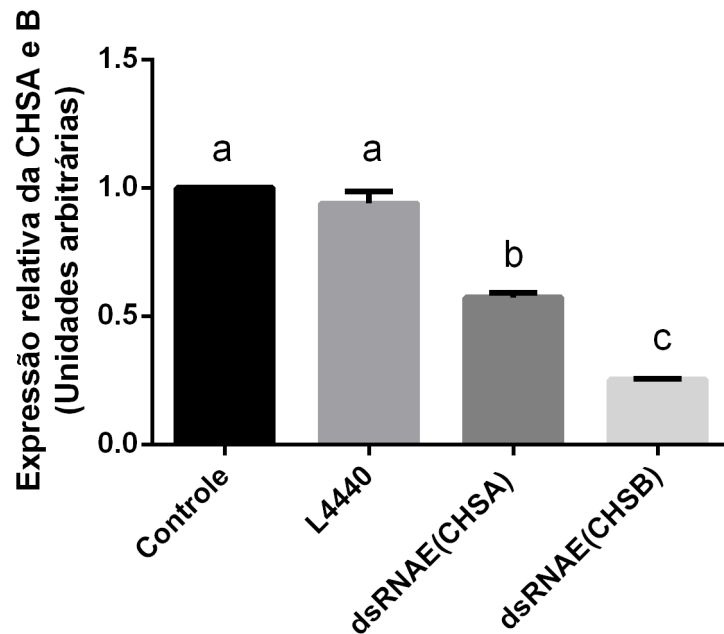


Figura 12. Expressão relativa dos genes *CHSA* e *B* no grupo silenciado com o dsRNAE produzido por via recombinante comparado com os controles da experiência: controle, (alimentado só com ração) e controle com L4440 (vetor vazio). A expressão relativa foi obtida com 3 réplicas de 3 larvas cada. A expressão das larvas controle foi considerada como nível basal (ou 1). O gene *RPS6* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

3.4 Estudo de métodos de inativação da biomassa bacteriana produtora de dsRNA: choque térmico e etanol 75%

O próximo passo foi testar abordagens mais simples e de menor custo para a inativação da suspensão bacteriana e como primeira tentativa, a suspensão bacteriana foi inativada de duas maneiras: por choque térmico e utilizando solução de etanol 75%. A suspensão bacteriana contendo dsRNAE, inativada por choque térmico ou etanol 75%, como descrito em Material e Métodos, foi administrada, na água de criação de três grupos de 15 larvas cada. Como observado na figura 13, a taxa de mortalidade foi significativa, em torno de 40%, somente no grupo de tratamento onde as bactérias foram inativadas por choque térmico, quando comparados aos grupos controle (sem adição de lisado bacteriano e com adição do lisado contendo L4440 vazio) ou inativados por etanol.

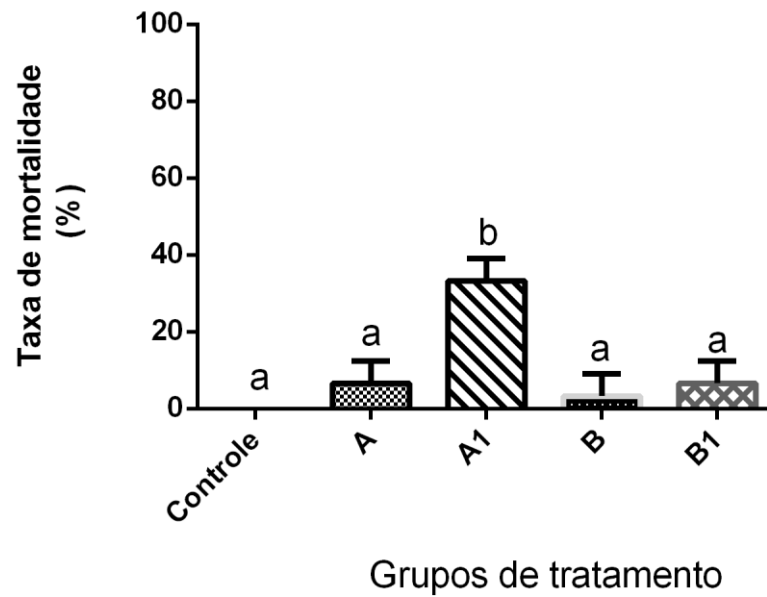


Figura 13. Taxa de mortalidade (%) no 3º dia após tratamentos com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativado por choque térmico ou adição de etanol 75%. Controle- larvas sem adição de bactérias, A: larvas adicionadas *E. coli* HT115 transformada com L4440 vazio (sem inserto) inativada por choque térmico, A1: larvas adicionadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativada por choque térmico, B: larvas adicionadas com *E. coli* HT115 transformada com L4440 vazio (sem inserto) inativada com etanol 75%, B1- larvas adicionadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativada com etanol 75%. A taxa de mortalidade foi obtida com 3 réplicas de 15 larvas cada. A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes indicam significância estatística para $p < 0.05$.

Em seguida, para verificar a relação da mortalidade observada com a redução da expressão dos genes da *CHSA* e *B*, foi realizada a quantificação relativa dos transcritos por qPCR, utilizando amostras do grupo tratado com lisado bacteriano contendo dsRNAE inativado por choque térmico como mostrado no gráfico da figura 14. Como pode ser observado nesta figura, a redução da expressão dos genes que codificam para *CHSA* e *B* foi de 51 e 52% menor respectivamente, mostrando que a diminuição da expressão relativa dos genes indica que o fenótipo de mortalidade está associado ao silenciamento induzido pelo dsRNAE. Desta forma, para o resto dos experimentos deste trabalho foi selecionada a cepa de *E. coli* HT115 transformada com o vetor contendo como alvo a região 2718_3 (dsRNAE) (ver Tabela 1), capaz de induzir uma maior mortalidade, significativa, quando comparado ao resto das construções e aos controles.

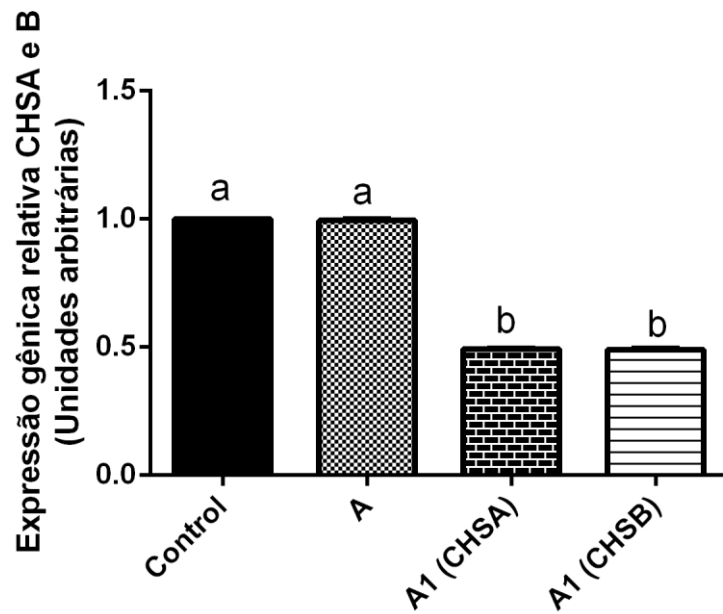


Figura 14. Expressão relativa dos genes *CHSA* e *B* no grupo silenciado com o dsRNAE produzido por via recombinante. O lisado bacteriano que foi inativado por choque térmico, comparado com os controles da experiência: controle, (alimentado só com ração) e controle com L4440 (vetor vazio) inativado por choque térmico (A). A expressão relativa foi obtida com 3 grupos de 3 larvas cada. A expressão gênica das larvas controle foi considerada como nível basal (ou 1). O gene *RPS6* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. A barra representa a média \pm (desvio padrão) da expressão gênica relativa de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

Também nesta experiência, as larvas que sobreviveram ao tratamento com o bioinseticida (lisado bacteriano contendo dsRNAE) e as larvas do grupo controle foram acompanhadas até o estágio adulto. Na figura 15 são apresentados dois indivíduos machos adultos, um deles do grupo controle (sem adição de lisado bacteriano contendo dsRNA) e o único sobrevivente que atingiu a fase adulta do grupo tratado com bioinseticida. O macho proveniente deste tratamento apresentou-se menor em tamanho quando comparado ao controle. Este inseto também apresentou maior fragilidade em suas estruturas e era incapaz de voar e de se alimentar.



Tratado com bioinseticida

Controle

Figura 15. Imagens representativas de mosquitos adultos: macho do grupo controle (à direita) e tratado com lisado bacteriano contendo dsRNAE inativada com calor (à esquerda), sobre papel milimetrado (cada divisão corresponde a 1 milímetro).

3.5 Avaliações do potencial do bioinseticida como adjuvante de inseticida associado com diflubenzuron, inibidor da síntese de quitina

A seguir foi investigada a capacidade adjuvante de inseticida do lisado bacteriano contendo dsRNAE, produzido nas condições estabelecidas até o momento. Neste caso, foi utilizado um inibidor da síntese de quitina, diflubenzuron (DFB), como inseticida. Na figura 16 pode ser observado que a droga DFB, 10^{-4} mg/L, sozinha matou aproximadamente 37% das larvas, enquanto o bioinseticida, na concentração de 2×10^{-2} μ g/mL sozinhos, matou em torno de 43% no 6º dia após o tratamento. Na associação do bioinseticida com DFB o percentual de mortalidade das larvas foi aproximadamente de 73%. A potencialização da associação da bactéria produtora de dsRNAE com DFB aumentou, aproximadamente, duas vezes a eficácia do tratamento quando comparado com o uso do DFB sozinho e aproximadamente 1,7 vezes quando comparado com o tratamento com a bactéria produtora de dsRNAE sozinha.

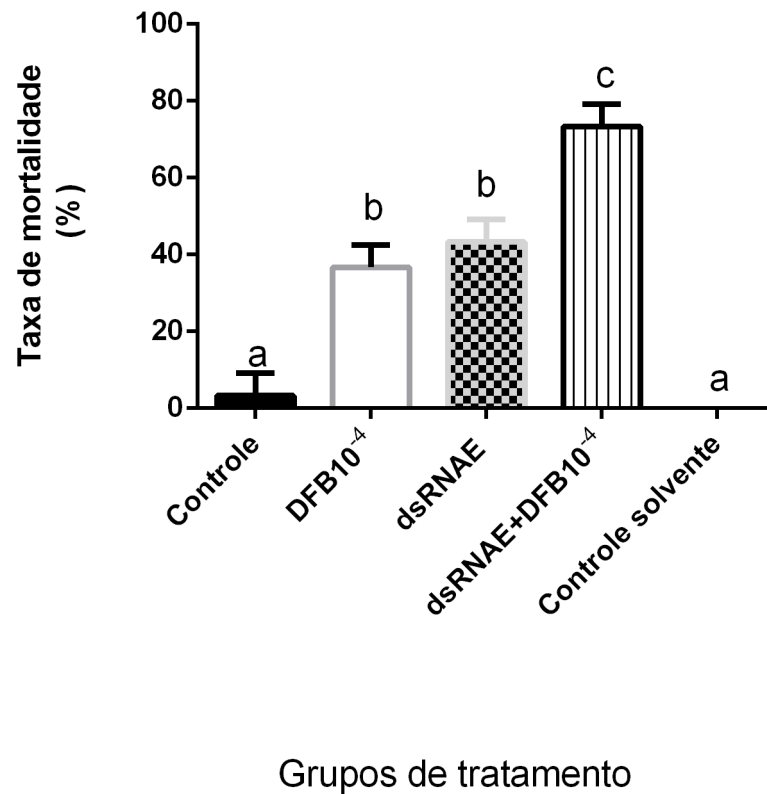


Figura 16. Efeito adjuvante de inseticida da bactéria produtora do dsRNAE, lisada, por choque térmico, com inseticida diflubenzuron (DFB). Taxa de mortalidade (%) no 6º dia após tratamentos. Controle: alimentado com ração; DFB10⁻⁴ mg/L: larvas de 3º estágio tratadas com DFB 10⁻⁴ mg/L dissolvida em acetona ; dsRNAE- larvas tratadas com a bactéria produtora de dsRNAE (2x10⁻² µg/mL); dsRNAE+DFB10⁻⁴ mg/L: larvas tratadas com 2x10⁻² µg/mL de bioinseticida no 1º estágio adicionada de DFB 10⁻⁴ mg/L no 3º estágio; Controle de solvente: larvas tratadas com solvente acetona. A taxa de mortalidade foi obtida com 3 réplicas de 15 larvas cada. A barra representa a média ± (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes significância estatística para p<0.05.

Desse modo, fica demonstrado que o bioinseticida pode ser utilizado como agente adjuvante em inseticidas podendo, assim, diminuir as doses necessárias para uso dos inseticidas usados tradicionalmente para controle, como apresentado neste trabalho.

3.6 Diminuição dos custos de produção do bioinseticida: estudo de métodos de inativação da bactéria e indutores da expressão de dsRNA

3.6.1 Inativação da *E. coli* recombinante com solução de clorexidina comercial

O passo seguinte foi testar uma forma mais barata e simples de inativação do bioinseticida, considerando que a necessidade de temperatura resulta em alto custo energético. Foi testada outra forma de inativação utilizando solução de clorexidina, comercializada sob a marca Asseptcare[®] e que pode ser adquirida nas drogarias por um preço em torno de 10 reais, 30 mL. Os resultados apresentados na figura 17 mostram que não houve crescimento tanto na suspensão bacteriana inativada com a solução com 0.5% e 1% de clorexidina, sendo então escolhida a menor concentração para a inativação da bactéria, como uma forma de custo inferior ao que representaria aquecer e esfriar volumes maiores de suspensão para inativar por choque térmico.

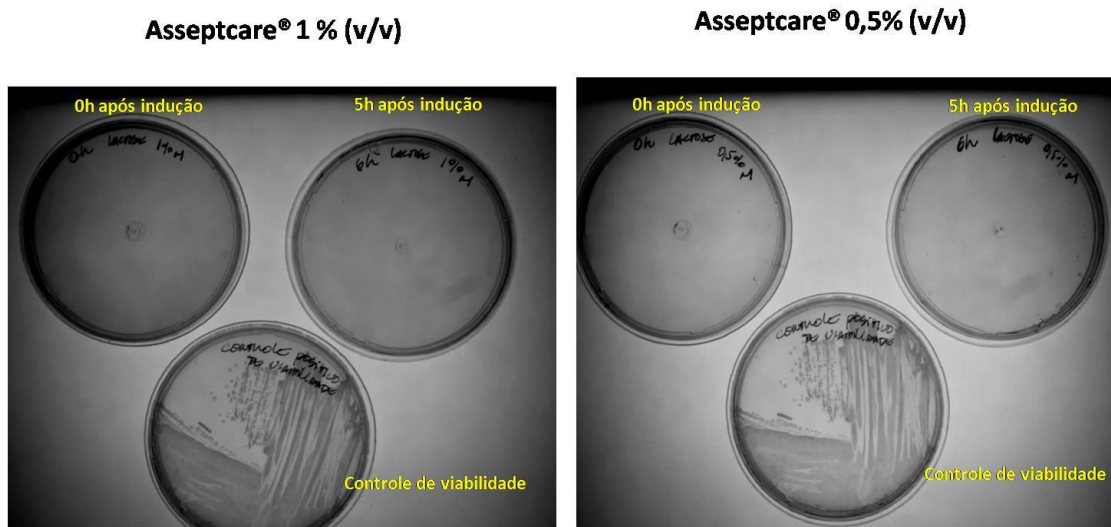


Figura 17. Inativação com clorexidina (Asseptcare[®]) na concentração 1% (v/v) à esquerda e 0.5% (v/v) à direita em solução aquosa mediante o cultivo em LB Ágar, a partir do crescimento obtido no início (0h) e no final (5h) do experimento de indução da expressão do dsRNAE.

Para comprovar se o processo de inativação com clorexidina 0.5%, adotado afetava a integridade da dupla fita de RNA a partir da biomassa induzida com IPTG 1mM, o dsRNAE foi extraído e purificado como descrito no Material e Métodos, através da observação do padrão eletroforético em gel de agarose 1%. A figura 18 demonstra que a dupla fita proveniente do tratamento com clorexidina é idêntica à proveniente do tratamento por choque térmico. Também, pode ser observado na figura 18, a intensidade das bandas correspondentes

ao dsRNAE proveniente da inativação por choque térmico é ligeiramente menor, quando comparada à intensidade das bandas do dsRNAE da inativação com solução de clorexidina, sugerindo uma maior quantidade de dsRNAE quando a inativação é feita usando o antisséptico comercial.

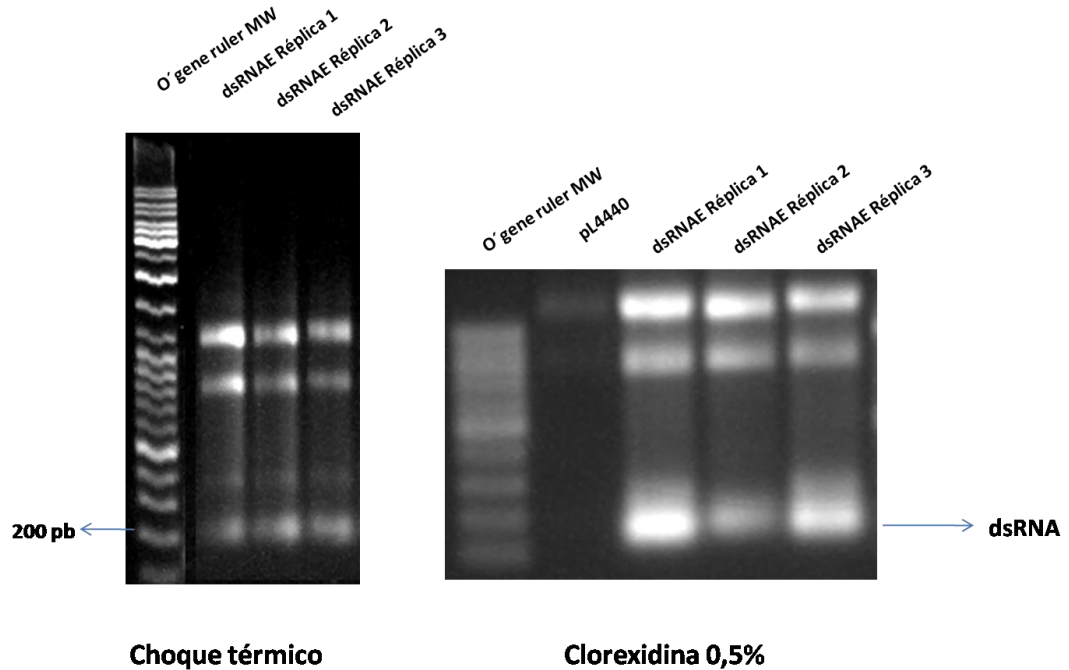


Figura 18. Integridade da dupla fita de RNA (dsRNAE) depois de inativação da bactéria por choque térmico (à esquerda) e utilizando solução de clorexidina 0.5%. A extração foi feita em triplicata utilizando o método de fenol ácido. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%.

3.7 Comparação da atividade larvicida do bioinseticida com dois indutores para a expressão de dsRNAE: IPTG 1mM e lactose 10 g/L

O próximo passo foi testar o crescimento e a expressão dos dsRNAE, por via recombinante, utilizando IPTG 1 mM e lactose 10 g/L como indutores da expressão. Foi verificado o aumento da concentração celular em função do tempo para tentar diminuir os custos de produção do bioinseticida. Na figura 19 está representado, o aumento da concentração celular da bactéria *E. coli* HT115, transformada com o L4440 que contém o inserto para a região alvo 2718_3 (dsRNAE), após indução com lactose ou IPTG. Como se observa na figura 19, o aumento da concentração celular, na indução com lactose foi menor no que diz respeito à indução com IPTG, mas por razões de custo foi escolhida a lactose como indutor para a produção do bioinseticida.

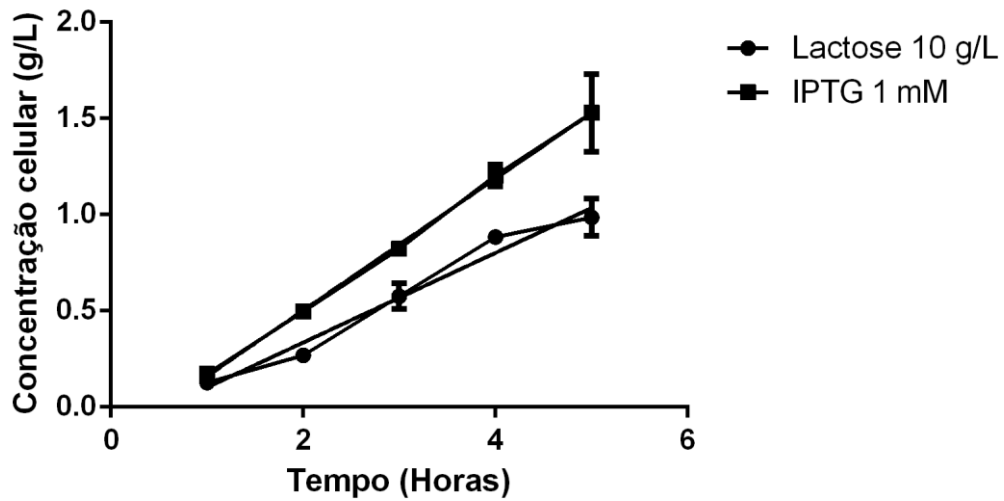


Figura 19. Curva de crescimento de *E. coli* HT115 (expressão de dsRNAE) após indução com lactose 10 g/L ou IPTG 1mM durante 5 h. A figura mostra a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Modelo de regressão linear. R^2 indução com lactose 10 g/L: 0,9565; R^2 indução com IPTG 1 mM: 0,9737.

Além do resultado anterior, na figura 20, pode ser observado que a banda correspondente ao dsRNAE, induzido com lactose 10 g/L, apresentou maior intensidade quando comparada à banda do dsRNAE, cuja expressão foi induzida com IPTG 1 mM (à direita na imagem). O método de purificação do dsRNA por fenol ácido apresentou uma reprodutibilidade experimental razoável, como mostrado pela imagem das bandas correspondentes às réplicas da purificação (à esquerda na imagem).

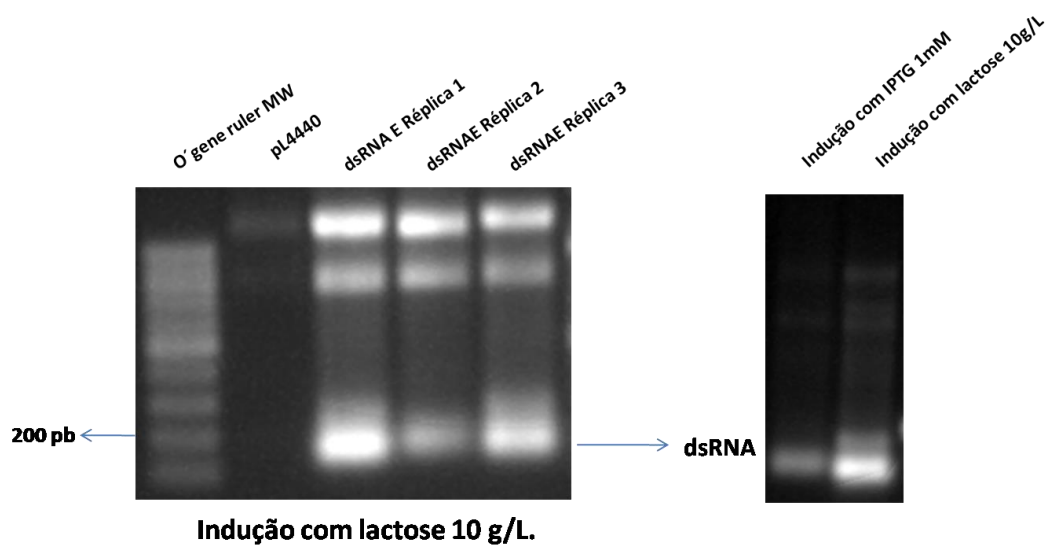


Figura 20. Comparação da expressão da dupla fita de RNA (dsRNAE) utilizando lactose 10 g/L e IPTG 1 mM. A extração do dsRNAE foi feita em triplicata experimental, utilizando o método de fenol ácido. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%.

Após a verificação da integridade, o número de cópias de dsRNAE, com ambos os indutores da expressão, IPTG e lactose, foi estimada, a partir da mesma quantidade de biomassa, como descrito em Material e Métodos. A indução por lactose 10 g/L produziu aproximadamente 16.4×10^{12} cópias/ μL , quase três vezes superior ao número de cópias obtido ao induzir com IPTG 1 mM, cuja estimativa esteve em torno de 5.8×10^{12} cópias/ μL , apesar do crescimento celular ser menor com o indutor lactose quando comparado com IPTG (Figura 19), o nº de cópias de dsRNAE produzido é maior.

A atividade larvicida do bioinseticida inativado com clorexidina 0.5%, e induzido com IPTG 1 mM e lactose 10 g/L, foi avaliada em três grupos com 15 larvas L1 cada. A figura 21 mostra que a taxa de mortalidade foi 96%, na indução com lactose, e 86% para os grupos induzidos com IPTG 1 mM, 24 horas após os tratamentos. Após 48h de indução do tratamento a mortalidade em ambos os tipos de tratamento não apresentou diferenças significativas. Os grupos controle, controle de clorexidina e tratado com a bactéria contendo o vetor de expressão L4440 sem inserto não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

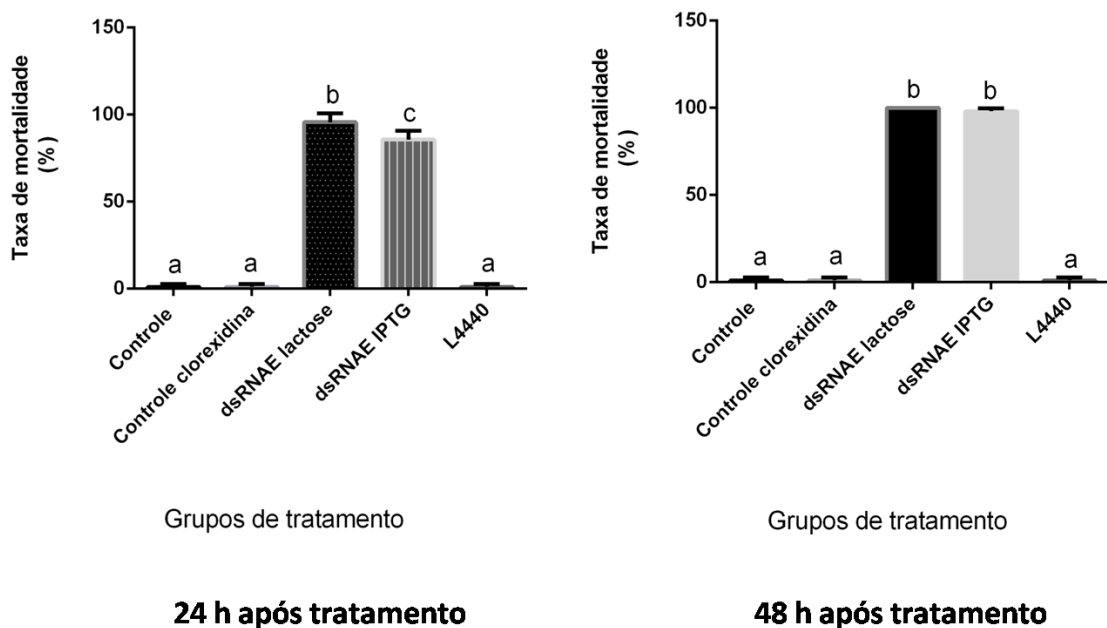


Figura 21. Taxa de mortalidade (%) de larvas L1, 24 e 48h após tratamento com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativado com solução de clorexidina 0,5% e cuja expressão foi induzida com lactose 10 g/L ou IPTG 1 mM. Controle: larvas sem adição de bactérias; L4440: larvas adicionadas *E. coli* HT115 transformada com L4440 sem inserto; Controle clorexidina: larvas adicionadas somente com solução de clorexidina 0.5%; dsRNAE lactose: larvas adicionadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE cuja indução foi feita com lactose 10 g/L, dsRNAE IPTG: larvas adicionadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE cuja expressão foi induzida com IPTG 1 mM. A taxa de mortalidade foi obtida com 3 réplicas de 15 larvas cada. A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes indicam significância estatística para $p < 0.05$.

3.8 Comprovação da capacidade de indução do fenótipo de silenciamento do bioinseticida em estágios avançados do desenvolvimento do inseto

Em seguida foi investigado se o bioinseticida é capaz de induzir mortalidade em larvas de estágio avançado do desenvolvimento, como por exemplo, em larvas de 4º estágio. Na figura 22, observa-se que o lisado bacteriano contendo o dsRNAE, cuja indução foi feita com lactose 10 g/L e inativado com clorexidina 0.5% foi capaz de induzir uma mortalidade em torno de 70% após 24h da aplicação do dsRNAE e de aproximadamente 87% após 72 horas do início do tratamento. Os grupos controles não apresentaram diferenças entre si.

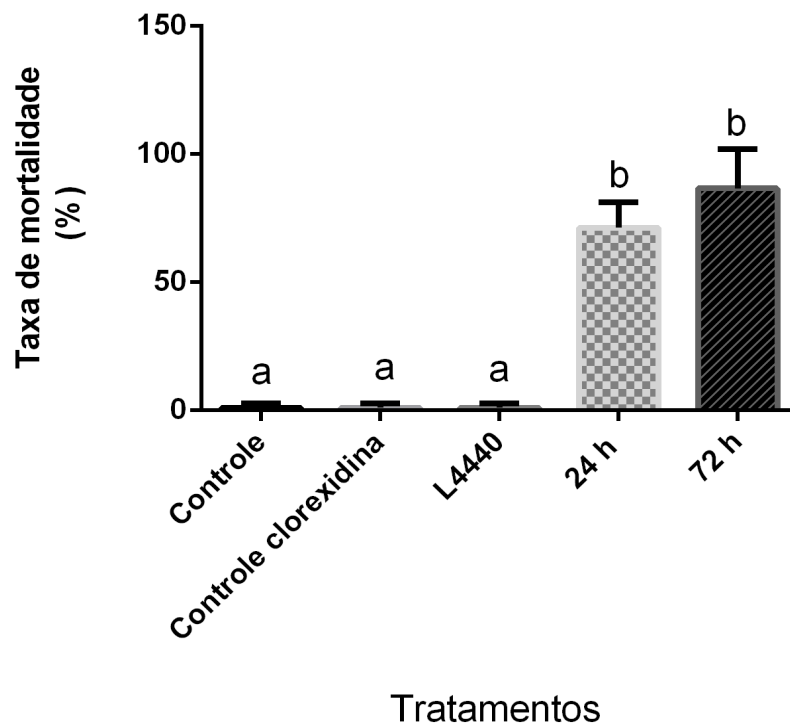


Figura 22. Taxa de mortalidade (%) de larvas de 4º estágio, 24 e 72h após tratamento com lisado bacteriano contendo dsRNAE, inativado com solução de clorexidina e cuja expressão foi induzida com lactose 10 g/L. Controle (larvas sem adição de bactérias; larvas adicionadas com bactérias transformadas com o vetor L4440 sem inserto); Controle clorexidina (larvas adicionadas somente com solução de clorexidina 0.5%); 24h (taxa de mortalidade, após 24 horas do início do tratamento, das larvas adicionadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE); 48h (taxa de mortalidade, após 48 horas do início do tratamento, das larvas adicionadas com lisado bacteriano contendo dsRNAE). A taxa de mortalidade foi obtida com triplicatas de 15 larvas cada. A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes indicam significância estatística para $p < 0,05$.

Este resultado mostrou que o bioinseticida apresenta atividade larvicida mesmo em estágios avançados do desenvolvimento larvar.

A seguir, a quantificação da diminuição da expressão dos transcritos dos genes *CHSA* e *B* corroboraram a relação entre a mortalidade e o silenciamento gênico. A figura 23 apresenta o resultado da quantificação da expressão relativa dos genes *CHSA* e *B*, os quais sofreram diminuição significativa quando comparados aos grupos controles (controle e L4440), sendo esta diminuição da expressão em torno de 40 e 49%, respectivamente. Mesmo o dsRNAE tendo sido alvo de para silenciar a região central da *CHSA*, tanto na prova de conceito (Figura 9 e 10) quanto na expressão *in vivo*, o dsRNAE foi capaz silenciar os dois genes de *CHS*, provavelmente em função da homologia das sequências de siRNA após o processamento da Dicer.

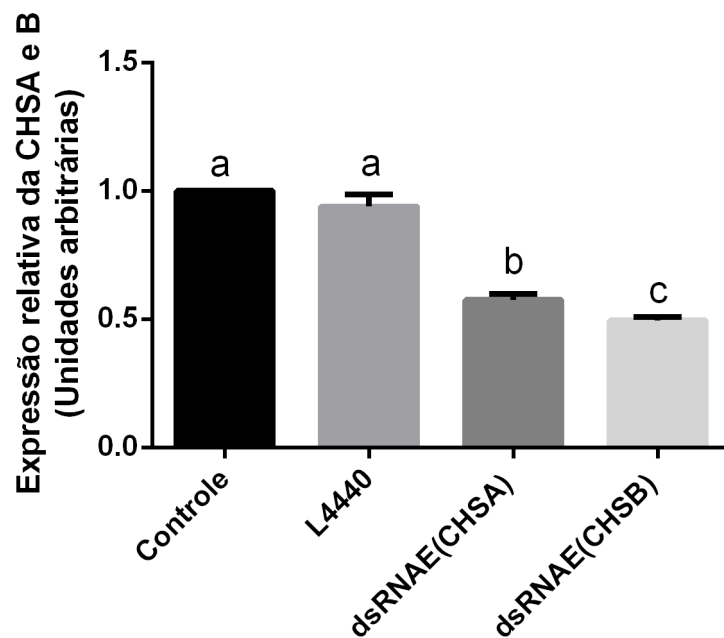


Figura 23. Expressão relativa dos genes *CHSA* e *B* em larvas de 4º estágio silenciadas com o dsRNAE produzido por via recombinante, presente no lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina, comparado com os controles da experiência: controle (alimentado só com ração) e L4440 (vetor vazio). A expressão relativa foi obtida com 3 réplicas de 3 larvas cada. A expressão das larvas controle (alimentado só com ração) foi considerada como nível basal (ou 1). O gene *RPS6* foi usado como controle endógeno para normalizar o nível de expressão. A barra representa a média \pm (desvio padrão) da expressão gênica relativa de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

Neste experimento, também foi verificado se o silenciamento gênico induzido com o bioinseticida no 4º estágio larvar atrasava os processos de pupação e ecdise. A figura 24 apresenta a taxa de pupação das larvas provenientes do tratamento com o bioinseticida em larvas 4º estágio, que foi significativamente menor (75%), quando comparado aos controles (controle e L4440), deste experimento.

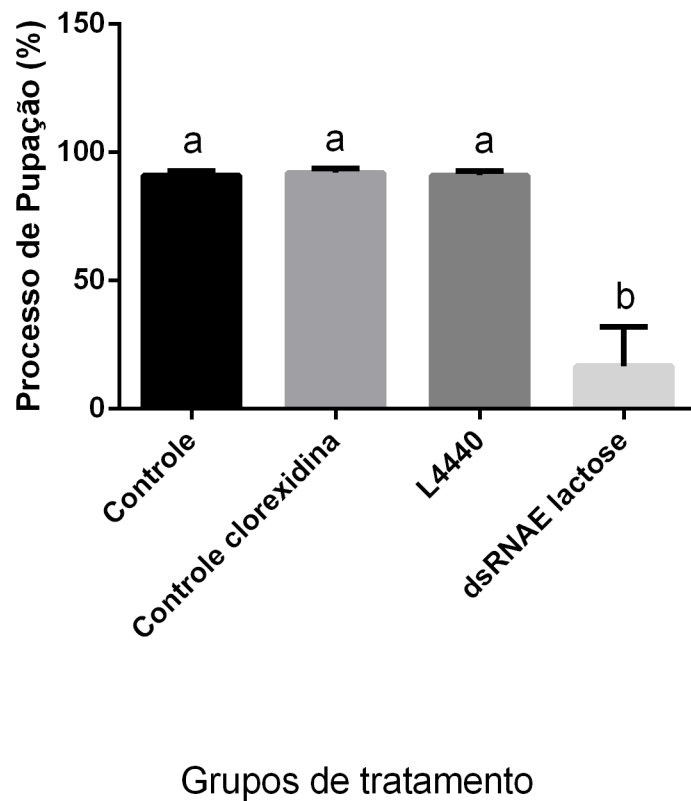


Figura 24. Taxa de pupação (%) após as larvas serem tratadas no 4° estágio do desenvolvimento, com dsRNAE presente no lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina, comparado com os controles da experiência: controle (alimentado só com ração), controle com L4440 (vetor vazio) e controle clorexidina (larvas adicionadas somente com a solução de clorexidina 0.5%); dsRNAE lactose (lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina, contendo dsRNAE, cuja expressão foi induzida com lactose 10 g/L). A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

Para verificar se o efeito do silenciamento gênico induzido com o bioinseticida no 4° estágio de larva se mantinha até a fase adulta, o desenvolvimento foi acompanhado até o último estágio do ciclo de vida do inseto. Assim foi constatado que somente uma das larvas tratadas (3%) atingiu a fase adulta (figura 25). Os grupos controle, tratado com lisado bacteriano contendo o plasmídeo L4440 vazio e controle com clorexidina se desenvolveram normalmente.

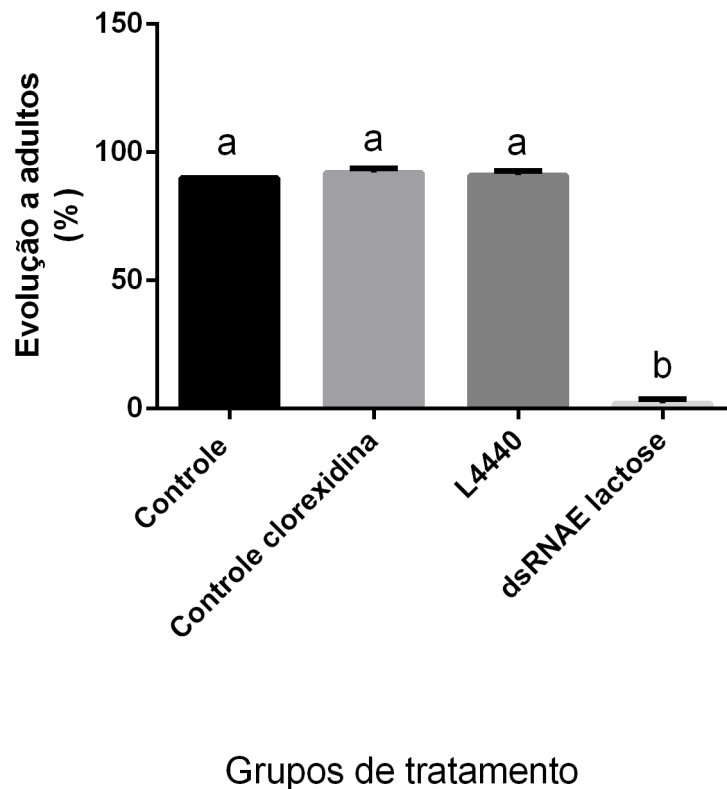


Figura 25. Taxa de larvas que evoluíram ao estágio adulto (%) após serem tratadas no 4º estágio do desenvolvimento, com dsRNAE presente no lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina, comparado com os controles da experiência: controle, (alimentado só com ração), controle com L4440 (vetor vazio) e controle clorexidina (larvas adicionadas somente com a solução de clorexidina 0.5%); dsRNAE lactose (lisado bacteriano, inativado com solução de clorexidina, contendo dsRNAE, cuja expressão foi induzida com lactose 10 g/L). A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

3.9 Efeito da concentração do bioinseticida no silenciamento gênico das CHSA e B

Para comprovar o efeito da concentração de bioinseticida empregada para induzir o silenciamento gênico das CHSA e B foi verificada a atividade larvicida utilizando três diferentes concentrações do bioinseticida: 2×10^{-2} , 2×10^{-3} ou 2×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. A Figura 26 retrata a taxa de mortalidade em cada grupo de tratamento. Observa-se que os grupos tratados com o bioinseticida em quaisquer das três concentrações utilizadas provocou uma taxa de mortalidade significativa em comparação aos grupos controle e tratado com lisado contendo o vetor L4440 vazio, mostrando que as três concentrações empregadas são efetivas para induzir a mortalidade das larvas. Entre as concentrações de tratamento administradas também houve diferenças significativas na taxa de mortalidade. O grupo tratado com a maior concentração do bioinseticida (2×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$) apresentou a maior taxa de mortalidade, em torno de 40% após 24 horas de tratamento. Nos grupos tratados com as concentrações 2×10^{-3} ou 2×10^{-4}

$\mu\text{g/mL}$ de bioinseticida, a mortalidade esteve em torno de 35 e 20%, respectivamente, após o mesmo período de tratamento. Estes resultados sugerem que a taxa de mortalidade está diretamente relacionada à concentração do bioinseticida.

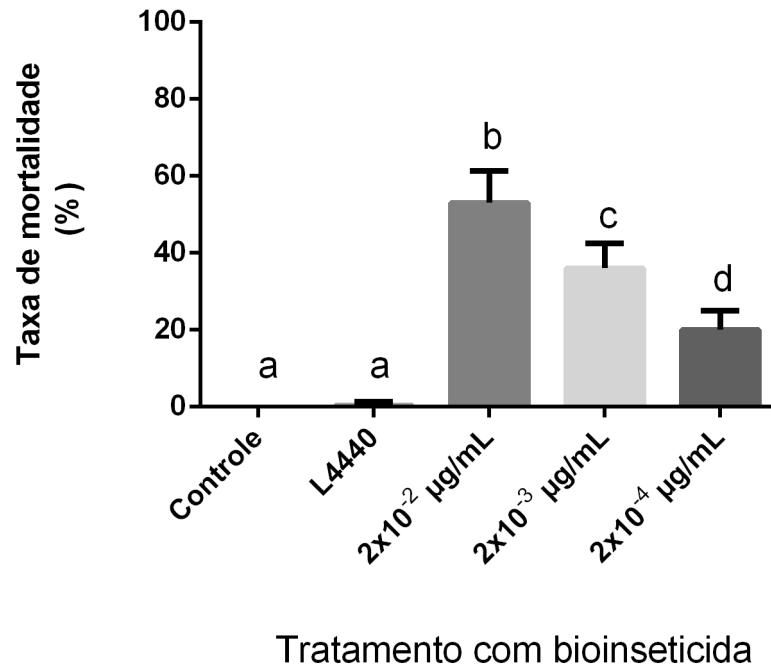


Figura 26. Taxa de mortalidade de larvas de 1º estágio tratadas com bioinseticida inativado com solução de clorexidina, 24 horas após os tratamentos. Foi comparado com os controles da experiência: controle (alimentado só com ração); L4440 (controle com L4440, sem inserto); $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$); $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$); $2 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ (larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração $2 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$). A barra representa a média \pm (desvio padrão) de cinco experimentos independentes, com grupos de 20 larvas cada. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

A mortalidade, com as concentrações de bioinseticida utilizada no tratamento, esteve relacionada com a diminuição da expressão dos *CHSA* e *B* como mostrado através dos resultados da análise da expressão gênica por qPCR (Figura 27). Os grupos silenciados com o bioinseticida nas concentrações de 2×10^{-2} e $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ tiveram uma diminuição da expressão do transcrito de *CHSA* em torno de 40%, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre as duas doses, mas sendo diferente dos grupos controles. No grupo tratado com $2 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ a redução do transcrito de *CHSA* esteve em torno de 35%.

Ao respeito da expressão do gene da *CHSB*, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na redução da expressão do transcrito entre os grupos tratados

com concentração de 2×10^{-2} , 2×10^{-3} e 2×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ do bioinseticida, sendo esta diminuição da expressão em torno de 50, 40 e 35% respectivamente, em relação aos grupos controles. Este resultado mostrou a eficácia do bioinseticida para induzir o fenótipo de silenciamento, associado à diminuição da expressão gênica das *CHSA* e *B* utilizando duas concentrações mais baixas com respeito à que fora usada ao longo deste trabalho.

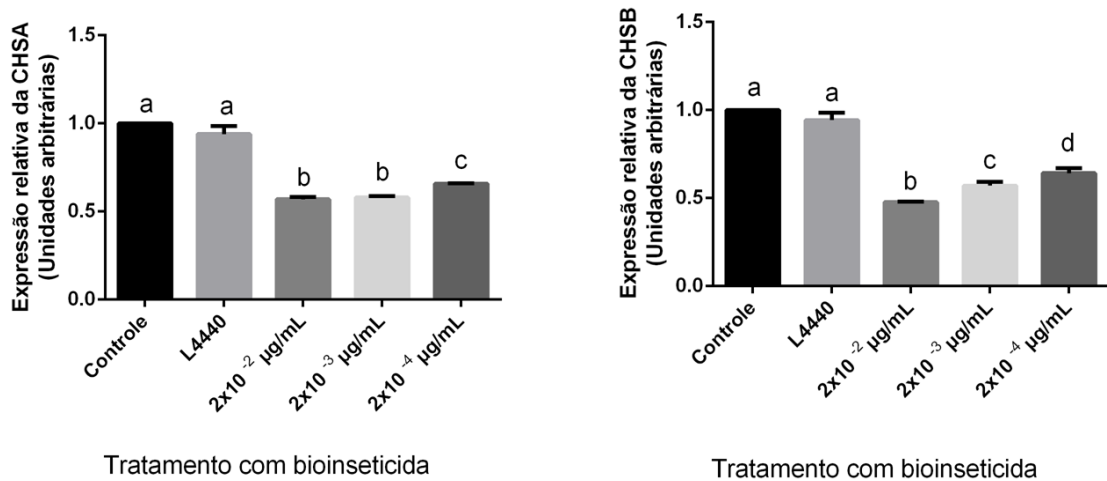


Figura 27. Expressão relativa dos genes *CHSA* (à esquerda) e *B* (à direita) em larvas de 1º estágio silenciado com o bioinseticida. Foi comparado com os controles da experiência: controle (alimentado só com ração); L4440 (grupo administrado com a bactéria contendo o L4440 sem inserto); 2×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$: larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração 2×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$; 2×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$: larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração 2×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$. dsRNAE (2×10^{-4}): larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração 2×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. A expressão relativa foi obtida com 3 réplicas de 3 larvas cada. A barra representa a média \pm (desvio padrão) de três experimentos independentes. A análise estatística entre os grupos foi feita utilizando a ANOVA e posteriormente o teste de Tukey. Letras diferentes têm significância estatística para $p < 0.05$.

3.10 Observação da alteração da morfologia das larvas após tratamento com bioinseticida

Na Figura 28 observa-se que após 72 horas de tratamento com o bioinseticida, a morfologia externa das larvas (L1) foi alterada. As larvas tratadas mostraram diferenças morfológicas: diminuição das cerdas quitinosas localizadas nos segmentos abdominais e no tórax, cutícula mais transparente e fina, apresentando falhas, buracos, quando comparadas às larvas controles. No intestino foram observadas falhas ao longo do mesmo, estreitamento na região da cabeça-tórax e a presença de malformações nos segmentos abdominais, como pode se observar na figura 28, sinalizado com setas vermelhas. Estas alterações nas estruturas das larvas tratadas com o bioinseticida são consequências da diminuição da expressão dos genes *CHSA* e *B*, produto do silenciamento por RNAi.

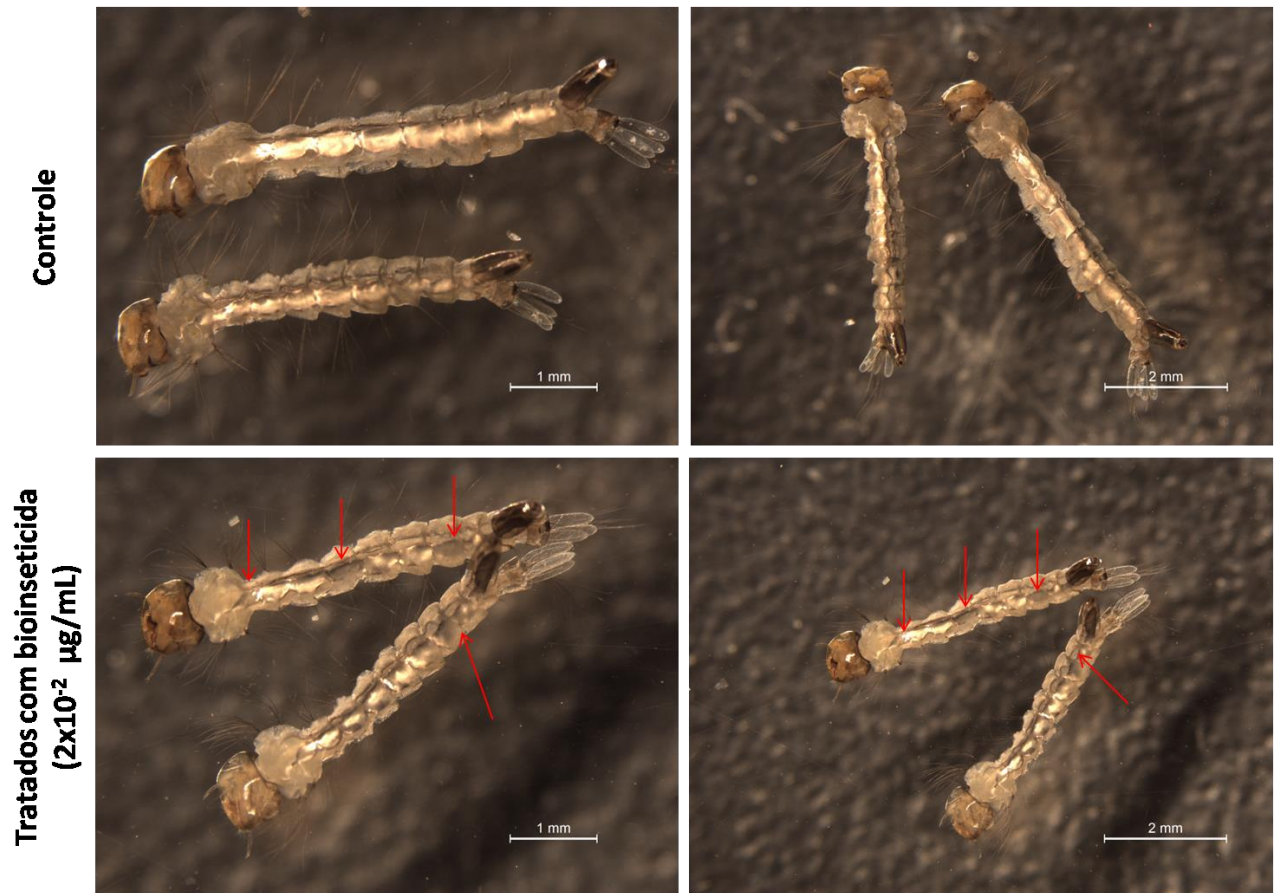


Figura 28. Fenótipo de silenciamento das larvas tratadas com o bioinseticida 72h após o tratamento. Controle (alimentado só com ração); bioinseticida $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$: larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$; A observação foi realizada utilizando microscópio estereoscópio e as alterações observadas nas larvas tratadas estão sinalizadas com setas vermelhas. Resultado representativo do fenótipo das larvas. Barra = 1mm (à direita) e 2 mm (à esquerda).

3.11 Diminuição do conteúdo de quitina, relacionada com o silenciamento das CHSA e B, utilizando sonda fluorescente de ligação específica à quitina (FITC-WGA)

Como evidência do silenciamento gênico, também foi verificada a redução do conteúdo de quitina nas larvas de 4º estágio tratadas, por 72 h, com o bioinseticida com três diferentes concentrações. Após o tratamento, as larvas foram incubadas com a sonda FITC-WGA que detecta quitina. A figura 29 evidencia que houve redução do conteúdo de quitina, tanto na cutícula, como no intestino da larva, a diminuição do sinal de fluorescência foi progressiva com o aumento da dose do bioinseticida, sendo mais notável a redução de fluorescência na maior concentração do bioinseticida. Na larva controle, o sinal de fluorescência foi intenso, tanto no intestino como na cutícula, devido à presença de altos níveis de quitina. Além disso, pode se observar diferenças nas estruturas das larvas tratadas

com o bioinseticida: o tubo digestivo vai ficando, aparentemente, cada vez mais fino com o aumento da dose do bioinseticida, sendo que na dose mais alta ($2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) o tubo digestivo não foi mais visível. A redução do sinal de fluorescência nas cutículas das larvas também foi observada com o aumento da dose. As cerdas quitinosas laterais, presentes no tórax e abdômen da larva controle, foram também reduzidas em número e tamanho nas larvas tratadas com o bioinseticida. O conteúdo de quitina das palhetas natatórias, estrutura caudal, foi bastante alterado nas larvas tratadas quando comparado ao conteúdo na larva controle. Na concentração de $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$, a palheta natatória parece estar ausente quando comparada ao controle. A morfologia da cabeça da larva também foi alterada no tratamento com o bioinseticida. Na concentração do bioinseticida de $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ foi observada forte alteração na morfologia do tórax da larva. Esses resultados sugerem que bioinseticida foi capaz de provocar alterações nas larvas, mesmo as larvas tendo sido tratadas em idade madura.

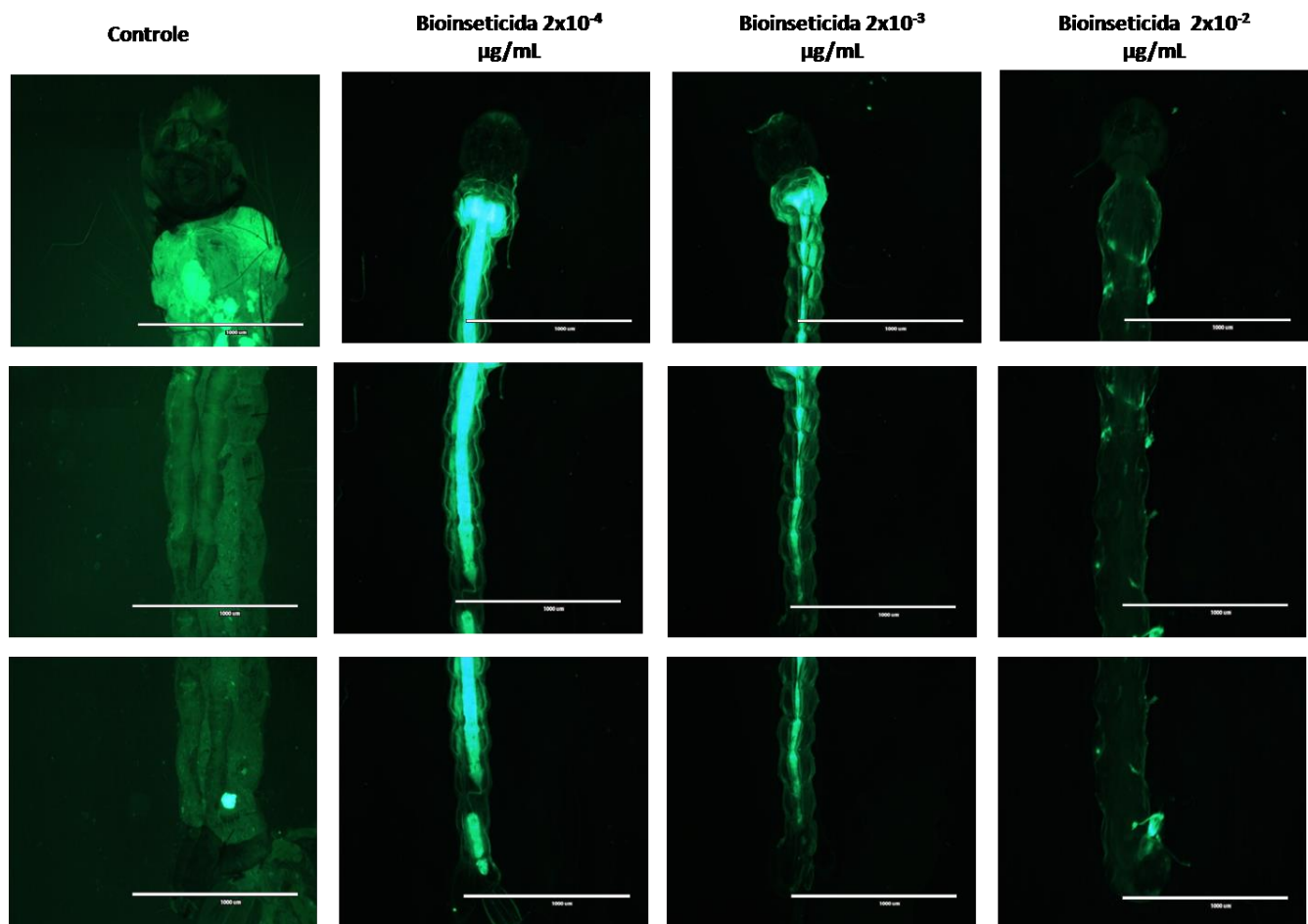


Figura 29. Fenótipo de silenciamento das larvas tratadas como bioinseticida no 4º estágio. Larva controle, (alimentado só com ração); bioinseticida: larvas adicionadas com o bioinseticida nas concentrações 2×10^{-2} , $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ e $2 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$. A observação da redução do conteúdo de quitina pela diminuição do sinal de fluorescência usando a sonda FITC-WGA. Resultado representativo do fenótipo das larvas tratadas com o bioinseticida. Barra= 1000 μm .

3.12 Diminuição do transcrito de CHSB relacionada ao silenciamento gênico, utilizando a técnica de fluorescência por hibridação *in situ* (FISH)

Como evidência da relação do tratamento do bioinseticida, isto é, o dsRNAE contido na suspensão bacteriana foi evidenciado, *in situ*, na larva, pela hibridação com sonda fluorescente. A relação entre a redução do transcrito alvo, após a indução do silenciamento com dsRNAE foi comprovada utilizando a técnica de hibridação e fluorescência *in situ*, realizando a síntese *in vitro* do dsRNAE marcado com uma sonda fluorescente. O sinal de fluorescência é observado em locais de expressão da molécula alvo do dsRNA, o transcrito. Foram escolhidos indivíduos de 4º estágio de larva por serem mais resistentes aos tratamentos de pré-hibridação com solventes orgânicos, como requisitado nas instruções do protocolo de uso da sonda. Previamente, antes de realizar o passo de pré-hibridação foi realizado um passo de branqueamento ou *bleaching* com o objetivo de modificar a cutícula e facilitar a entrada da sonda no interior dos tecidos e minimizar a autofluorescência que a larva emite naturalmente, fato que mascararia o resultado, tal como se observa no controle de autofluorescência (sem *bleaching*). Também como controle deste experimento foi realizada a hibridação utilizando um dsRNA não relacionado, cujo alvo é o receptor olfatório 80, de *Rhodnius prolixus* (sonda dsRNAOR80). Na Figura 30, pode se observar que no uso do dsRNAOR80 não houve emissão de fluorescência, como esperado, pois não tem expressão do transcrito OR80, no intestino ou na cutícula da larva. Na imagem da larva sem tratamento prévio com o bioinseticida (não tratada; sonda dsRNAE) pode se observar sinal de emissão de fluorescência, no lúmen do intestino da larva, sinalizado com setas vermelhas. O sinal de fluorescência foi mais intenso e numeroso nas larvas que não foram previamente tratadas com o bioinseticida, indicando a presença de transcritos de CHSB, quando comparado com a larva previamente tratada com o bioinseticida, antes da hibridação, onde o sinal de fluorescência foi menor (tratada com bioinseticida: $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$; sonda dsRNAE). Esta diminuição do sinal está diretamente relacionada ao silenciamento, induzido pelo dsRNAE antes da hibridação, pela qual os transcritos alvos do dsRNAE tinham diminuído com respeito ao controle, como mostrado pela quantificação relativa da expressão dos genes de ambas as CHSs (Figura 27). Não foi observado sinal de fluorescência na cutícula das larvas, provavelmente em função da ação dos solventes utilizados no tratamento de pré-hibridação, para favorecer a permeabilidade do espécime ao tratamento de hibridação. Além disso, pode ser observado que a larva previamente tratada com o bioinseticida apresenta um intestino mais fino e menos

cerdas quitinosas ao longo do corpo corroborando os resultados de que ocorreu silenciamento dos genes de CHSA e B.

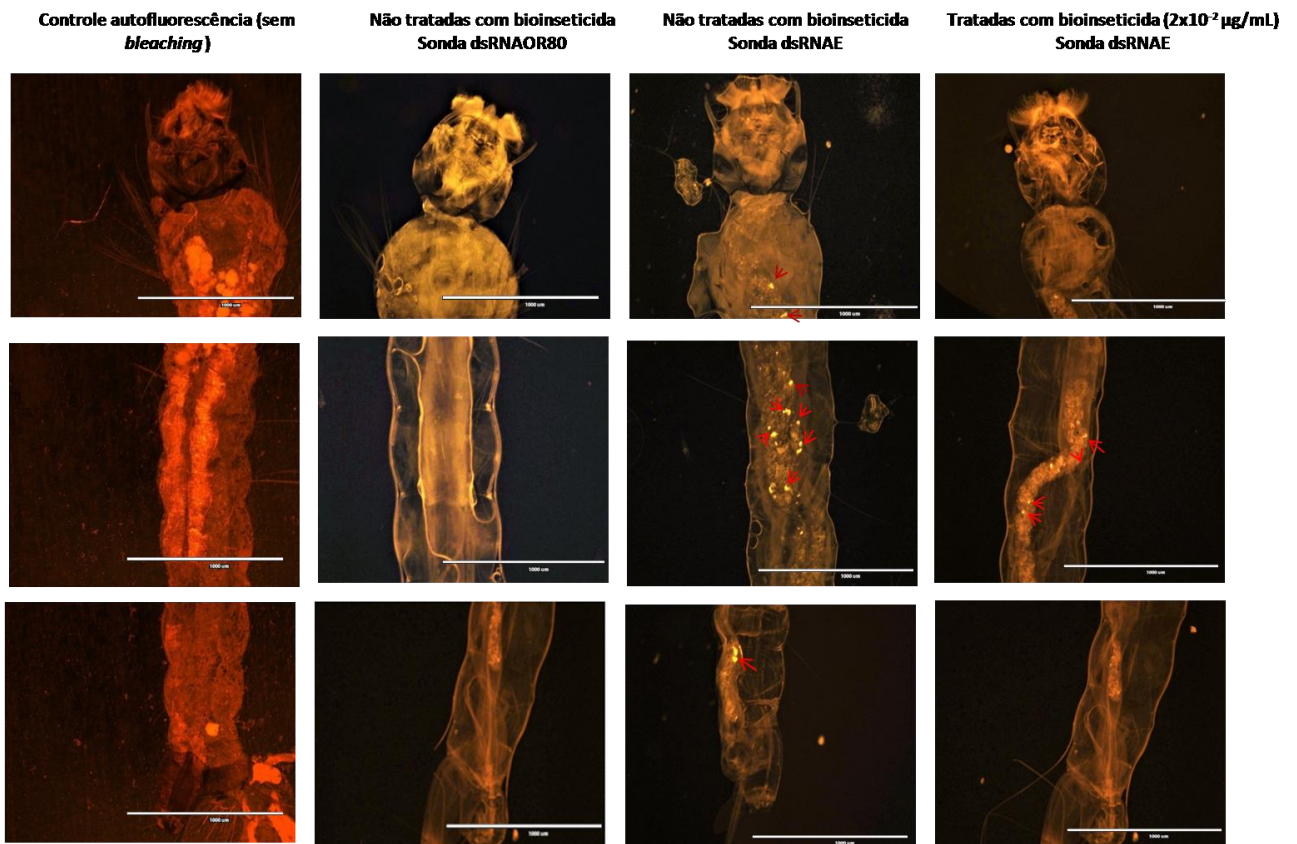


Figura 30. Hibridação do dsRNAE marcado com sonda fluorescente e hibridação *in situ* (FISH). Da esquerda à direita: Controle de autofluorescência (sem *bleaching*); Não tratadas com bioinseticida sonda dsRNAOR80 (larvas não tratadas com o bioinseticida, hibridação com dsRNA que tem como alvo o receptor olfatório OR80 de *Rhonius prolixus*); Não tratadas com bioinseticida sonda dsRNAE (larvas não tratadas com o bioinseticida, hibridação com o dsRNAE); Tratadas com bioinseticida $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$, sonda dsRNAE (larvas adicionadas com o bioinseticida na concentração $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$, hibridação com a sonda dsRNAE). As setas vermelhas sinalizam a presença de sinal de fluorescência. Barra= 1000 μm .

Este resultado corrobora, mais uma vez, que o dsRNAE produzido como bioinseticida, presente no lisado bacteriano, é responsável pelo fenótipo de silenciamento induzido por RNAi, como observado ao longo deste trabalho.

3.13 Comprovação da estabilidade do bioinseticida em condições ambientais. Prova de estocagem

Para verificar a resistência da dupla fita contida no bioinseticida às condições ambientais, uma suspensão de bioinseticida ($2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) foi preparada em 1 litro de água da torneira e permaneceu na bancada à temperatura ambiente. Depois de dois meses, 1 mL da

suspensão foi centrifugada e a dupla fita foi precipitada pelo método de fenol ácido, como descrito em Material e Métodos para comprovar se o dsRNA era ainda detectado. Como se observa na Figura 31, a banda correspondente ao dsRNA, isolado da suspensão estocada por dois meses foi um pouco menos intensa do que a dupla fita isolada, logo após sua produção, sugerindo que o dsRNA se manteve estável durante dois meses em água da torneira a temperatura ambiente.

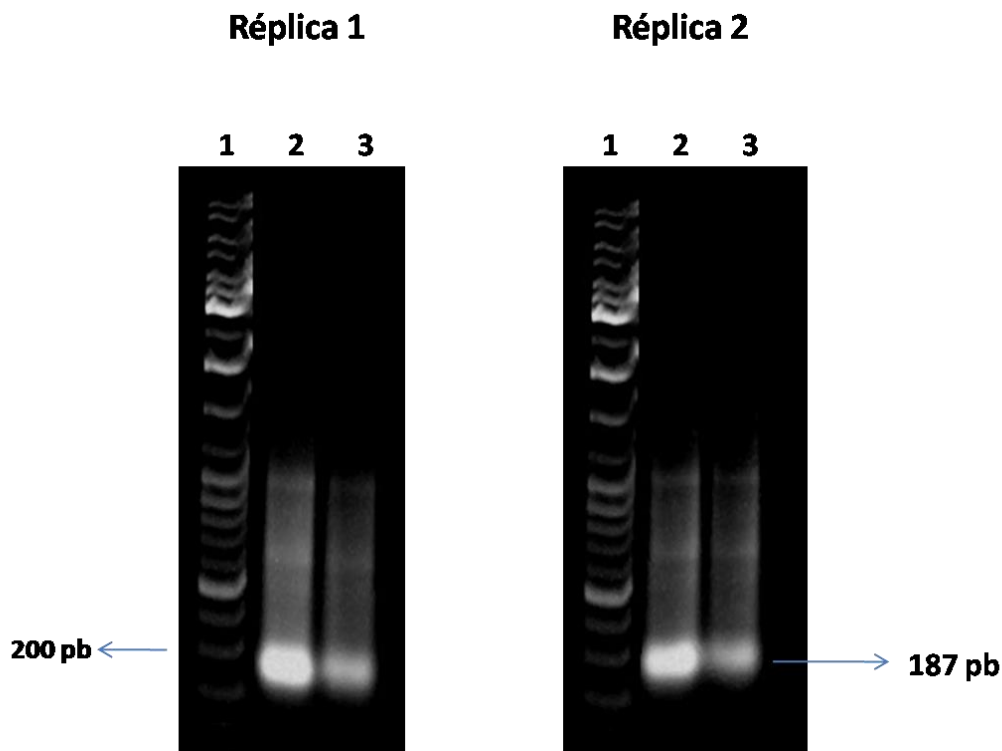


Figura 31. Integridade da dupla fita de RNA (dsRNA2718_3) depois de dois meses de estocagem a temperatura ambiente. A extração foi feita em duplicata utilizando o método de fenol ácido. Lane 1: padrão de peso molecular O'Gene ruler; Lane 2: dsRNA2718_3 (dsRNAE) extraído logo após a produção do bioinseticida; Lane 3: dsRNA2718_3 extraído após dois meses de estocagem a temperatura ambiente. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%.

4. DISCUSSÃO

A biotecnologia, atualmente, está causando grandes impactos em diversos setores da economia e na sociedade por meio de técnicas inovadoras. Pode-se destacar a revolução no tratamento de doenças, seja baseada na terapia gênica, bem como na evolução de testes diagnósticos (FRANZ et al, 2014). Desde sua descoberta, o RNAi vem sendo utilizado em diversas aplicações. Na área da saúde humana, como alternativa terapêutica, pode-se citar os estudos do potencial terapêutico do mecanismo de RNAi no tratamento do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1), em modelo murino humanizado, combinado com técnica de *knockout* de genes (SWAMY e WU, 2016). Técnicas de biologia molecular, baseadas em RNAi, também tem sido usado para o estudo e identificação de marcadores de progressão de leucemia (PIZZATTI et al, 2010). Especificamente, em estudos de vetores, o mecanismo de RNAi tem sido utilizado para identificar genes relacionados à resistência a inseticidas e susceptibilidade à infecção por parasitos em mosquitos (MITRI et al, 2015)

Numerosos estudos apontam que o RNAi é uma ferramenta poderosa para controlar populações de insetos e que pode ser uma alternativa muito interessante mediante ao quadro de desenvolvimento de resistência, produto da pressão seletiva exercida pelos inseticidas químicos (AIRS e BARTHOLOMAY, 2017). O silenciamento gênico por RNAi no inseto, ocorre em apenas 18-72 h após a introdução do dsRNA e utiliza a própria maquinaria celular do organismo.

O silenciamento por RNAi é específico. A escolha de regiões gênicas conservadas pode permitir o silenciamento de famílias gênicas em uma espécie determinada (parálogos) ou ainda de um mesmo gene presente em diferentes organismos (ortólogos). Por outro lado, a escolha de regiões gênicas com diferente grau de conservação de sequência permite o silenciamento de mais de uma variante gênica, dentro de uma família, ou mesmo, ser capaz de silenciar um único gene em organismos pertencentes a uma subespécie ou ainda a subpopulações de uma mesma espécie, tornando seu efeito passível de modificação. Outra vantagem consiste em que o silenciamento pode ocorrer em diferentes partes de um mesmo gene, isto dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos mosquitos a um determinado dsRNA. O processo de RNAi, também, apresenta fatores que podem determinar um maior ou menor grau de silenciamento, tornando modulável sua aplicação. Além disso, tem sido demonstrado que o silenciamento gênico pela técnica de RNAi em insetos apresenta efeito prolongado (SOUZA-FERREIRA et al, 2014).

Na literatura, Huvenne e Smagghe (2010) sugerem cinco fatores que influenciam de forma importante o efeito do silenciamento e, portanto, o RNAi como método de controle: 1- escolha adequada de uma sequência nucleotídica para o silenciamento; 2- tamanho do fragmento de dsRNA, que é crucial para uma adequada internalização no organismo do alvo de controle; 3- persistência do efeito de silenciamento que deve ser prolongada até a fase adulta do inseto; 4- estágio do organismo alvo no momento da aplicação, pois foi demonstrado que a eficácia do silenciamento é diferente em cada momento do ciclo de vida, devido à expressão diferencial de genes associados a diferentes etapas do desenvolvimento do inseto e 5- concentração do dsRNA, diferente para cada gene e organismo.

O presente trabalho destina-se ao controle do mosquito vetor visando sua aplicação na redução da incidência de doenças graves na população humana, como as febres: dengue, chikungunya, amarela e Zika e outras arboviroses transmitidas pelo mosquito *Ae. Aegypti*. O produto deste trabalho pode substituir os inseticidas químicos usados para controle de insetos vetores ou pode agir como agente adjuvante destes inseticidas, diminuindo a dose necessária dos mesmos a serem empregados para controle. Podendo assim, minimizar também, o impacto ambiental, provocado pela acumulação de organofosforados e outros inseticidas químicos usados no controle de populações. A associação de inseticida e RNAi também foi destacada por Aird e Bartholomay (2017), esses autores propuseram também que dependendo da escolha do alvo de silenciamento, o RNAi permite a intervenção em várias fases do ciclo de vida do inseto e oferece a possibilidade de desenvolver estratégias integradas.

Devido à importância da quitina no ciclo de vida e desenvolvimento do mosquito, quaisquer dos genes que codificam para as enzimas da via de biossíntese da quitina, tornam-se bons alvos para o desenvolvimento de técnicas de controle baseadas no silenciamento gênico usando RNAi. O silenciamento gênico induzido pela molécula de dsRNA é específico para sequência alvo. As técnicas baseadas no mecanismo RNAi tem sido amplamente utilizadas para determinar funções gênicas em vertebrados (RYTLEWSKI e BERONJA, 2015). Na área biotecnológica, estas técnicas apresentam um grande potencial para controle de pragas, devido à alta especificidade do processo de silenciamento gênico (PRICE e GATEHOUSE, 2008)

Neste trabalho foram escolhidas as enzimas chaves na via de biossíntese da quitina, a enzima CHS (MENZERDORFER e ZIMMICH, 2003). Utilizando as ferramentas de bioinformática, foram observadas as hélices de transmembranas, preditas para as CHSs como descrito por TELLAM et al, 2000 (Figura 6A e B) e também foram observadas as assinaturas moleculares descritas para estas enzimas e que segundo alguns autores são essenciais para a

catálise, envolvidos na protonação do substrato (Figura 7) (IBRAHIM et al, 2000; BRETON e MUCHA, 2001). Como descrito na literatura, por TELLAM et al, 2000, as CHSs de insetos apresentam muita similaridade, desde o ponto de vista catalítico, com as CHSs presentes em leveduras e fungos. Desta forma, foi corroborada a identificação das sequências escolhidas como CHSs.

Para que a experiência de RNAi seja bem sucedida é necessário selecionar cuidadosamente o método de administração do dsRNA no organismo alvo, o tamanho da dupla fita que irá induzir o mecanismo e a adequada escolha do gene alvo (KANAKALA e GHANIM, 2016). No nosso trabalho, a escolha das regiões alvo do silenciamento (Figura 9) foi baseada na homologia entre as duas CHSs e o tamanho dos dsRNAs a serem sintetizados ficaram em torno, de 200 nucleotídeos, para desta forma, favorecer a ligação à enzima DICER do organismo alvo, como discutido por vários autores (HUVENNE e SMAGGHE, 2010; JOGA et al, 2016; TEREINIUS et al, 2011).

Na prova de conceito realizada com o dsRNA produzido *in vitro*, este foi adicionado diretamente na água de criação das larvas em L1 como descrito por Mansur e colaboradores (2013) e por Singh e colaboradores(2013) para verificar sua eficácia na indução do fenótipo de silenciamento relacionado com a diminuição dos transcrito das CHSA e B. As larvas tratadas, separadamente, com cada um dos dsRNAs, tiveram uma taxa de mortalidade significativa, comparado aos grupos controles que, como esperado, não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 9). No entanto, destacou-se a taxa de mortalidade mais alta foi induzida pelo dsRNA que teve como alvo a região 2718_3 (ver tabela 1), tomando como referência a CHSA (Figura 8). Sabe-se pelo alinhamento realizado com as sequências de nucleotídeos de CHSA e CHSB, do mosquito *Ae. Aegypti*, que os siRNA formados pelo processamento da Dicer poderiam silenciar as duas enzimas CHSs, como observado na Figura 10. Utilizando regiões alvo diferentes nos genes de CHSs, em experiências, de nosso grupo, que antecederam este trabalho foi demonstrado que as fêmeas adultas, provenientes do tratamento com dsRNA para silenciar CHSB, 1,5 µg dsRNA/larva, não colocaram ovos após alimentação com sangue e apresentaram uma redução da expressão do gene *CHSB* em torno de 60%. As larvas tratadas com o dsRNA para silenciar CHSA apresentaram uma redução na expressão deste gene, *CHSA*, em torno de 50%, e foram observadas alterações morfológicas nos insetos adultos, provenientes do tratamento com dsRNA no estágio larvar (resultado não apresentado). Utilizando o dsRNAE, em uma dose sete vezes menor (0,2 µg dsRNA/larva) foi observada uma mortalidade em torno de 90 %

(Figura 9), no 3º dia após tratamento, e uma redução da expressão gênica de aproximadamente 51% para o gene da CHSA e de 80% para CHSB (Figura 10), justificando o fenótipo de mortalidade dos insetos. Segundo dados na literatura, Singh e colaboradores (2013) utilizaram o mesmo método, de síntese *in vitro* do dsRNA e administração na água de criação das larvas de mosquito *Ae. aegypti* para silenciar os genes de β -tubulina. Estes autores registraram uma redução da expressão destes genes entre 30 e 50 %. Também foi demonstrado que o silenciamento dos genes alvo de β -tubulina, por RNAi, apresentavam um alto grau de especificidade, confirmando o seu potencial uso no controle do mosquito (WHYARD e SINGH, 2009). Outro fator importante é que o dsRNA foi eficaz, mesmo sendo administrado diretamente na água de criação da larva, similar ao descrito por Figueira-Mansur e colaboradores (2013) sem necessidade de um carreador de dsRNA para proteção do mesmo, como proposto por Zhang e colaboradores (2010 e 2015). Figueira-Mansur e colaboradores (2013) também adicionaram o dsRNA na água de criação das larvas e conseguiram uma redução dos níveis de expressão do gene alvo em torno de 76%. Em alguns estudos, foram adicionadas modificações a este método para potencializar a entrada do dsRNA, como por exemplo, no estudo de López- Martinez e colaboradores (2012), os autores colocaram as larvas de *Culex pipiens* em uma solução de sal para sua desidratação e depois as colocaram em água contendo o dsRNA produzido *in vitro*, tendo como alvo a proteína HSP90. Com este método, os autores conseguiram reduzir a expressão do gene alvo do silenciamento em torno de 77%, favorecendo a entrada do dsRNA pelo diferencial de pressão osmótica, um método aditivo para facilitar a entrada do dsRNA, produzido *in vitro*, fortalecendo o potencial da técnica de RNAi para o controle de populações de insetos (LOPEZ-MARTINEZ e MEUTI, 2012).

Vários trabalhos existentes na literatura têm utilizado a expressão da dupla fita de RNA para explorar o potencial no controle de vírus, pragas e vetores de doenças. Apesar de ser um mecanismo bem conservado, a eficácia do método RNAi, depende não somente da administração da molécula, como também do tipo do organismo a ser tratado, sendo mais forte o efeito do silenciamento em algumas espécies do que em outras (RYTLEWSKI e BERONJA, 2015; JOGA et al, 2016; BALAKRISHNA e NAGARAJAN, 2017). O mosquito *Ae. aegypti* responde bem ao mecanismo de silenciamento por RNAi (FIGUEIRA-MANSUR et al, 2013).

De modo geral, a forma mais eficaz de administração do dsRNA tem sido a microinjeção, como mostrado por vários autores (ERDELYAN et al, 2012; SCOTT et al,

2013), tanto em experimentos feitos com *Ae. aegypti* quanto com *Anopheles gambiae*, assim como em outras espécies de insetos, como, *Drosophila melanogaster* (MILLER et al, 2008) *Tribolium castaneum* (ARAKANE et al., 2004; TOMOYASU et al, 2008). Apesar de ser muito eficaz, o método de microinjeção seria inviável no uso em grande escala, como no caso do controle populacional. Conclui-se que para um eficiente controle de insetos por RNAi é necessário que o organismo seja capaz de internalizar de forma autônoma o dsRNA, por exemplo, através da ingestão na alimentação ou através da epiderme. Em dípteros, ainda não existem evidências de um mecanismo clássico de entrada do dsRNA e de sua amplificação, no silenciamento, envolvendo produtos gênicos relacionados com vias de internalização do dsRNA e amplificação da resposta (TERENIUS et al, 2013; JOGA et al, 2016; GALDEANO et al, 2017), porém numerosas evidências experimentais sugerem, pela robustez da amplificação, durabilidade do fenótipo e transmissão à prole, que estes organismos talvez possuam mecanismos alternativos para o silenciamento por RNAi, diferentes dos descritos na literatura, que favorecem a transferência do dsRNA ou siRNA de uma célula a outra, provocando um efeito de silenciamento sistêmico. Este efeito também tem sido demonstrado em cultura de células de mosquito, onde após o início do mecanismo de RNAi, a replicação viral é inibida em células vizinhas ao local de indução (FRAGKLOUDIS et al, 2009; BALAKRISHNA e NAGARAJAN, 2017).

A proposta deste trabalho visa o menor custo e menor número de etapas possíveis na produção e na aplicação do bioinseticida, condição que exclui a possibilidade de uso de dsRNA produzido *in vitro* como método de controle, por isso a expressão de dsRNA em organismo geneticamente modificado. No trabalho apresentado, foi escolhida a bactéria *E. coli* cepa HT115, modificada geneticamente, para suprimir a expressão de RNase III, que destruiria a dupla fita de RNA.

Adicionando a biomassa, separadamente, contendo cada um dos dsRNA produzido *in vivo*, após sonicação, diretamente na água de criação, foi observada uma mortalidade significativa com todas as regiões alvo das CHSs no que diz respeito aos grupos controle e foi escolhida a construção contendo a região alvo 2718_3 (dsRNAE) com maior taxa de mortalidade (Figura 11). O grupo tratado do com a construção dsRNAE apresentou uma redução da expressão do gene da *CHSA* em torno de 40 %, enquanto à redução da expressão do gene da *CHSB* esteve em torno de 75 % (Figura 12). Attasart e colaboradores (2012), também utilizaram este método de expressão de dsRNA em *E. coli* para explorar o seu potencial no controle da síndrome de manchas brancas causada por um vírus que afeta

camarões. Neste trabalho, a bactéria produtora de dsRNA inativada por etanol foi administrada por ingestão oral. Os autores reportaram que os transcritos dos genes alvo foram reduzidos em 35 e 50 %, mostrando o potencial deste método para induzir silenciamento gênico por RNAi. Em função disso, foi testado o método de inativação da bactéria com etanol 75% como sugerido por Attasart e colaboradores (2013) e comparado com o método de inativação por choque térmico. Porém, a inativação da biomassa produtora de dsRNA por etanol não induziu resultados significativos de mortalidade (Figura 13), talvez porque dsRNA tenha sido precipitado durante o processo.

A inativação da bactéria mostrou ser um passo crítico, devido a que experimentos prévios mostraram que as bactérias produtoras de dsRNA, quando administradas vivas, proliferavam na água de criação, mascarando a observação dos resultados do silenciamento (resultado não apresentado). O primeiro método de inativação, testado neste trabalho, foi o ultrassom (sonicação), mas resultou ser um método laborioso e de elevado custo para ser utilizado em larga escala. O método de choque térmico para inativação da biomassa produtora de dsRNA, por sua vez mostrou ser eficaz na indução de mortalidade, em torno de 40% (Figura 13), na redução da expressão dos genes das CHSA e B, com diminuição dos transcritos em aproximadamente 50% (Figura 14) e alteração da morfologia dos adultos sobreviventes (Figura 15). Este fenótipo de silenciamento, mantido até a fase adulta do inseto sobrevivente, também demonstrado por vários autores, para diferentes espécies de insetos tratados (SOUZA-FERREIRA et al, 2014; ALVARENGA et al, 2015; CANTON et al, 2015) , entretanto este método apresenta-se também com elevado custo e com muitas etapas. Para reduzir os custos de produção do bioinseticida, foi testada também a solução de clorexidina, vendida para uso humano sob a marca Asseptcare[®], que obteve melhores resultados na mortalidade das larvas provocada pelo bioinseticida (Figura 18).

Ainda, o produto deste trabalho poderia substituir ou potencializar inseticidas reguladores do crescimento como diflubenzuron ou análogos do hormônio juvenil, da ecdisona e também inseticidas químicos. Pelo seu efeito adjuvante, como mostrado na Figura 19, quando administrado em combinação com o inseticida DFB, o que significaria uma redução da quantidade de inseticida principal a ser aplicada.

É possível que o bioinseticida associado ao DFB tenha fragilizado a cutícula e o intestino do mosquito facilitando a penetração do DFB, traduzida no aumento da mortalidade (Figura 16).

Além disso, recentemente, Douris e colaboradores (2016) utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, mostraram que a ação de inibição do DFB e outras benzofenilureias ocorrem através da interação com a enzima CHSA. Além disso, o efeito das benzofenilureias na síntese de quitina de ovos e outras estruturas quitinosas têm sido comprovados para outros insetos, como por exemplo, *Rhodnius prolixus* (HENRIQUES et al, 2016).

A ação conjunta do DFB sobre a enzima CHSA proposta por Douris e colaboradores (2016) e a diminuição dos transcritos das CHSA e B provocadas pelo silenciamento gênico (Figura 14), via RNAi, justificam o efeito adjuvante do bioinseticida descrito neste trabalho.

Destacando-se a importância de desenvolver estratégias alternativas de controle, um trabalho recentemente publicado, apresenta numerosas evidências do desenvolvimento de resistência ao diflubenzuron e outros inseticidas nas populações de mosquitos do Brasil. Os autores comprovaram que a resistência está mediada pela ação de várias enzimas de vias de detoxificação, como esterases, oxidases e glutathione-S-transferases (BELLINATO et al, 2016). Um estudo realizado na Flórida, Estados Unidos, mostrou que inseticidas utilizados contra *Diaphorina citri*, uma praga dos cítricos, eram altamente tóxicos para *Apis mellifera*, inseto polinizador de conhecidas vantagens para os ecossistemas (CHEN et al, 2017). Reduzir a quantidade de inseticidas com o uso de adjuvantes é uma alternativa econômica e segura nas estratégias de controle de vetores, pois esses inseticidas, em geral, têm alto custo de produção e provocam impacto ambiental. Além disso, o produto deste trabalho apresenta-se como uma, possível, alternativa para o fenômeno de resistência aos inseticidas por parte das populações de mosquito. A região alvo para o silenciamento gênico dos genes de *CHS* pela dupla fita de RNA pode ser variada, contornando assim o problema de desenvolvimento da resistência pelos mosquitos.

Ainda, com o objetivo de reduzir os custos de produção foi testada a produção do bioinseticida com o indutor da expressão do dsRNA, a lactose, na concentração 10 g/L, substituindo o IPTG (1 mM) como descrito para produção de asparaginase por Einsfeldt (2014). Com o mesmo objetivo, Bashir e colaboradores (2015) compararam a produção de interferon recombinante de uso terapêutico utilizando lactose na concentração de 14 g/L e de IPTG 1.5 mM, no sistema de expressão *E. coli*. Estes autores observaram um aumento da biomassa mais lento na indução com lactose em comparação com IPTG, como também foi observado na Figura 17, onde o aumento da concentração celular em função do tempo foi menor para lactose comparado com a indução por IPTG. Entretanto, Bashir e colaboradores (2015) reportaram o maior rendimento de produção de interferon utilizando lactose como

indutor, o que coincide com os resultados obtidos neste trabalho, onde foi obtida uma maior produção do dsRNAE, quantificado por fluorescência, método Qubit, após indução com lactose 10 g/L (Figura 20).

Os resultados de indução de mortalidade pela biomassa produtora de dsRNAE por indução com lactose (10 g/L) e inativada por clorexidina foram superiores, em torno de 70%; quando administrado o lisado bacteriano em concentrações baixas na água de criação das larvas como se apresenta na figura 21. Os níveis dos transcritos das CHSA e B foram reduzidos em 40 e 49 %, respectivamente comparáveis ao registrado por Van Ekert e colaboradores (2014), também em *Ae. aegypti*, tendo como alvo uma metil transferase, da via de biossíntese de hormônio juvenil, e utilizando como sistema de expressão heteróloga a levedura *Pichia pastoris*. Esse resultado corrobora a eficácia do método de expressão *in vivo* para ser utilizado na produção do bioinseticida.

Uma das alternativas para melhorar a estabilidade e eficácia na administração do dsRNA é o uso de nanopartículas e outros carreadores. Zhang e colaboradores, (2010 e 2015) utilizaram nanopartículas de quitosana como carreadores do dsRNA, no tratamento do mosquito *Anopheles gambiae*. Zhang e colaboradores (2010), por exemplo, conseguiram diminuir os transcritos de CHSA em torno de 58 % e de CHSB em torno de 53 %. Porém, como discutido por Phanse e colaboradores (2015) e Balakrishna e colaboradores (2017), embora a quitosana seja um material bastante inofensivo ao ambiente, o uso de nanopartículas carreadoras do dsRNA em geral, para o controle de populações de insetos pode provocar toxicidade em espécies não alvo e também pode aumentar o custo de produção do bioinseticida.

A estabilidade do dsRNA contido no lisado bacteriano foi comprovada após dois meses de estocagem a temperatura ambiente, dissolvido em água da torneira (Figura 31). Este resultado mostrou que o produto que foi utilizado como bioinseticida, neste trabalho, apresenta estabilidade nas condições de aplicação empregadas, sem necessidade de carreadores. Embora não tenha sido comprovado, podemos especular que os *debris* celulares do lisado bacteriano sirvam como carreadores e/ou protetores da dupla fita de RNA, aumentando sua estabilidade, na água de criação.

Fischer e colaboradores (2016) demonstraram baixa estabilidade do dsRNA DvSnf7, em água e em solo, produzido *in planta* e tendo como alvo o organismo *Diabrotica virgifera*. Estes autores determinaram a cinética de degradação do dsRNA DvSnf7 em água, e reportaram um tempo de vida média menor de 3 dias, assim como uma persistência em solo

de menos de 6 dias. Isso de certa forma é desejável para evitar prejuízo ao meio ambiente, mas deve ser também considerado que o produto utilizado como bioinseticida deve manter a estabilidade da molécula de dsRNA em condições de temperatura ambiente e por tempo prolongado a fim de ser internalizado pela larva.

O bioinseticida desenvolvido neste trabalho também mostrou ser eficaz em estádios avançados do desenvolvimento larval, como mostrado nos resultados de mortalidade e diminuição da expressão dos genes *CHSA* e *B* em larvas de 4º estágio administradas com o bioinseticida (Figuras 22 e 23, respectivamente). Este resultado permite a intervenção com o bioinseticida não só no início do ciclo de vida do inseto, como também em estágios avançados do desenvolvimento, como mostrado na figura 15, o fenótipo de silenciamento gênico foi mantido até a fase adulta, onde os insetos eram menores e apresentavam cutículas mais frágeis. Isoe e colaboradores (2009) demonstraram que a ingestão do dsRNA induz silenciamento de efeito prolongado, nas larvas de mosquito. Esta evidência corrobora os resultados de atraso na pupação (Figura 24) e na evolução ao estágio adulto (Figura 25).

Embora não tenha sido demonstrada a via de entrada do bioinseticida, foram observadas alterações na digestão da larva, reflexo da diminuição da expressão do gene da *CHSB*, relacionada à formação da MP do inseto (Figuras 28, 29 e 30). Contudo, ao longo deste trabalho, a mortalidade e a diminuição da expressão gênica são variáveis, pois, como discutido por Surakasi e colaboradores (2011), a ação do dsRNA pode ser influenciada pelo pH da água e pelo ambiente do epitélio intestinal.

Para normalizar o efeito do dsRNA no inseto seria necessário determinar a quantidade ingerida pelos insetos, o que seria impraticável em escala de controle populacional. Shukla e colaboradores (2016) e Joga e colaboradores (2016) também demonstraram efeitos de silenciamento em intensidade diferentes, em termos percentuais, em coleópteros e lepidópteros, em função das barreiras naturais presentes em cada uma das espécies. Estes autores também descreveram que este fenômeno estava associado à estabilidade, diferente, do dsRNA nos tecidos alvo e à eventual inclusão do dsRNA em corpos ácidos presentes na célula, o que impede o seu processamento pela maquinaria do RNAi.

Particularmente, o efeito do silenciamento é mais notável após o tratamento das larvas por 72 h, pois, as larvas apresentaram falhas na estrutura do intestino quando comparado às larvas controle (Figuras 28 e 29). Como está descrito na literatura, no modelo de formação da MP do intestino, proposto por Wang E Granados (2000), as células localizadas na circunvizinhança da cardia secretam a quitina que irá ser depositada formando na MP do tipo

II. Segundo o descrito por diversos autores, a CHSB, responsável pela síntese de quitina na MP é expressa nos estágios de larva durante a alimentação, nas células epiteliais do intestino médio (IBRAHIM et al, 2000; ZIMOCH e MENZERDORFER,2002; ARAKANE et al, 2004). Segundo a evidência encontrada neste trabalho, após a internalização do bioinseticida foi induzido o silenciamento da CHSB, como evidenciado pela diminuição dos níveis de transcritos deste gene por técnica de qPCR (Figura 27) e pela sonda que detecta transcritos de CHSB (Figura 30). Logo, quando as larvas foram alimentadas, provavelmente a formação da MP foi afetada, visto pela alteração do tubo digestivo (Figura 28 e 29). Outra evidencia deste fenômeno pode ser constatadas na diminuição do conteúdo de quitina, inclusive nas concentrações de bioinseticida inferiores a $2 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$, foi observada a redução da quitina, detectada por fluorescência com sonda FITC-WGA (Figura 29). Nesta figura, observa-se que o sinal de fluorescência diminui com o aumento da dose do bioinseticida e as falhas na morfologia do intestino aumentam. Devido ao duplo silenciamento induzido em ambos os genes das *CHSs A e B*, a diminuição do conteúdo de quitina é observada não somente no intestino, justificando a dificuldade na alimentação, bem como alterações na morfologia da cutícula (Figuras 28). Conclui-se que o efeito do duplo silenciamento está diretamente relacionado com alteração no metabolismo da quitina que consequentemente provocou mortalidade significativa, diminuição do conteúdo quitina na cutícula e no intestino, sendo mais notável quanto maior a concentração do bioinseticida e teve influência no desenvolvimento do inseto no estágio de pupa e na fase adulta.

A técnica de hibridação *in situ* tem sido utilizada para o estudo de localização tecidual de várias moléculas. A localização da CHS em células colunares da porção anterior do intestino médio de *Manduca sexta*, foi descrita por Zimoch e Merzendorfer (2002), utilizando sondas de DNA que tinham como alvo o domínio catalítico desta enzima. No presente trabalho, foi observado o sinal abundante de fluorescência no epitélio intestinal da larva controle, onde aconteceu a hibridação do dsRNAE marcado com o fluorôforo (Figura 30). A distribuição do sinal, na região que faceia o intestino, coincide com a localização da expressão descrita para transcritos de CHSB, por Kramer e Muthukrishnam (2005). Também é similar ao reportado por Koga e colaboradores (2009) e em experimentos semelhantes utilizando os insetos *Ae. aegypti* e *Acyrtosiphon pisum*, respectivamente. O sinal foi menor no epitélio intestinal da larva que fora tratada previamente com o bioinseticida, corroborando os resultados de mortalidade e diminuição da expressão da CHSB, um dos alvos desta sonda. Um dos principais problemas do método de fluorescência por hibridação *in situ* é a

autofluorescência emitida pelo inseto, que mascara os resultados. Como alternativa para contornar essa dificuldade experimental, Koga e colaboradores (2009), Haugen e colaboradores (2010) introduziram um passo de branqueamento (*bleaching*, em inglês), utilizando uma solução de etanol e peróxido de hidrogênio para eliminar a autofluorescência. Além disso, o protocolo de pré-hibridação, sugerido pelo fabricante, inclui um passo de clareamento com xileno, um solvente orgânico amplamente utilizado em experimentos histológicos. Apesar de ter sido reportado que a CHSA é expressa pelas células da epiderme quando acontece à deposição da quitina na cutícula, em estágio de larva, pupa e início da fase adulta (KRAMER e MUTHUKRISHNAM, 2005) não foi observado sinal de fluorescência na epiderme da larva. Devido aos passos de clareamento que deixa o espécime totalmente permeável para os processos de hibridação que devem ter afetado a estrutura e integridade dos tecidos da epiderme, provocando a degradação dos transcritos alvo de CHSA a ser reconhecido pela sonda. Mas, como se mostra na Figura 30, estes passos prévios à hibridação são imprescindíveis, pelo parâmetro de autofluorescência que possui o espécime, como mostrado à esquerda na Figura 30.

Estes resultados em conjunto, comprovam a eficiência do bioinseticida, em três diferentes concentrações de aplicação, para induzir o fenótipo de silenciamento relacionado com a diminuição da expressão dos transcritos das enzimas CHSs A e B, da via de biossíntese de quitina, mostrando seu potencial para o controle do mosquito.

A obtenção de sistemas de expressão de duplas fitas de RNA em micro-organismos recombinantes, como exemplo da bactéria *E. coli*, aqui apresentada, constituem alternativa aos inseticidas empregados como o temephós (organofosforado) e o *Bacillus thuringiensis* (larvicida natural) para o controle do mosquito ou adjuvante de inseticidas. O silenciamento gênico da CHS visa causar alterações fisiológicas no inseto como bloqueio ou atraso no desenvolvimento, morte, inibição da muda, inibição da reprodução e alteração da viabilidade dos ovos dos mosquitos e conseqüentemente diminuição da capacidade vetorial. Desta forma, os dados apresentados sugerem que a biomassa produtora de dsRNA, agiria como um bioinseticida sozinho ou como um adjuvante de inseticida, em combinação com outros inseticidas, já utilizados para controle, tais como: inseticidas químicos, drogas reguladoras do crescimento, inibidores da síntese de quitina ou análogos de hormônios.

5. CONCLUSÃO

O trabalho apresentado, refere-se a um sistema e utilização do mesmo, para produção de ácidos ribonucleicos (RNA) em dupla fita (dsRNA), a partir de microrganismos recombinantes, para silenciamento gênico dos genes de quitina sintase, visando o controle de populações de insetos. Também pode ser empregado como adjuvante de controle entomológico de mosquitos que visa reduzir a incidência de arboviroses como a dengue, a febre amarela, a febre Zika e a febre chikungunya e de outras doenças transmitidas por mosquitos depósito de patente nº BR 10 2015 032052 3 no INPI em dezembro de 2015. Em seguida apresentamos as principais vantagens da presente proposta:

- 1- O trabalho apresentado, é um sistema e utilização do mesmo, para produção de ácidos ribonucleicos (RNA) em dupla fita (do inglês, *double strand ribonucleic acid* (dsRNA)), a partir de microrganismos recombinantes, para silenciamento gênico dos genes de quitina sintase, visando o controle de populações de insetos. Podendo ser obtida dupla fita de RNA em largas quantidades.
- 2- O dsRNA, contido no lisado bacteriano, para silenciamento dos genes de CHS, é aplicado na água de criação da larva do mosquito, sem necessidade de carreadores. O fim deste trabalho não é uma prova de conceito, é um produto, a base de dupla fita de RNA obtido a partir de microrganismos recombinantes, para controle de mosquito (bioinseticida), como adjuvante de inseticida, controles entomológicos e uma ferramenta para o controle de doenças transmitidas por mosquitos (controle epidemiológico).
- 3- Neste trabalho, é apresentado um produto que visa o silenciamento simultâneo dos genes de *CHSA* e *B*, utilizando como alvo um fragmento, comum aos dois genes. Os resultados de nosso trabalho evidenciam que com uma única sequência alvo, foi observado o fenótipo de silenciamento em diferentes órgãos do inseto.
- 4- Também foram constatadas mudanças no conteúdo de quitina, de cutícula e intestino e atraso no desenvolvimento do inseto. O bioinseticida mostrou ter estabilidade nas condições ambientais e eficácia para induzir o silenciamento, mesmo sendo administrado em estádios avançados do desenvolvimento da larva. Foi mostrado também o efeito do bioinseticida na pupação e a evolução ao estágio adulto.

- 5- Foi demonstrada a capacidade do bioinseticida de induzir o silenciamento e provocar mortalidade ainda que em menor percentual, mesmo utilizando concentrações menores.

A dupla fita de RNA utilizada para o controle populacional do mosquito poderá ser produzida em larga escala e administrada em diferentes formas para o aumento na eficácia do controle. O presente trabalho constitui-se, na produção de um bioinseticida, uma poderosa ferramenta, para o enfrentamento do mosquito e das doenças por ele transmitidas, um grande problema de Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL N, DASARADHI PV, MOHMMED A, MALHOTRA P, BHATNAGAR RK, M. S. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 67, n. 4, p. 657–85., 2003.
- AIRS PM, B. L. RNA Interference for Mosquito and Mosquito-Borne Disease Control. **Insects.**, v. 8, n. 1, 2017.
- ALDRIDGE, A. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl pnitrophenyl thiophosphate and analogs. **Biochem. J.**, v. 46, p. 451–460, 1950.
- ALKHAIBARI A.M.,CAROLINO A.T.,YAVASOGLU, S.I., ET AL. Metarhizium brunneum blastospore pathogenesis in Aedes aegypti larvae: Attack on several fronts accelerates mortality. **PLoS Pathog.**, v. 12, p. e1005715, 2016.
- ALVARENGA, E. S. L. et al. Chitin is a component of the Rhodnius prolixus midgut. **Insect biochemistry and molecular biology**, 2015.
- AMUZU HE, M. E. Wolbachia-Based Dengue Virus Inhibition Is Not Tissue-Specific in Aedes aegypti. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 11, p. e0005145, 2016.
- ARAKANE, Y. et al. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, Tribolium castaneum, and alternate exon usage in one of the genes during development. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 3, p. 291–304, 2004.
- ARAKANE, Y. et al. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, Tribolium castaneum. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 10, p. 959–962, 2008.
- ARAKANEY,MUTHUKRISHNAN S, BEEMANRW,KANOSTMR, K. K. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **PNAS**, v. 102, p. 11337–42, 2005.
- ARAÚJO, W. S. A importância de fatores temporais para a distribuição de insetos herbívoros em sistemas Neotropicais. **Revista da Biologia**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2013.
- ARMSTRONG N., HOU W., T. Q. Biological and Historical Overview of Zika Virus. **World J Virol** , v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017.
- ASHFAQ M, SONODA S, T. H. Developmental and tissue-specific expression of CHS1 from Plutella xylostella and its response to chlorfluazuron. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 89, p. 20–30, 2007.
- ATTASART P., NAMRAMOON O., KONGPHOM U., CHIMWAI C., P. S. Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. **Virus Research**, v. 1, n. 1, p. 252–256, 2013.
- ATTAWAY DF., WATERS NM., GERAGHTY E.M., J. K. Zika virus: Endemic and epidemic ranges of Aedes mosquito transmission. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, p. 120—123, 2017.

- AVELINO-SILVA VI, MIYAJI KT, H. P.; HUANG Y, SIMOES M, LIMA SB, ET AL. CD4/ Fever, CD8 Ratio and KT Ratio Predict Yellow Patients., Vaccine Immunogenicity in HIV-Infected. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 12, 2016.
- BALAKRISHNA PILLAI A., U. NAGARAJAN U., M. A. ET AL. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. **Insect Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 127–139, 2017.
- BASHIR H., A. N.; KHAN M.A., ZAFAR A., USMAN T., SAAD K., MUHAMMAD I.K., F. H. T. Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1–7, 2015.
- BEATY, B.J. AND MARQUARDT, W. C. The biology of diseases vectors. **University Press of Colorado**, 1996.
- BELLINATO DF, VIANA-MEDEIROS PF, A. S. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian Aedes aegypti Populations. **Biomed Res Int.**, 2016.
- BELTRÁN-SILVA, S.L. CHACÓN-HERNÁNDEZ, S.S. MORENO-PALACIOS E., P.-M. J. Á. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. **Rev Med Hosp Gen Méx.**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2016.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BLAIR, C. D. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. **Future Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 265–277, 2011.
- BORGHERINI G, POUBEAU P, STAIKOWSKY F, ET AL. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clin Infect Dis.**, v. 44, p. 1401–7, 2007.
- BRAGA, I.A. AND VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.
- BRETON C, MUCHA J, J. C. Structural and functional features of glycosyltransferases. **Biochimie.**, v. 83, n. 8, p. 713–8., 2001.
- BROGDON, W.G. E MCALLISTER, J. C. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, 1998.
- BUSVINE J. R. Cross and multiple resistance in mosquitoes. **Cah O.R.S.T.O.M; ser Ent. Med**, v. 6, p. 215–219, 1968.
- BUTT T.M., GREENFIELD B.P., GREIG C., MAFFEIS T.G., ET AL. Metarhizium anisopliae pathogenesis of mosquito larvae: A verdict of accidental death. **PLoS ONE**, v. 8, p. e81686, 2013.
- CALVEZ E, GUILLAUMOT L, MILLET L, M. J.; BOSSIN H, RAMA V, ET AL. Genetic Diversity and Phylogeny of Aedes aegypti, the Main Arbovirus Vector in the

Pacific. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004374, 2016.

- CANTON P.E., CANCINO-RODEZNO A., GILL S.S., SOBERON M., B. A. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1–17, 2015.
- CAO-LORMEAU VM, BLAKE A, MONS S, ET AL. Guillain---Barré Syn-drome outbreak associated with Zika virus infection in FrenchPolynesia: a case---control study. **Lancet.**, v. 387, p. 1531---9, 2016.
- CAPEDING MR, TRAN NH, HADINEGORO SR, ISMAIL HI, CHOTPITAYASUNONDH T, C.; MN, ET AL. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebocontrolled trial. **Lancet**, v. 384., p. 1358–65, 2014.
- CARTHEW R.W., AND S. E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642–655, 2009.
- CASIDA, J.E. AND QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide: Past, present, or Future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 1–16, 1998.
- CATTERUCCIA F, L. E. RNAi in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Methods Mol Biol.**, v. 555, p. 63–75, 2009.
- CHEN D, GUO R, X. X. ET AL. Uncovering the immune responses of *Apis mellifera ligustica* larval gut to *Ascospaera apis* infection utilizing transcriptome sequencing. **Gene.**, 2017.
- CHI, J. T., CHANG, H. Y., WANG, N. N., CHANG, D. S., DUNPHY, N., BROWN, P. O. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v. 100, p. 6343–6346., 2003.
- CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction**. [s.l: s.n.].
- COATS, J. R. Mechanisms of Toxic Action and Structure- Activity Relationships for Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Insecticides. **Environmental Health Perepectives**, v. 87, p. 255–262, 1990.
- CONSOLI ROTRAUT AGB, O. R. L. **Principais mosquitos de importancia sanitária no Brasil**. [s.l: s.n.].
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 1988.
- COUTINHO P.M.; DELEURY E.; DAVIES G.J.; HENRISSAT B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, p. 307–317, 2003.
- D., B. RNA silencing. **Current Biology**, v. 12, n. 3, 2002.
- DAME D.A., CURTIS C.F., BENEDICT M.Q., ROBINSON, A.S., K. B. . Historical

- applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. **Malar. J.**, v. 8, p. S2–S11., 2009.
- DARBRO J.M., JOHNSON P.H., THOMAS M.B., RITCHIE S.A., KAY B.H, R. P. A. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 656–664, 2012.
 - DENNIS, C. The brave new world of RNA. **Nature**, v. 418, p. 122–124., 2002.
 - DESPRÉS L, STALINSKI R, TETREAU G, PARIS M, BONIN A, NAVRATIL V, REYNAUD S, D. J. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. **BMC Genomics**, v. 15, n. 926, p. 2–13, 2014.
 - DIAMON MS, P. T. Molecular insight into dengue virus pathogenesis and its implications for disease control. **Cell**, v. 162, p. 488–92., 2015.
 - DONALÍSIO, MR AND GLASSER, C. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 259–272, 2002.
 - ECONOMOPOULOU A, DOMINGUEZ M, HELYNCK B, ET AL. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. **Epidemiol Infect.**, v. 137, p. 534–41, 2009.
 - EINSFELDT, K. **Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco.** [s.l: s.n.].
 - EL-SHESHENY I, HAJERI S, EL-HAWARY I, GOWDA S, K. N. Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. **PLoS One.**, v. 8, n. 5, p. e65392., 2013.
 - ELLIOT M., FARNHAM A.W., J. N. F. ET AL. Potent pyrethroid insecticides from modified cyclopropan acids. **Nature**, p. 244–456, 1973.
 - ERDELYAN CN1, MAHOOD TH, BADER TS, W. S. Functional validation of the carbon dioxide receptor genes in *Aedes aegypti* mosquitoes using RNA interference. **Insect Mol Biol.**, v. 1, p. 119–27, 2012.
 - FABRITIUS HO, ZIEGLER A, FRIÁK M, NIKOLOV S, HUBER J, SEIDL BH, RUANGCHAI S, ALAGBOSO FI, KARSTEN S, LU J, JANUS AM, PETROV M, ZHU LF, HEMZALOVÁ P, HILD S, RAABE D, N. J. Functional adaptation of crustacean exoskeletal elements through structural and compositional diversity: a combined experimental and theoretical study. **Bioinspir Biomim.**, v. 11, n. 5, p. 055006., 2016.
 - FEYEREISEN R. Evolution of insect P450. **Biochem Soc Trans**, v. 34, p. 1252–1255, 2006.
 - FRENCH-CONSTANT R.H., PITTENDRIGH B., V. A. ET AL. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? **Philos. Trans. Roy.**

Soc. Lond. B, v. 353, p. 1685–1693, 1998.

- FIGUEIRA-MANSUR J., F.-P. A. et al. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. **Insect Molecular Biology**, v. 22, n. 6, p. 648–658, 2013.
- FINNEGAN, J. E., MARGIS, R., WATERHOUSE, P. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the Arabidopsis carpel factory (DICER-LIKE1) mutant, homolog of Dicer-1 from *Drosophila*. **Curr. Biol**, v. 13, p. 236–240., 2003.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806–811., 1998.
- FISCHER J.R, ZAPATA F., D. S. ET AL. Aquatic fate of a dsRNA in a sediment water system following an over-water application. **Environ Toxicol Chem**, 2016.
- FLEGR J. A Rapid Method for Isolation of Double Stranded RNA. **PREPARATIVE BIOCHEMISTRY**, v. 17, n. 4, p. 423–433, 1987.
- FLORCZAK-WYSPIAŃSKA J., NAWOTCZYŃSKA E., K. W. Yellow fever vaccine-associated neurotropic disease (YEL-AND) – A case report. **neurologia i neurochirurgia polska**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2016.
- FOCKS DA. Toxorhynchites as biocontrol agents. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 23, n. 2, p. 118–27., 2007.
- FORATTINI OP. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. Edusp ed. São Paulo: [s.n.].
- FRANZ AW, SANCHEZ-VARGAS I, RABAN RR, BLACK WC , JAMES AA, O. K. Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically diverse *Aedes aegypti* strain. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 5, p. e2833., 2014.
- FRIEDMAN JM, J. P. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. **Swiss Med Wkly.**, v. 139, n. 33–34, p. 466–72., 2009.
- FU G., LEES R.S., NIMMO, D., ET AL. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 4550–4554., 2010.
- FUKUTO, T. R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245–254, 1990.
- GÉRARDIN P, SAMPÉRIZ S, RAMFUL D, ET AL. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child chikungunyavirus infection: the CHIMERE cohort study on Reunion Island. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, p. e2996, 2014.
- GOMES B, PURKAIT B, DEB RM, RAMA A, SINGH RP, FOSTER GM, COLEMAN M, KUMAR V, PAINE M, DAS P, W. D. Knockdown resistance mutations predict DDT resistance and pyrethroid tolerance in the visceral leishmaniasis vector *Phlebotomus argentipes*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 4, p.

e0005504, 2017.

- GOMEZ I, SÁNCHEZ J, CARLOS MUÑOZ-GARAY C, MATUS V, SARJEET S. GILL SS., S. M. AND B. A. Bacillus thuringiensis Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochem. J.**, v. 459, p. 383–396, 2014.
- GORMAN, K., YOUNG, J., PINEDA L., ET AL. Short-term suppression of Aedes aegypti using genetic control does not facilitate Aedes albopictus. **Pest Manag. Sci.**, v. 72, p. 618–628, 2016.
- GORMAN MJ, A. Y. Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in Tribolium castaneum. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p. 267–73, 2010.
- GRISHOK A., PASQUINELLI A. E., CONTE D.L, LI N., PARRISH S., HA I., BAILLIE D. L., FIRE A., RUVKUN G., M. C. C. Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control C. elegans Developmental Timing. **Cell**, v. 106, p. 23–34, 2001.
- GROSSHANS, H., SLACK, F. J. Micro-RNAs: small is plentiful. **J. Cell. Biol.**, v. 156, n. 1, p. 17–22, 2001.
- GUZMAN D.R., A. R. . . Population dynamics of Culex quinquefasciatus and the fungal pathogen Lagenidium giganteum (Oomycetes: Lagenidiales) in stagnant water pools. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 3, p. 442–449, 1987.
- HAUGEN M, TOMCHANEY M, KAST K. Whole-mount in situ hybridization for analysis of gene expression during Aedes aegypti development. **Cold Spring Harb Protoc.**, v. 10, 2010.
- HEMINGWAY, J. AND RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annu. Rev. Entomol**, v. 45, p. 371–391, 2000.
- HEMINGWAY J. AND KARUNARATNE S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med Vet Entomol**, v. 12, p. 1–12, 1998.
- HENRIQUES BS, GENTA FA, MELLO CB, SILVA LR, CODOGNO TF, OLIVEIRA AF, MARINHO LP, VALLE D, LIMA JB, FEDER D, GONZALEZ MS, A. P. Triflumuron Effects on the Physiology and Reproduction of Rhodnius prolixus Adult Females. **Biomed Res Int.**, 2016.
- HERTIG M., W. S. B. Studies on Rickettsia-like micro-organisms in insects. **J. Med. Res.**, v. 44, p. 329–374., 1924.
- HOFFMANN A.A., MONTGOMERY B.L., POPOVICI J., ITURBE-ORMAETXE I., ET AL. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, p. 454–457, 2011.
- HOGENKAMP DG, ARAKANE Y, ZIMOCH L, MERZENDORFER H, KRAMER KJ, ET AL. Chitin synthase genes in Manduca sexta: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs

- during development. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 529–40, 2005.
- HOLL SM, SCHAEFER J, GOLDBERG WM, KRAMER KJ, MORGAN TD, H. T. Comparison of black coral skeleton and insect cuticle by a combination of carbon-13 NMR and chemical analyses. **Arch Biochem Biophys.**, v. 292, n. 1, p. 107–11, 1992.
 - HOPKINS TL. HARPER MS. Lepidopteran peritrophic membranes and effects on dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 47, p. 100–109, 2001.
 - HORODYSKI FM, R. L. Expression and hormonal control of a new larval cuticular multigene family at the onset of metamorphosis of the tobacco hornworm. **Dev Biol**, v. 132, p. 292–303, 1989.
 - HUVENNE H., S. G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227–235, 2010.
 - IBRAHIM G.H., SMARTT C.T., KILEY L.M., C. B. M. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, p. 1213– 1222, 2000.
 - IP, G. et al. Consumer Willingness to Pay for Dengue Vaccine (CYD-TDV, Dengvaxia R) in Brazil; Implications for Future Pricing Considerations. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 41, p. 1–9, 2017.
 - ISOE J, RASCÓN AA JR, KUNZ S, M. R. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 39, n. 12, p. 903–12., 2009.
 - IWASAKI Y.W., SIOMI MC., S. H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 84, p. 25.1–25.29, 2015.
 - JAVELLE E, RIBERA A, DEGASNE I, ET AL. Specific management of Post Chikungunya Rheumatic Disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006--2012. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, p. e0003603., 2015.
 - JOGA MR, ZOTTIMJ, S.; CHRISTIAENSO. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. **Front. Physiol**, v. 7, n. 553, 2016.
 - KANAKALA S, G. M. RNA Interference in Insect Vectors for Plant Viruses. **Viruses.**, v. 8, n. 12, 2016.
 - KATO N, MUELLER CR, FUCHS JF, WESSELY V, LAN Q, C. B. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2006.
 - KERWIN J.L., W. R. K. Ground and aerial application of the asexual stage of *Lagenidium giganteum* for control of mosquitoes associated with rice culture in the central valley of California. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 3, p. 59–64, 1987.
 - KHOO CC, DOTY JB, HEERSINK MS, OLSON KE, F. A. ransgene-mediated

suppression of the RNA interference pathway in *Aedes aegypti* interferes with gene silencing and enhances Sindbis virus and dengue virus type 2 replication. **Insect Mol Biol.**, v. 22, n. 1, p. 104–14., 2013.

- KIM VN., HAN J., S. M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Post-TRANScRiPtioNAl coNtRol**, v. 10, p. 126–139, 2009.
- KISTLER K.E., VOSSHALL L.B., M. B. J. Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. **Cell Reports**, v. 11, p. 51–60, 2015.
- KOGA, R. T. T. AND F. T. Quenching autofluorescence of insect tissues for in situ detection of endosymbionts. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 44, n. 2, p. 281–291, 2009.
- KRAMER K. J. AND MUTHUKRISHNA N, S. Chitin metabolism in insects: a revisit. In: GILBERT L., I., IATROU K., AND GILL, S. (Ed.). . **Comprehensive Molecular Insect Science**. [s.l.] Elsevier Press, Oxford, UK, 2005.
- KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, S. E. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol.**, v. 305, n. 3, p. 567–80., 2001.
- KUMAR G, SINGH RK, PANDE V, D. R. Impact of container material on the development of *Aedes aegypti* larvae at different temperatures. **J Vector Borne Dis.**, v. 53, n. 2, p. 144–8, 2016.
- LABRECQUE G.C., BOWMAN M.C., PATTERSON R.S., S. J. A. Persistence of thiotepa and tepa in pupae and adults of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. **Bull. World Health Organ.**, v. 47, p. 675–676, 1972.
- LAWLER SP. Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 139, p. 335–343, 2017.
- LIU YC, CHEN WL, KUNG WH, H. H. Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi. **BMC Genomics**, v. 18, n. 2, p. 2–6, 2017.
- LIVAK K.J., S. T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$. **Method. Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.
- LOPES J., L. A. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. Coletas ao longo do leito de ribeirão. **Rev. Saúde Públ., São Paulo**, v. 29, n. 3, p. 183–191, 1995.
- LOPEZ-MARTINEZ G, MEUTI M, D. D. Rehydration driven RNAi: a novel approach for effectively delivering dsRNA to mosquito larvae. **J Med Entomol.**, v. 49, n. 1, p. 215–8., 2012.
- LUMJUAN N., RAJATILEKA S., CHANGSOM D., WICHEER J., LEELAPAT P., P. L. A. ET AL. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resist-ance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect Biochem MolBiol**, v. 41, p. 203–209., 2011.

- MAJEROWICZ D, HANNIBAL-BACH HK, CASTRO RS, BOZAQUEL-MORAIS BL, ALVES-BEZERRA M, GRILLO LA, MASUDA CA, FÆRGEMAN NJ, KNUDSEN J, G. K. The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: Expression, characterization and function of RpACBP-1. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 72, p. 41–52, 2016.
- MATHENGE E. M, GIMNIG J. E., KOLCZAK, M. ET AL. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J Med Entomol**, v. 38, p. 531–536, 2001.
- MBOGO C. N., BAYA N. M., O. A. V. ET AL. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. **Med Vet Entomol**, v. 10, p. 251–259, 1996.
- MCGRANE V., CARLSON J.O., MILLER B.R., B. B. J. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, p. 502–510, 1988.
- MEHENDALE, S. M.; RISBUD, A.R.; RAO, J. A. ET AL. Outbrake of dengue fever in rural areas of Parhani district of Maharashtra (India). **Ind. J. Med Res**, v. 93, p. 6–11, 1991.
- MENDES AM, AWONO-AMBENE PH, NSANGO SE, COHUET A, FONTENILLE D, KAFATOS FC, CHRISTOPHIDES GK, MORLAIS I, V. D. Infection intensity-dependent responses of *Anopheles gambiae* to the African malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun.**, v. 79, n. 11, p. 4708–15, 2011.
- MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **Eur J Cell Biol.**, v. 90, n. 9, p. 759–69, 2011.
- MERZENDORFER H. Insect chitin synthases: a review. **J. Comp. Physiol. B**, v. 176, p. 1–15, 2006.
- MERZENDORFER H. The celular basis of chitin sythesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, p. 759–769, 2011.
- MERZENDORFER H, Z. L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J Exp Biol.**, v. 24, p. 4393–412., 2003.
- METCALF, R. L. No Title. **Structure-activity relationships for insecticidal carbamates**, v. 44, p. 43–78, 1971.
- MEYER-FERNANDES J. R., ARRESE E. L., W. M. A. Allosteric effects and trehalose protect larval *Manduca sexta* fat body glycogen phosphorylase B against thermal denaturation. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, v. 30, p. 473–478, 2000.
- MILANI R. Genetical aspects of insecticide resistance. **Bull World Health Org**, p. 77–87, 1963.
- MILLER MM, POPOVA LB, M. E. ET AL. The invertebrate B(0) system transporter,

- D. melanogaster NAT1, has unique d-amino acid affinity and mediates gut and brain functions. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 38, n. 10, p. 923–31., 2008.
- MILLERL.H., SAKAI R.K., ROMANS P., GWADZ R.W., ET AL. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 237, p. 779–781., 1987.
 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor. In: BRASÍLIA (Ed.). . **Manual de normas técnicas**. 3. ed. [s.l.] Ministério da saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001. p. 84.
 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2010.
 - MITRI C, MARKIANOS K, GUELBEOGO WM, ET AL. The kdr-bearing haplotype and susceptibility to *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*: genetic correlation and functional testing. **Malar J.**, v. 14, p. 391, 2015.
 - MOREIRA J, PEIXOTO TM, MACHADO DE SIQUEIRA A, L. C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, p. doi: 10.1016/j.cmi.2016.12.027., 2017.
 - MOREIRA MF, DOS SANTOS AS, MAROTTA HR, MANSUR JF, RAMOS IB, MACHADO EA, SOUZA GH, EBERLIN MN, KAISER CR, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S, V. A. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 37, n. 12, p. 1249–61, 2007.
 - MORGAN JL, STRUMILLO J, Z. J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. **Nature**, v. 493, p. 181–86, 2013.
 - MORRIS A.C., EGGLESTON, P., C. J. M. Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. **Med. Vet. Entomol.**, v. 3, p. 1–7, 1989.
 - MOSKALYK LA, OO MM, J.-L. M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Mol Biol.**, v. 5, n. 4, p. 261–8, 1996.
 - MUTHUKRISHNAN S, MERZENDORFER H, A.; YANG Q. Chitin Metabolic Pathways in Insects and Their Regulation. In: COHEN E, M. B. (Ed.). . **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**. Switzerland: Springer Nature, 2016. p. 31–57.
 - NENE V, WORTMAN JR, LAWSON D, HAAS B, KODIRA C, TU ZJ, LOFTUS B, XI Z, MEGY K, GRABHERR M, REN Q, ZDOBNOV EM, LOBO NF, CAMPBELL KS, BROWN SE, BONALDO MF, ZHU J, SINKINS SP, HOGENKAMP DG, AMEDEO P, ARENSBURGER P, ATKINSON PW, BIDWELL S, BIEDLER J, BIRNEY E, S. D. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723., 2007.
 - NEWMARK, P.A., REDDIEN, P.W., CEBRIA, F. ALVARADO, S. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. **Proceeding of National Academic of Science of USA**, 2003.
 - NGUYEN, T. K. T.; NGUYEN, N. A. T.; KHAU, M. T. ET AL. Epidemiological Analysis of Deaths Associated with Dengue Haemorrhagic Fever in Southern Viet

Nam in 1999-2000. **Dengue Bulletin**, v. 25, 2001.

- NISHIOKA, T.,FUJITA, T.,KAMOSHITA, K. ET AL. Mechanism of inhibition reaction of acetylcholinesterase by phenyly Nmethylcarbamates. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 7, p. 107–121, 1977.
- NITA M, WANG HB, ZHONG YS, MITA K, IWANAGA M, K. H. Analysis of ecdysonepulse responsive region of BMWCP2 in wing disc of Bombyx mori . **Comp Biochem Physiol B**, v. 153, p. 101–108, 2009.
- PACCA CC, MARQUES RE, ESPINDOLA WPJ, OLIVEIRA FILHO GBO, LIMA-LEITE AC, TEIXEIRA MM, N. M. Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 381–387, 2017.
- PARIS M, TETREAU G, LAURENT F, LELU M, DESPRES L, D. J.-P. Persistence of Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest Manag Sci**, v. 67, p. 122–128, 2011.
- PASCOA V, OLIVEIRA PL, DANSA-PETRETSKI M, SILVA JR, ALVARENGA PH, JACOBS-LORENA M, L. F. Aedes aegypti peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 32, n. 5, p. 517–23, 2002.
- PELLETIER J, GUIDOLIN A, SYED Z, CORNEL AJ, L. W. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. **J Chem Ecol.**, v. 36, n. 3, p. 245–8, 2010.
- PHANSE Y, DUNPHY BM, PERRY JL, AIRS PM, PAQUETTE CC, CARLSON JO, XU J, LUFT JC, DESIMONE JM, BEATY BJ, B. L. Biodistribution and Toxicity Studies of PRINT Hydrogel Nanoparticles in Mosquito Larvae and Cells. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 5, p. e0003735, 2015.
- PIGOTT CR. AND ELLAR DJ. Role of Receptors in Bacillus thuringiensis Crystal Toxin Activity. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEW**, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007.
- PIZZATTI L, BINATO R, COFRE J, GOMES BE, DOBBIN J, HAUSSMANN ME, D’AZAMBUJA D, BOUZAS LF, A. E. SUZ12 is a candidate target of the non-canonical WNT pathway in the progression of chronic myeloid leukemia. **Genes Chromosomes Cancer.**, v. 49, n. 2, p. 107–18, 2010.
- POH AH, MOGHAVVEMI M, LEONG CS, L.; YL, SAFDARI GHANDARI A, APAU A, ET AL. Collective behavior quantification on human odor effects against female Aedes aegypti mosquitoes—Open source development. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171555, 2017.
- POWELL JR, T. W. History of domestication and spread of Aedes aegypti - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 11–17, 2013.
- POWERS AM, BRAULT AC, TESH RB, ET AL. Reemergence of Chikungunya and O’nyong-nyong viruses: evidence for distinctgeographical lineages and distant evolutionary relationships. **JGen Virol.**, v. 1, p. 471---9, 2000.

- PRICE DR, G. J. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 7, p. 393–400., 2008.
- RAFFERTY E, DUCLOS P, YACTAYO S, S. M. Risk of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease among the elderly: a systematic review. **Vaccine**, v. 31, n. 49, p. 5798–805, 2013.
- RANSON H. AND HEMINGWAY J. Mosquito glutathione transferases. **Methods Enzymol.**, v. 401, p. 226–241, 2005.
- RAUSCH K, HACKETT B, WEINBREN N, REEDER S, SADOVSKY Y, HUNTER C, SCHULTZ DC, COYNE C, C. S. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against Zika virus. **Cell Reports**, v. 18, n. 3, p. 804–815, 2017.
- RIVERO A., VEZILIER J., WEILL M., R. A. F. AND G. S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1001000., 2010.
- ROIGNANT JY. CARRE C., MUGAT B, SZYMZAC D. LEPESANT JA., A. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. **RNA**, v. 9, p. 299–308, 2003.
- ROUSSET F., BRAIG H.R., O. S. L. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. **Heredity**, v. 82, p. 620–627., 1999.
- RUEDA L.M., PATEL K.J., A. R. C. Efficacy of encapsulated *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae in artificial containers. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 6, p. 694–699, 1990.
- RYTLEWSKI JA, B. S. RNAi in the mouse: rapid and affordable gene function studies in a vertebrate system. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v. 4, n. 1, p. 45–57., 2015.
- SANAD M.M., SHAMSELDEAN M.S.M., ELGINDI A.-E.Y., G. R. Host penetration and emergence patterns of the mosquito-parasitic mermithids *Romanomermis iyengari* and *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). 2013, 45., **J. Nematol.**, v. 45, p. 30–38., 2013.
- SCHOLTE E.J., KNOLS B.G., SAMSON R.A., TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **J. Insect Sci.**, v. 4, p. 19, 2004.
- SCHWARZ, D. S., HUTVAGNER, G., HALEY, B., ZAMORE, P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. **Mol.Cell**, v. 10, p. 537–548, 2002.
- SCOTT J.G, MICHEL K., B. L. ET AL. Towards the elements of successful insect RNAi. **J Insect Physiol**, v. 59, n. 12, p. 10.1016/j.jinsphys.2013.08.014., 2013.
- SEMIZAROV, D., FROST, L., SARTHY, A., KROEGER, P., HALBERT, D. N., FESIK, S. W. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. **Proc. Natl. Acad. Sci. A**, v. 27, p. 6347–6352., 2003.

- SERUFO, JC., OCA, HM., T. V. A. ET AL. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 503–504, 1993.
- SHIU PK. AND HUNTER CP. Early Developmental Exposure to dsRNA Is Critical for Initiating Efficient Nuclear RNAi in *C. elegans*. **Cell Reports**, v. 18, p. 2969–2978, 2017.
- SHUKLAA J.N, KALSIA M., S. A. ET AL. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA BIOLOGY**, v. 13, n. 7, p. 656–669, 2016.
- SIJEN T, FLEENOR J, SIMMER F, THIJSEN KL, PARRISH S, TIMMONS L, PLASTERK RH, F. A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell.**, v. 107, n. 4, p. 465–76., 2001.
- SINGH AD, WONG S, RYAN CP, W. S. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. **J Insect Sci.**, v. 13, p. 69, 2013.
- SKUSE, F. A. A. The banded mosquito of Bengal. **Indian Mus. Notes**, v. 30, n. 20, 1894.
- SLATKO BE, LUCKA AN, DOBSONB SL, F. J. Wolbachia endosymbionts and human disease control. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 195, p. 88–95, 2014.
- SOUZA-FERREIRA P.S., MANSUR J. F., BERNI M., M. M. F. Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: The reduction of CHS transcripts by CHS-dsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, p. 101–109, 2014.
- STALINSKI R, LAPORTE F, TETREAU G, D. L. Receptors are affected by selection with each *Bacillus thuringiensis israelensis* cry toxin but not with the full Bti mixture in *Aedes aegypti*. **Infection, Genetics and Evolution**, 2016.
- STONE B. F. AND BROWN A. W. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. **Bull World Health Organ**, v. 40, p. 401–408, 1969.
- SURAKASI VP, MOHAMED AA, K. Y. RNA interference of $\beta 1$ integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **J Insect Physiol.**, v. 57, n. 11, p. 1537–44, 2011.
- SWAMY M.N, WU H., S. P. Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.
- TABACHNICK WJ. Evolutionary genetics and arthropod-borne dis-ease: the yellow fever mosquito. **American Entomologist**, v. 37, p. 14–26, 1991.
- TABASHNIK BE, MOTA-SANCHEZ D, WHALON ME, HOLLINGWORTH RM, C. Y. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **J Econ Entomol.**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 2014.

- TARACENA ML, OLIVEIRA PL, A. O.; UMAÑA C, LOWENBERGER C, DOTSON EM, ET AL. Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003358., 2015.
- TASEI, J. N. Effects of insect growth regulators on honey bees and non-Apis bees: A review. **Apidologie**, v. 32, p. 527–545, 2001.
- TELLAM R.L., VUOCOLO T., JOHNSON S. E., JARMEY J., P. R. D. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 6025–42, 2000.
- TERENIUS ET AL. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **J Insect Physiol.**, v. 57, n. 2, p. 231–45, 2011.
- TETREAU G, STALINSKI R, KERSUSAN D, VEYRENC S, DAVID JP, REYNAUD S, D. L. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 23, p. 8362–8367, 2012.
- THOMAS RE. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease: current perspectives. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3345–3353, 2016.
- TOMOYASU Y., MILLER S.C., T. S. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, 2008.
- TURNER M.L., SCHNORFEIL F.M., B. T. MicroRNAs Regulate Dendritic Cell Differentiation and Function. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 3911–3917, 2011.
- VAN EKERT E, POWELL CA, SHATTERS RG JR, B. D. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid methyl transferase. **J Insect Physiol.**, v. 70, p. 143–50., 2014.
- VILLANI F. AND HEMINGWAY J. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 27, p. 218–228, 1987.
- VILLAR L, DAYAN GH, ARREDONDO-GARCIA JL, RIVERA DM, CUNHA R, DESEDA C, ET AL. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **N Engl J Med**, 2014.
- VILLELA, E. F. DE M. **Dengue na mídia: Tudo aquilo que você não vê**. Jundiaí: [s.n.].
- WANG CH.,HWANG JS., L. J. Preliminary study on the biological control of dengue vectors by fish in Liochyau Prefecture, Pingtung Country, Taiwan. **Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi**, v. 6, p. 382–388, 1990.
- WANG P., G. R. . Molecular structure of peritrophic membrane (PM): identification of potential target sites for insects control. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 47, p.

110–18, 2000.

- WANG Y, FAN HW, HUANG HJ, XUE J, WUWJ, ET AL. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, p. 637–46, 2012.
- WHELAN JA., RUSSELL NB., W. M. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 278, p. 261–269, 2003.
- WHITEHORN J, KIEN DTH, NGUYEN NM, NGUYEN HL, K. P.; LB, C. ET. AL. Comparative Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to Dengue Virus Infection After Feeding on Blood of Viremic Humans: Implications for Public Health. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p. 1182–90, 2015.
- WHO/PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. Regional Zika Epidemiological Update --- 23 June 2016. **Washington, DC: WHO/PAHO**, 2016.
- WHYARD S, SINGH AD, W. S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 39, n. 11, p. 824–32., 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics**. Geneva: WHO, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH, TRAINING IN TROPICAL DISEASES, ET AL. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. **WHO**, v. Geneva, 2009.
- X., ZHANG, KESHAVA M., F. E. Chitosan/Interfering RNA Nanoparticle Mediated Gene Silencing in Disease Vector Mosquito Larvae. **Journal of Visualized Experiments**, v. 97, p. 3–15, 2015.
- YANG WJ, XU KK, CONG L, W. J. Identification, mRNA expression, and functional analysis of chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 9, p. 331–42, 2013.
- ZERBA, E. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. **Parasitology Today**, v. 4, p. 53–57, 1988.
- ZHANG X, ZHANG J, PARK Y, Z. K. Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, p. 674–82, 2012.
- ZHANG X, ZHANG J, Z. K. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Mol Biol.**, v. 19, n. 5, p. 683–93., 2010.
- ZHU KY., MERZENDORFER H., ZHANG W., Z. J.; S., M. Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 61, p. 177–96, 2016.

- ZIMOCH L.; MERZENDORFER H. Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. **Cell and Tissue Research**, v. 308, p. 287–297, 2002.
- AGRAWAL N, DASARADHI PV, MOHMMED A, MALHOTRA P, BHATNAGAR RK, M. S. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 67, n. 4, p. 657–85., 2003.
- AIRS PM, B. L. RNA Interference for Mosquito and Mosquito-Borne Disease Control. **Insects.**, v. 8, n. 1, 2017.
- ALDRIDGE, A. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl pnitrophenyl thiophosphate and analogs. **Biochem. J.**, v. 46, p. 451–460, 1950.
- ALKHAIBARI A.M.,CAROLINO A.T.,YAVASOGLU, S.I., ET AL. Metarhizium brunneum blastospore pathogenesis in Aedes aegypti larvae: Attack on several fronts accelerates mortality. **PLoS Pathog.**, v. 12, p. e1005715, 2016.
- ALVARENGA, E. S. L. et al. Chitin is a component of the Rhodnius prolixus midgut. **Insect biochemistry and molecular biology**, 2015.
- AMUZU HE, M. E. Wolbachia-Based Dengue Virus Inhibition Is Not Tissue-Specific in Aedes aegypti. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 11, p. e0005145, 2016.
- ARAKANE, Y. et al. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, Tribolium castaneum, and alternate exon usage in one of the genes during development. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 3, p. 291–304, 2004.
- ARAKANE, Y. et al. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, Tribolium castaneum. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 10, p. 959–962, 2008.
- ARAKANEY,MUTHUKRISHNAN S, BEEMANRW,KANOSTMR, K. K. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **PNAS**, v. 102, p. 11337–42, 2005.
- ARAÚJO, W. S. A importância de fatores temporais para a distribuição de insetos herbívoros em sistemas Neotropicais. **Revista da Biologia**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2013.
- ARMSTRONG N., HOU W., T. Q. Biological and Historical Overview of Zika Virus. **World J Virol** , v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017.
- ASHFAQ M, SONODA S, T. H. Developmental and tissue-specific expression of CHS1 from Plutella xylostella and its response to chlorfluazuron. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 89, p. 20–30, 2007.
- ATTASART P., NAMRAMOON O., KONGPHOM U., CHIMWAI C., P. S. Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. **Virus Research**, v. 1, n. 1, p. 252–256, 2013.
- ATTAWAY DF., WATERS NM., GERAGHTY E.M., J. K. Zika virus: Endemic and epidemic ranges of Aedes mosquito transmission. **Journal of Infection and Public**

Health, v. 10, p. 120—123, 2017.

- AVELINO-SILVA VI, MIYAJI KT, H. P.; HUANG Y, SIMOES M, LIMA SB, ET AL. CD4/ Fever, CD8 Ratio and KT Ratio Predict Yellow Patients., Vaccine Immunogenicity in HIV-Infected. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 12, 2016.
- BALAKRISHNA PILLAI A., U. NAGARAJAN U., M. A. ET AL. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. **Insect Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 127–139, 2017.
- BASHIR H., A. N.; KHAN M.A., ZAFAR A., USMAN T., SAAD K., MUHAMMAD I.K., F. H. T. Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1–7, 2015.
- BEATY, B.J. AND MARQUARDT, W. C. The biology of diseases vectors. **University Press of Colorado**, 1996.
- BELLINATO DF, VIANA-MEDEIROS PF, A. S. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian Aedes aegypti Populations. **Biomed Res Int.**, 2016.
- BELTRÁN-SILVA, S.L. CHACÓN-HERNÁNDEZ, S.S. MORENO-PALACIOS E., P.-M. J. Á. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. **Rev Med Hosp Gen Méx.**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2016.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BLAIR, C. D. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. **Future Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 265–277, 2011.
- BORGHERINI G, POUBEAU P, STAIKOWSKY F, ET AL. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clin Infect Dis.**, v. 44, p. 1401–7, 2007.
- BRAGA, I.A. AND VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.
- BRETON C, MUCHA J, J. C. Structural and functional features of glycosyltransferases. **Biochimie.**, v. 83, n. 8, p. 713–8., 2001.
- BROGDON, W.G. E MCALLISTER, J. C. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, 1998.
- BUSVINE J. R. Cross and multiple resistance in mosquitoes. **Cah O.R.S.T.O.M; ser Ent. Med**, v. 6, p. 215–219, 1968.
- BUTT T.M., GREENFIELD B.P., GREIG C., MAFFEIS T.G., ET AL. Metarhizium anisopliae pathogenesis of mosquito larvae: A verdict of accidental death. **PLoS ONE**, v. 8, p. e81686, 2013.

- CALVEZ E, GUILLAUMOT L, MILLET L, M. J.; BOSSIN H, RAMA V, ET AL. Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004374, 2016.
- CANTON P.E., CANCINO-RODEZNO A., GILL S.S., SOBERON M., B. A. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1–17, 2015.
- CAO-LORMEAU VM, BLAKE A, MONS S, ET AL. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, p. 1531–9, 2016.
- CAPEPING MR, TRAN NH, HADINEGORO SR, ISMAIL HI, CHOTPITAYASUNONDH T, C.; MN, ET AL. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 384., p. 1358–65, 2014.
- CARTHEW R.W., AND S. E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, p. 642–655, 2009.
- CASIDA, J.E. AND QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide: Past, present, or Future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 1–16, 1998.
- CATTERUCCIA F, L. E. RNAi in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Methods Mol Biol**, v. 555, p. 63–75, 2009.
- CHEN D, GUO R, X. X. ET AL. Uncovering the immune responses of *Apis mellifera ligustica* larval gut to *Ascospaera apis* infection utilizing transcriptome sequencing. **Gene**, 2017.
- CHI, J. T., CHANG, H. Y., WANG, N. N., CHANG, D. S., DUNPHY, N., BROWN, P. O. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v. 100, p. 6343–6346., 2003.
- CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction**. [s.l: s.n.].
- COATS, J. R. Mechanisms of Toxic Action and Structure- Activity Relationships for Organochlorine and Synthetic Pyrethroid Insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 255–262, 1990.
- CONSOLI ROTRAUT AGB, O. R. L. **Principais mosquitos de importancia sanitária no Brasil**. [s.l: s.n.].
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 1988.
- COUTINHO P.M.; DELEURY E.; DAVIES G.J.; HENRISSAT B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, p. 307–317, 2003.
- D., B. RNA silencing. **Current Biology**, v. 12, n. 3, 2002.

- DAME D.A., CURTIS C.F., BENEDICT M.Q., ROBINSON, A.S., K. B. . Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. **Malar. J.**, v. 8, p. S2–S11., 2009.
- DARBRO J.M., JOHNSON P.H., THOMAS M.B., RITCHIE S.A., KAY B.H, R. P. A. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 86, p. 656–664, 2012.
- DENNIS, C. The brave new world of RNA. **Nature**, v. 418, p. 122–124., 2002.
- DESPRÉS L, STALINSKI R, TETREAU G, PARIS M, BONIN A, NAVRATIL V, REYNAUD S, D. J. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. **BMC Genomics**, v. 15, n. 926, p. 2–13, 2014.
- DIAMON MS, P. T. Molecular insight into dengue viruspathogenesis and its implications for disease control. **Cell**, v. 162, p. 488---92., 2015.
- DONALÍSIO, MR AND GLASSER, C. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 259–272, 2002.
- ECONOMOPOULOU A, DOMINGUEZ M, HELYNCK B, ET AL. AtypicalChikungunya virus infections: clinical manifestations, mortal-ity and risk factors for severe disease during the 2005---2006outbreak on Réunion. **Epidemiol Infect.**, v. 137, p. 534---41, 2009.
- EINSFELDT, K. **Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco.** [s.l: s.n.].
- EL-SHESHENY I, HAJERI S, EL-HAWARY I, GOWDA S, K. N. Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. **PLoS One.**, v. 8, n. 5, p. e65392., 2013.
- ELLIOT M., FARNHAM A.W., J. N. F. ET AL. Potent pyrethroid insecticides from modified cyclopropan acids. **Nature**, p. 244–456, 1973.
- ERDELYAN CN1, MAHOOD TH, BADER TS, W. S. Functional validation of the carbon dioxide receptor genes in *Aedes aegypti* mosquitoes using RNA interference. **Insect Mol Biol.**, v. 1, p. 119–27, 2012.
- FABRITIUS HO, ZIEGLER A, FRIÁK M, NIKOLOV S, HUBER J, SEIDL BH, RUANGCHAI S, ALAGBOSO FI, KARSTEN S, LU J, JANUS AM, PETROV M, ZHU LF, HEMZALOVÁ P, HILD S, RAABE D, N. J. Functional adaptation of crustacean exoskeletal elements through structural and compositional diversity: a combined experimental and theoretical study. **Bioinspir Biomim.**, v. 11, n. 5, p. 055006., 2016.
- FEYEREISEN R. Evolution of insect P450. **Biochem Soc Trans**, v. 34, p. 1252–1255, 2006.
- FFRENCH-CONSTANT R.H., PITTENDRIGH B., V. A. ET AL. Why are there so

few resistance-associated mutations in insecticide target genes? **Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B**, v. 353, p. 1685–1693, 1998.

- FIGUEIRA-MANSUR J., F.-P. A. et al. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. **Insect Molecular Biology**, v. 22, n. 6, p. 648–658, 2013.
- FINNEGAN, J. E., MARGIS, R., WATERHOUSE, P. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* carpel factory (*DICER-LIKE1*) mutant, homolog of *Dicer-1* from *Drosophila*. **Curr. Biol**, v. 13, p. 236–240., 2003.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806–811., 1998.
- FISCHER J.R, ZAPATA F., D. S. ET AL. Aquatic fate of a dsRNA in a sediment water system following an over-water application. **Environ Toxicol Chem**, 2016.
- FLEGR J. A Rapid Method for Isolation of Double Stranded RNA. **PREPARATIVE BIOCHEMISTRY**, v. 17, n. 4, p. 423–433, 1987.
- FLORCZAK-WYSPIAŃSKA J., NAWOTCZYŃSKA E., K. W. Yellow fever vaccine-associated neurotropic disease (YEL-AND) – A case report. **neurologia i neurochirurgia polska**, v. xxx, p. xxx–xxx, 2016.
- FOCKS DA. Toxorhynchites as biocontrol agents. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 23, n. 2, p. 118–27., 2007.
- FORATTINI OP. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. Edusp ed. São Paulo: [s.n.].
- FRANZ AW, SANCHEZ-VARGAS I, RABAN RR, BLACK WC , JAMES AA, O. K. Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically diverse *Aedes aegypti* strain. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 5, p. e2833., 2014.
- FRIEDMAN JM, J. P. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. **Swiss Med Wkly.**, v. 139, n. 33–34, p. 466–72., 2009.
- FU G., LEES R.S., NIMMO, D., ET AL. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 4550–4554., 2010.
- FUKUTO, T. R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245–254, 1990.
- GÉRARDIN P, SAMPÉRIZ S, RAMFUL D, ET AL. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child chikungunyavirus infection: the CHIMERE cohort study on Reunion Island. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, p. e2996, 2014.
- GOMES B, PURKAIT B, DEB RM, RAMA A, SINGH RP, FOSTER GM, COLEMAN M, KUMAR V, PAINE M, DAS P, W. D. Knockdown resistance mutations predict DDT resistance and pyrethroid tolerance in the visceral

- leishmaniasis vector *Phlebotomus argentipes*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11, n. 4, p. e0005504, 2017.
- GOMEZ I, SÁNCHEZ J, CARLOS MUÑOZ-GARAY C, MATUS V, SARJEET S. GILL SS., S. M. AND B. A. Bacillus thuringiensis Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochem. J.**, v. 459, p. 383–396, 2014.
 - GORMAN, K., YOUNG, J., PINEDA L., ET AL. Short-term suppression of *Aedes aegypti* using genetic control does not facilitate *Aedes albopictus*. **Pest Manag. Sci.**, v. 72, p. 618–628, 2016.
 - GORMAN MJ, A. Y. Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p. 267–73, 2010.
 - GRISHOK A., PASQUINELLI A. E., CONTE D.L, LI N., PARRISH S., HA I., BAILLIE D. L., FIRE A., RUVKUN G., M. C. C. Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. **Cell**, v. 106, p. 23–34, 2001.
 - GROSSHANS, H., SLACK, F. J. Micro-RNAs: small is plentiful. **J. Cell. Biol.**, v. 156, n. 1, p. 17–22, 2001.
 - GUZMAN D.R., A. R. . . Population dynamics of *Culex quinquefasciatus* and the fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in stagnant water pools. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 3, p. 442–449, 1987.
 - HAUGEN M, TOMCHANEY M, KAST K. Whole-mount in situ hybridization for analysis of gene expression during *Aedes aegypti* development. **Cold Spring Harb Protoc.**, v. 10, 2010.
 - HEMINGWAY, J. AND RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annu. Rev. Entomol**, v. 45, p. 371–391, 2000.
 - HEMINGWAY J. AND KARUNARATNE S. H. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Med Vet Entomol**, v. 12, p. 1–12, 1998.
 - HENRIQUES BS, GENTA FA, MELLO CB, SILVA LR, CODOGNO TF, OLIVEIRA AF, MARINHO LP, VALLE D, LIMA JB, FEDER D, GONZALEZ MS, A. P. Triflumuron Effects on the Physiology and Reproduction of *Rhodnius prolixus* Adult Females. **Biomed Res Int.**, 2016.
 - HERTIG M., W. S. B. Studies on Rickettsia-like micro-organisms in insects. **J. Med. Res.**, v. 44, p. 329–374., 1924.
 - HOFFMANN A.A., MONTGOMERY B.L., POPOVICI J., ITURBE-ORMAETXE I., ET AL. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, p. 454–457, 2011.
 - HOGENKAMP DG, ARAKANE Y, ZIMOCH L, MERZENDORFER H, KRAMER KJ, ET AL. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-

- specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 529–40, 2005.
- HOLL SM, SCHAEFER J, GOLDBERG WM, KRAMER KJ, MORGAN TD, H. T. Comparison of black coral skeleton and insect cuticle by a combination of carbon-13 NMR and chemical analyses. **Arch Biochem Biophys.**, v. 292, n. 1, p. 107–11, 1992.
 - HOPKINS TL. HARPER MS. Lepidopteran peritrophic membranes and effects on dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 47, p. 100–109, 2001.
 - HORODYSKI FM, R. L. Expression and hormonal control of a new larval cuticular multigene family at the onset of metamorphosis of the tobacco hornworm. **Dev Biol**, v. 132, p. 292–303, 1989.
 - HUVENNE H., S. G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227–235, 2010.
 - IBRAHIM G.H., SMARTT C.T., KILEY L.M., C. B. M. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, p. 1213– 1222, 2000.
 - IP, G. et al. Consumer Willingness to Pay for Dengue Vaccine (CYD-TDV, Dengvaxia R) in Brazil; Implications for Future Pricing Considerations. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 41, p. 1–9, 2017.
 - ISOE J, RASCÓN AA JR, KUNZ S, M. R. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 39, n. 12, p. 903–12., 2009.
 - IWASAKI Y.W., SIOMI MC., S. H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 84, p. 25.1–25.29, 2015.
 - JAVELLE E, RIBERA A, DEGASNE I, ET AL. Specific management of Post Chikungunya Rheumatic Disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006---2012. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, p. e0003603., 2015.
 - JOGA MR, ZOTTIMJ, S.; CHRISTIAENSO. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. **Front. Physiol**, v. 7, n. 553, 2016.
 - KANAKALA S, G. M. RNA Interference in Insect Vectors for Plant Viruses. **Viruses.**, v. 8, n. 12, 2016.
 - KATO N, MUELLER CR, FUCHS JF, WESSELY V, LAN Q, C. B. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2006.
 - KERWIN J.L., W. R. K. Ground and aerial application of the asexual stage of *Lagenidium giganteum* for control of mosquitoes associated with rice culture in the central valley of California. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 3, p. 59–64, 1987.

- KHOO CC, DOTY JB, HEERSINK MS, OLSON KE, F. A. ransgene-mediated suppression of the RNA interference pathway in *Aedes aegypti* interferes with gene silencing and enhances Sindbis virus and dengue virus type 2 replication. **Insect Mol Biol.**, v. 22, n. 1, p. 104–14., 2013.
- KIM VN., HAN J., S. M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Post-tRANscRiPtioNAl coNtRol**, v. 10, p. 126–139, 2009.
- KISTLER K.E., VOSSHALL L.B., M. B. J. Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. **Cell Reports**, v. 11, p. 51–60, 2015.
- KOGA, R. T. T. AND F. T. Quenching autofluorescence of insect tissues for in situ detection of endosymbionts. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 44, n. 2, p. 281–291, 2009.
- KRAMER K. J. AND MUTHUKRISHNA N, S. Chitin metabolism in insects: a revisit. In: GILBERT L., I, IATROU K., AND GILL, S. (Ed.). . **Comprehensive Molecular Insect Science**. [s.l.] Elsevier Press, Oxford, UK, 2005.
- KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, S. E. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol.**, v. 305, n. 3, p. 567–80., 2001.
- KUMAR G, SINGH RK, PANDE V, D. R. Impact of container material on the development of *Aedes aegypti* larvae at different temperatures. **J Vector Borne Dis.**, v. 53, n. 2, p. 144–8, 2016.
- LABRECQUE G.C., BOWMAN M.C., PATTERSON R.S., S. J. A. Persistence of thiotepa and tepa in pupae and adults of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. **Bull. World Health Organ.**, v. 47, p. 675–676, 1972.
- LAWLER SP. Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 139, p. 335–343, 2017.
- LIU YC, CHEN WL, KUNG WH, H. H. Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi. **BMC Genomics**, v. 18, n. 2, p. 2–6, 2017.
- LIVAK K.J., S. T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method. Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.
- LOPES J., L. A. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. Coletas ao longo do leito de ribeirão. **Rev. Saúde Públ., São Paulo**, v. 29, n. 3, p. 183–191, 1995.
- LOPEZ-MARTINEZ G, MEUTI M, D. D. Rehydration driven RNAi: a novel approach for effectively delivering dsRNA to mosquito larvae. **J Med Entomol.**, v. 49, n. 1, p. 215–8., 2012.
- LUMJUAN N., RAJATILEKA S., CHANGSOM D., WICHEER J., LEELAPAT P., P. L. A. ET AL. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resist-ance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect Biochem MolBiol**,

v. 41, p. 203–209., 2011.

- MAJEROWICZ D, HANNIBAL-BACH HK, CASTRO RS, BOZAQUEL-MORAIS BL, ALVES-BEZERRA M, GRILLO LA, MASUDA CA, FÆRGEMAN NJ, KNUDSEN J, G. K. The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: Expression, characterization and function of RpACBP-1. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 72, p. 41–52, 2016.
- MATHENGE E. M, GIMNIG J. E., KOLCZAK, M. ET AL. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J Med Entomol**, v. 38, p. 531–536, 2001.
- MBOGO C. N., BAYA N. M., O. A. V. ET AL. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. **Med Vet Entomol**, v. 10, p. 251–259, 1996.
- MCGRANE V., CARLSON J.O., MILLER B.R., B. B. J. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, p. 502–510, 1988.
- MEHENDALE, S. M.; RISBUD, A.R.; RAO, J. A. ET AL. Outbrake of dengue fever in rural areas of Parhani district of Maharashtra (India). **Ind. J. Med Res**, v. 93, p. 6–11, 1991.
- MENDES AM, AWONO-AMBENE PH, NSANGO SE, COHUET A, FONTENILLE D, KAFATOS FC, CHRISTOPHIDES GK, MORLAIS I, V. D. Infection intensity-dependent responses of *Anopheles gambiae* to the African malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun.**, v. 79, n. 11, p. 4708–15, 2011.
- MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **Eur J Cell Biol.**, v. 90, n. 9, p. 759–69, 2011.
- MERZENDORFER H. Insect chitin synthases: a review. **J. Comp. Physiol. B**, v. 176, p. 1–15, 2006.
- MERZENDORFER H. The celular basis of chitin sythesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, p. 759–769, 2011.
- MERZENDORFER H, Z. L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J Exp Biol.**, v. 24, p. 4393–412., 2003.
- METCALF, R. L. No Title. **Structure-activity relationships for insecticidal carbamates**, v. 44, p. 43–78, 1971.
- MEYER-FERNANDES J. R., ARRESE E. L., W. M. A. Allosteric effects and trehalose protect larval *Manduca sexta* fat body glycogen phosphorylase B against thermal denaturation. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, v. 30, p. 473–478, 2000.
- MILANI R. Genetical aspects of insecticide resistance. **Bull World Health Org**, p. 77–87, 1963.

- MILLER MM, POPOVA LB, M. E. ET AL. The invertebrate B(0) system transporter, D. melanogaster NAT1, has unique d-amino acid affinity and mediates gut and brain functions. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 38, n. 10, p. 923–31., 2008.
- MILLERL.H., SAKAI R.K., ROMANS P., GWADZ R.W., ET AL. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 237, p. 779–781., 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor. In: BRASÍLIA (Ed.). . **Manual de normas técnicas**. 3. ed. [s.l.] Ministério da saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001. p. 84.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2010.
- MITRI C, MARKIANOS K, GUELBEOGO WM, ET AL. The kdr-bearing haplotype and susceptibility to *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*: genetic correlation and functional testing. **Malar J.**, v. 14, p. 391, 2015.
- MOREIRA J, PEIXOTO TM, MACHADO DE SIQUEIRA A, L. C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, p. doi: 10.1016/j.cmi.2016.12.027., 2017.
- MOREIRA MF, DOS SANTOS AS, MAROTTA HR, MANSUR JF, RAMOS IB, MACHADO EA, SOUZA GH, EBERLIN MN, KAISER CR, KRAMER KJ, MUTHUKRISHNAN S, V. A. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 37, n. 12, p. 1249–61, 2007.
- MORGAN JL, STRUMILLO J, Z. J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. **Nature**, v. 493, p. 181–86, 2013.
- MORRIS A.C., EGGLESTON, P., C. J. M. Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. **Med. Vet. Entomol.**, v. 3, p. 1–7, 1989.
- MOSKALYK LA, OO MM, J.-L. M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Mol Biol.**, v. 5, n. 4, p. 261–8, 1996.
- MUTHUKRISHNAN S, MERZENDORFER H, A.; YANG Q. Chitin Metabolic Pathways in Insects and Their Regulation. In: COHEN E, M. B. (Ed.). . **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**. Switzerland: Springer Nature, 2016. p. 31–57.
- NENE V, WORTMAN JR, LAWSON D, HAAS B, KODIRA C, TU ZJ, LOFTUS B, XI Z, MEGY K, GRABHERR M, REN Q, ZDOBNOV EM, LOBO NF, CAMPBELL KS, BROWN SE, BONALDO MF, ZHU J, SINKINS SP, HOGENKAMP DG, AMEDEO P, ARENSBURGER P, ATKINSON PW, BIDWELL S, BIEDLER J, BIRNEY E, S. D. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723., 2007.
- NEWMARK, P.A., REDDIEN, P.W., CEBRIA, F. ALVARADO, S. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. **Proceeding of National Academic of Science of USA**, 2003.
- NGUYEN, T. K. T.; NGUYEN, N. A. T.; KHAU, M. T. ET AL. Epidemiological

Analysis of Deaths Associated with Dengue Haemorrhagic Fever in Southern Viet Nam in 1999-2000. **Dengue Bulletin**, v. 25, 2001.

- NISHIOKA, T.,FUJITA, T.,KAMOSHITA, K. ET AL. Mechanism of inhibition reaction of acetylcholinesterase by phenyl N-methylcarbamates. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 7, p. 107–121, 1977.
- NITA M, WANG HB, ZHONG YS, MITA K, IWANAGA M, K. H. Analysis of ecdysone pulse responsive region of BMWCP2 in wing disc of *Bombyx mori*. **Comp Biochem Physiol B**, v. 153, p. 101–108, 2009.
- PACCA CC, MARQUES RE, ESPINDOLA WPJ, OLIVEIRA FILHO GBO, LIMA-LEITE AC, TEIXEIRA MM, N. M. Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 381–387, 2017.
- PARIS M, TETREAU G, LAURENT F, LELU M, DESPRES L, D. J.-P. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest Manag Sci**, v. 67, p. 122–128, 2011.
- PASCOA V, OLIVEIRA PL, DANSA-PETRETSKI M, SILVA JR, ALVARENGA PH, JACOBS-LORENA M, L. F. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 32, n. 5, p. 517–23, 2002.
- PELLETIER J, GUIDOLIN A, SYED Z, CORNEL AJ, L. W. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. **J Chem Ecol.**, v. 36, n. 3, p. 245–8, 2010.
- PHANSE Y, DUNPHY BM, PERRY JL, AIRS PM, PAQUETTE CC, CARLSON JO, XU J, LUFT JC, DESIMONE JM, BEATY BJ, B. L. Biodistribution and Toxicity Studies of PRINT Hydrogel Nanoparticles in Mosquito Larvae and Cells. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 5, p. e0003735, 2015.
- PIGOTT CR. AND ELLAR DJ. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEW**, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007.
- PIZZATTI L, BINATO R, COFRE J, GOMES BE, DOBBIN J, HAUSSMANN ME, D'AZAMBUJA D, BOUZAS LF, A. E. SUZ12 is a candidate target of the non-canonical WNT pathway in the progression of chronic myeloid leukemia. **Genes Chromosomes Cancer.**, v. 49, n. 2, p. 107–18, 2010.
- POH AH, MOGHAVVEMI M, LEONG CS, L.; YL, SAFDARI GHANDARI A, APAU A, ET AL. Collective behavior quantification on human odor effects against female *Aedes aegypti* mosquitoes—Open source development. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171555, 2017.
- POWELL JR, T. W. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 11–17, 2013.
- POWERS AM, BRAULT AC, TESH RB, ET AL. Reemergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant

- evolutionary relationships. **JGen Virol.**, v. 1, p. 471---9, 2000.
- PRICE DR, G. J. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 7, p. 393–400., 2008.
 - RAFFERTY E, DUCLOS P, YACTAYO S, S. M. Risk of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease among the elderly: a systematic review. **Vaccine**, v. 31, n. 49, p. 5798–805, 2013.
 - RANSON H. AND HEMINGWAY J. Mosquito glutathione transferases. **Methods Enzymol.**, v. 401, p. 226–241, 2005.
 - RAUSCH K, HACKETT B, WEINBREN N, REEDER S, SADOVSKY Y, HUNTER C, SCHULTZ DC, COYNE C, C. S. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against Zika virus. **Cell Reports**, v. 18, n. 3, p. 804–815, 2017.
 - RIVERO A., VEZILIER J., WEILL M., R. A. F. AND G. S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **PLoS Pathog**, v. 6, p. e1001000., 2010.
 - ROIGNANT JY. CARRE C., MUGAT B, SZYMZAC D. LEPESANT JA., A. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila. **RNA**, v. 9, p. 299–308, 2003.
 - ROUSSET F., BRAIG H.R., O. S. L. A stable triple Wolbachia infection in Drosophila with nearly additive incompatibility effects. **Heredity**, v. 82, p. 620–627., 1999.
 - RUEDA L.M., PATEL K.J., A. R. C. Efficacy of encapsulated *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae in artificial containers. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 6, p. 694–699, 1990.
 - RYTLEWSKI JA, B. S. RNAi in the mouse: rapid and affordable gene function studies in a vertebrate system. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v. 4, n. 1, p. 45–57., 2015.
 - SANAD M.M., SHAMSELDEAN M.S.M., ELGINDI A.-E.Y., G. R. Host penetration and emergence patterns of the mosquito-parasitic mermithids *Romanomermis iyengari* and *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). 2013, 45., **J. Nematol.**, v. 45, p. 30–38., 2013.
 - SCHOLTE E.J., KNOLS B.G., SAMSON R.A., TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **J. Insect Sci.**, v. 4, p. 19, 2004.
 - SCHWARZ, D. S., HUTVAGNER, G., HALEY, B., ZAMORE, P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. **Mol.Cell**, v. 10, p. 537–548, 2002.
 - SCOTT J.G, MICHEL K., B. L. ET AL. Towards the elements of successful insect RNAi. **J Insect Physiol**, v. 59, n. 12, p. 10.1016/j.jinsphys.2013.08.014., 2013.
 - SEMIZAROV, D., FROST, L., SARTHY, A., KROEGER, P., HALBERT, D. N.,

- FESIK, S. W. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. A*, v. 27, p. 6347–6352., 2003.
- SERUFO, JC., OCA, HM., T. V. A. ET AL. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 503–504, 1993.
 - SHIU PK. AND HUNTER CP. Early Developmental Exposure to dsRNA Is Critical for Initiating Efficient Nuclear RNAi in *C. elegans*. **Cell Reports**, v. 18, p. 2969–2978, 2017.
 - SHUKLAA J.N, KALSIA M., S. A. ET AL. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA BIOLOGY**, v. 13, n. 7, p. 656–669, 2016.
 - SIJEN T, FLEENOR J, SIMMER F, THIJSEN KL, PARRISH S, TIMMONS L, PLASTERK RH, F. A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell.**, v. 107, n. 4, p. 465–76., 2001.
 - SINGH AD, WONG S, RYAN CP, W. S. Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. **J Insect Sci.**, v. 13, p. 69, 2013.
 - SKUSE, F. A. A. The banded mosquito of Bengal. **Indian Mus. Notes**, v. 30, n. 20, 1894.
 - SLATKO BE, LUCKA AN, DOBSONB SL, F. J. Wolbachia endosymbionts and human disease control. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 195, p. 88–95, 2014.
 - SOUZA-FERREIRA P.S., MANSUR J. F., BERNI M., M. M. F. Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: The reduction of CHS transcripts by CHS-dsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, p. 101–109, 2014.
 - STALINSKI R, LAPORTE F, TETREAU G, D. L. Receptors are affected by selection with each *Bacillus thuringiensis israelensis* cry toxin but not with the full Bti mixture in *Aedes aegypti*. **Infection, Genetics and Evolution**, 2016.
 - STONE B. F. AND BROWN A. W. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. **Bull World Health Organ**, v. 40, p. 401–408, 1969.
 - SURAKASI VP, MOHAMED AA, K. Y. RNA interference of $\beta 1$ integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **J Insect Physiol.**, v. 57, n. 11, p. 1537–44, 2011.
 - SWAMY M.N, WU H., S. P. Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.
 - TABACHNICK WJ. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. **American Entomologist**, v. 37, p. 14–26, 1991.
 - TABASHNIK BE, MOTA-SANCHEZ D, WHALON ME, HOLLINGWORTH RM,

- C. Y. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **J Econ Entomol.**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 2014.
- TARACENA ML, OLIVEIRA PL, A. O.; UMAÑA C, LOWENBERGER C, DOTSON EM, ET AL. Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003358., 2015.
 - TASEI, J. N. Effects of insect growth regulators on honey bees and non-Apis bees: A review. **Apidologie**, v. 32, p. 527–545, 2001.
 - TELLAM R.L., VUOCOLO T., JOHNSON S. E., JARMEY J., P. R. D. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 6025–42, 2000.
 - TERENIUS ET AL. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **J Insect Physiol.**, v. 57, n. 2, p. 231–45, 2011.
 - TETREAU G, STALINSKI R, KERSUSAN D, VEYRENC S, DAVID JP, REYNAUD S, D. L. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 23, p. 8362–8367, 2012.
 - THOMAS RE. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease: current perspectives. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3345–3353, 2016.
 - TOMOYASU Y., MILLER S.C., T. S. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, 2008.
 - TURNER M.L., SCHNORFEIL F.M., B. T. MicroRNAs Regulate Dendritic Cell Differentiation and Function. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 3911–3917, 2011.
 - VAN EKERT E, POWELL CA, SHATTERS RG JR, B. D. Control of larval and egg development in *Aedes aegypti* with RNA interference against juvenile hormone acid methyl transferase. **J Insect Physiol.**, v. 70, p. 143–50., 2014.
 - VILLANI F. AND HEMINGWAY J. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 27, p. 218–228, 1987.
 - VILLAR L, DAYAN GH, ARREDONDO-GARCIA JL, RIVERA DM, CUNHA R, DESEDA C, ET AL. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **N Engl J Med**, 2014.
 - VILLELA, E. F. DE M. **Dengue na mídia: Tudo aquilo que você não vê**. Jundiaí: [s.n.].
 - WANG CH.,HWANG JS., L. J. Preliminary study on the biological control of dengue vectors by fish in Liochyou Prefecture, Pingtung Country, Taiwan. **Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi**, v. 6, p. 382–388, 1990.

- WANG P., G. R. . Molecular structure of peritrophic membrane (PM): identification of potential target sites for insects control. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 47, p. 110–18, 2000.
- WANG Y, FAN HW, HUANG HJ, XUE J, WU WJ, ET AL. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, p. 637–46, 2012.
- WHELAN JA., RUSSELL NB., W. M. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **Journal of Immunological Methods**, v. 278, p. 261–269, 2003.
- WHITEHORN J, KIEN DTH, NGUYEN NM, NGUYEN HL, K. P.; LB, C. ET. AL. Comparative Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to Dengue Virus Infection After Feeding on Blood of Viremic Humans: Implications for Public Health. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p. 1182–90, 2015.
- WHO/PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. Regional Zika Epidemiological Update --- 23 June 2016. **Washington, DC: WHO/PAHO**, 2016.
- WHYARD S, SINGH AD, W. S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 39, n. 11, p. 824–32., 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics**. Geneva: WHO, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH, TRAINING IN TROPICAL DISEASES, ET AL. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. **WHO**, v. Geneva, 2009.
- X., ZHANG, KESHAVA M., F. E. Chitosan/Interfering RNA Nanoparticle Mediated Gene Silencing in Disease Vector Mosquito Larvae. **Journal of Visualized Experiments**, v. 97, p. 3–15, 2015.
- YANG WJ, XU KK, CONG L, W. J. Identification, mRNA expression, and functional analysis of chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 9, p. 331–42, 2013.
- ZERBA, E. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. **Parasitology Today**, v. 4, p. 53–57, 1988.
- ZHANG X, ZHANG J, PARK Y, Z. K. Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, p. 674–82, 2012.
- ZHANG X, ZHANG J, Z. K. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Mol Biol.**, v. 19, n. 5, p. 683–93., 2010.
- ZHU KY., MERZENDORFER H., ZHANG W., Z. J.; S., M. Biosynthesis, Turnover,

and Functions of Chitin in Insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 61, p. 177–96, 2016.

- ZIMOCH L.; MERZENDORFER H. Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. **Cell and Tissue Research**, v. 308, p. 287–297, 2002.