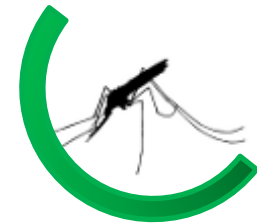




USP

Departamento de
PARASITOLOGIA

ICB
USP



Disciplina 0420122: Grandes endemias

Tópicos avançados em *Aedes aegypti*: Progressos e desafios.

Dr. André Luis da Costa da Silva

Email: alcosta@icb.usp.br

Postdoctoral fellow

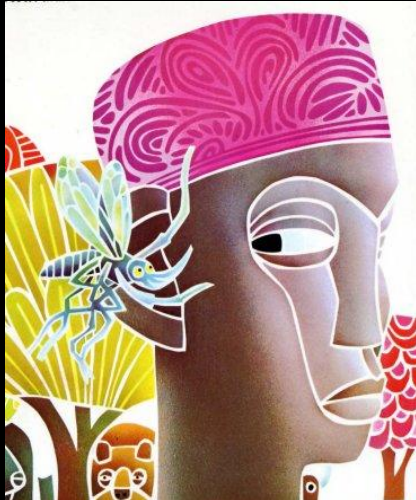


São Paulo-SP
15/11/2016



Mosquitos em nosso cotidiano:

Quem nunca foi
incomodado por
um mosquito?

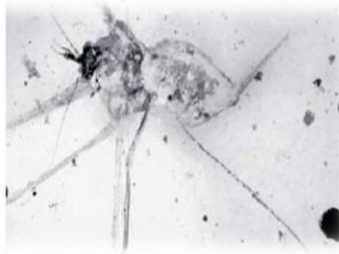


Quem nunca matou
um mosquito?

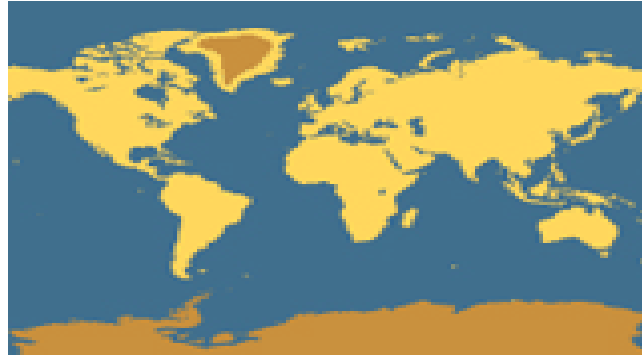


Classificação e Biodiversidade da família Culicidae

- Reino Animalia
- Filo Arthropoda
- Classe Insecta
- Ordem Diptera
- Família Culicidae



90-190 Ma



Extensão geográfica dos mosquitos

Fonte: <http://animals.nationalgeographic.com/animals/bugs/mosquito>



3.550 espécies



Fonte: (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list>). Acessado: 30/10/2013).

Culicídeos de interesse epidemiológico:

Gênero *Anopheles*



Malária

Anopheles gambiae

4%

Gênero *Aedes*



Fonte: Harbach, 2007



Dengue

Chikungunya

Zika

Febre amarela

Aedes aegypti

Gênero *Culex*



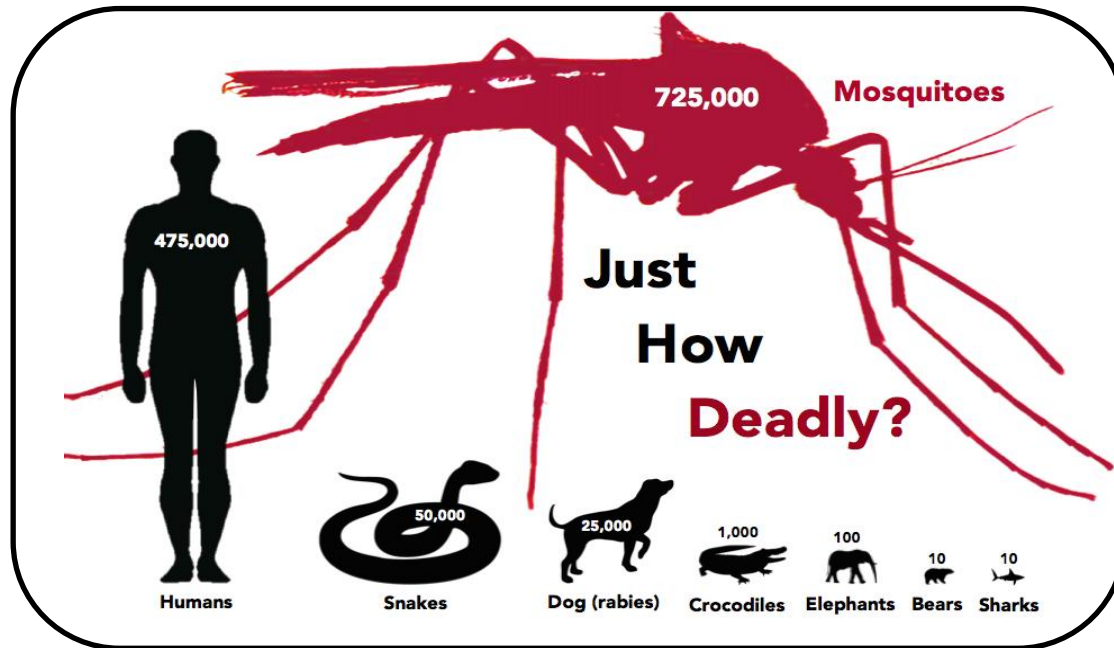
Oeste do Nilo

Encefalite Japonesa

Filariose linfática

Culex quinquefasciatus

Principais doenças transmitidas por mosquitos – Impactos:



Fonte: Bill e Melinda Gates Foundation

Malária 2015:

- 3.2 bilhões em risco
- 95 países em risco
- 214 milhões de casos
- 438.000 mortes

Fonte: WHO, 2016

Dengue - anualmente:

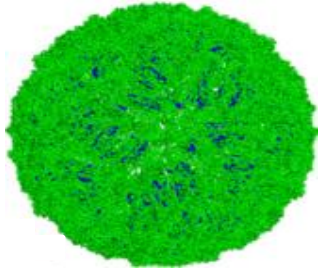
- 3.9 bilhões em risco
- 128 países em risco
- 390 milhões de casos
- 12.500 mortes

Fontes: WHO, 2016, Bhat et al., 2013

Os 3 principais arbovírus em circulação no Brasil

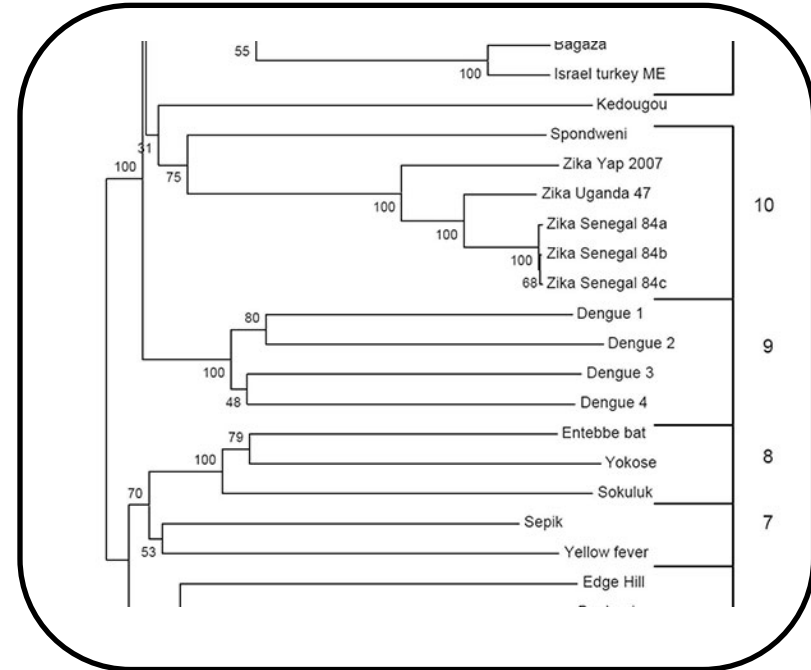
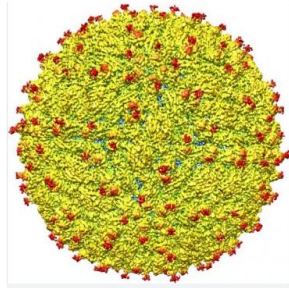
- Família Flaviviridae
 - Gênero Flavivirus

Vírus Dengue



4 sorotipos (DENV1-4)

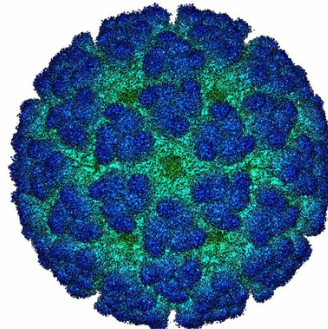
Vírus Zika



Lanciotti *et al.*, 2008

- Família Togaviridae
 - Gênero Alphavirus

Vírus Chikungunya



Aedes aegypti no Brasil – Impactos:

- Dengue Anualmente: 1 milhão de casos
- Introdução de Chikungunya e Zika

A18 | DOMINGO, 28 DE FEVEREIRO DE 2016 | O ESTADO DE S. PAULO

Metrópole

EMERGÊNCIA NACIONAL E MUNDIAL

Pesquisadores da USP e do Instituto Butantã que apoiam cientistas locais veem 'sopa' de agentes patogênicos e recolhem fêmeas do mosquito casa por casa; fato de não haver casas de zika confirmados no Estado amplia dúvidas em relação a dengue e chikungunya

Infestado pelo 'Aedes', Sergipe pode estar sob ataque tríplice de vírus

Herton Eacobar
ENVIOADO ESPECIAL JARACUÍ

Uma porta após a outra, a história se repete. Manchas vermelhas pelo corpo, coceira, febre, dores musculares e nas articulações. Difícil achar uma casa no Bairro Industrial de Aracaju que não tenha alguém com alguma combinação desses sintomas. Poder ser dengue, zika ou chikungunya. Mas qual? Os sintomas são muito parecidos, as pessoas sem sempre buscam atendimento médico e isso é um problema para os cientistas que investigam a disseminação dos vírus transmitidos pelo *Aedes aegypti*.

O pesquisador Paulo Zanotto, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), não consegue esconder o espanto. "Estamos na boca do leão. Isso aqui é uma sopa de vírus."

O cenário é ainda mais preocupante do que ele imagina. Líder de uma equipe de pesquisadores paulistas que foi a Sergipe colaborar com as equipes locais na investigação da epidemia, Zanotto suspeita que os três vírus estejam circulando simultaneamente na população, e essa combinação possa estar impedida no desenvolvimento da microcefalia e outras má-formações congênitas.

Os casos mais preocupantes são os das grávidas. Na última casa de uma rua sem saída está uma jovem de 21 anos, Bárbara, grávida do primeiro filho. Sem tirar os olhos do smartphone, ela conta que teve dois episódios de "vírus" durante a gravidez - no quarto e no sexto mês.

No primeiro, as manchas vermelhas coçavam tanto que chegavam a formar feridas e ela precisou passar 15 dias de repouso, com dores no pé. Ela sabe que pode ter sido zika, mas prefere não pensar muito a respeito. "Tende ficar tranquila, senão a gente para."

Durante a conversa, uma equipe de entomologia viaçava a casa em busca de mosquitos, e encontra uma fêmea de *Aedes aegypti*, com a barriga cheia de sangue. E que os cientistas mais precisam para saber se há vírus circulando na população local de mosquitos, e quais são esses vírus.

Todos os insetos capturados são levados ao laboratório para serem identificados, congelados e enviados para análise - incluindo os pernilongos, para ter certeza de que eles não representam perigo. No dia seguinte, uma equipe ainda voltará ao local para coletar sangue, saliva e urina da jovem grávida.

Mistério. A proposta dos cientistas da USP e do Instituto Butantã, apelados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapep), é usar Sergipe como um laboratório para entender o que está acontecendo com esses vírus.

■ **Registro oficial**
192
casos de microcefalia foram registrados em 2015 e 2016 em Sergipe, segundo o último boletim divulgado pela Secretaria de Estado da Saúde. O País tem 583 relatos confirmados.

O menor Estado da federação abriga uma grande incógnita. Proporcionalmente, no tamanho de sua população (2,2 milhões), Sergipe tem o maior número de casos de microcefalia do País (93); porém, nenhum caso confirmado de infecção por vírus zika. Desde as primeiras notificações de microcefalia no Estado, em agosto, 360 amostras de sangue foram enviadas para análise no Instituto Evandro Chagas, no Pará, das quais 128 já foram processadas, todas negativas para o zika.

"Temos esse mistério para resolver", diz o bioquímico Clomar Alves dos Santos, do Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen) de Aracaju, responsável pelo processamento das amostras de sangue, saliva e urina que estão sendo colhidas da população. O material, agora, é

analísado no próprio Lacen, graças a uma nova máquina de PCR enviada pelo Ministério da Saúde, que permite detectar e identificar o material genético dos vírus. As amostras são testadas para presença de zika, dengue e chikungunya, além de outras infecções virais relacionadas a má-formações congênitas, como herpes, rubéola, toxoplasma e citomegalovírus.

Os cientistas acreditam ser só uma questão de tempo e amostragem para confirmar a presença do zika no Estado, mas querem investigar mais a fundo se ele é o único culpado pelo surto de microcefalia. Há registros na literatura científica de que o chikungunya também pode causar problemas na gestação, e ele já é endêmico em Sergipe. Fomos a uma hipótese que precisa ser investigada.

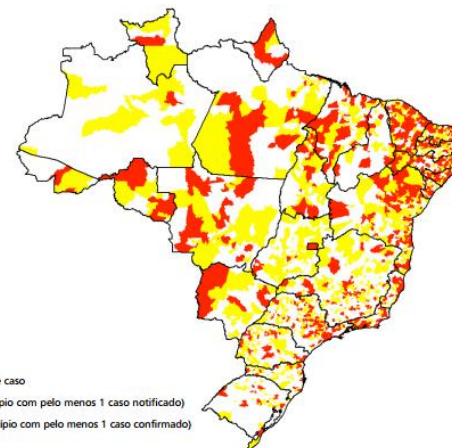
1. No Bairro Industrial, em Aracaju, é difícil achar quem não tenha sofrido com manchas vermelhas, coceira e febre

2. Mosquitos são levados ao laboratório e congelados para análise posterior

3. Ana Paula com o filho. A enfermeira disse que tinha um probleminha na cabeça dele

4. Na casa de Bárbara, grávida do primeiro filho, equipe encontrou uma fêmea de *Aedes*

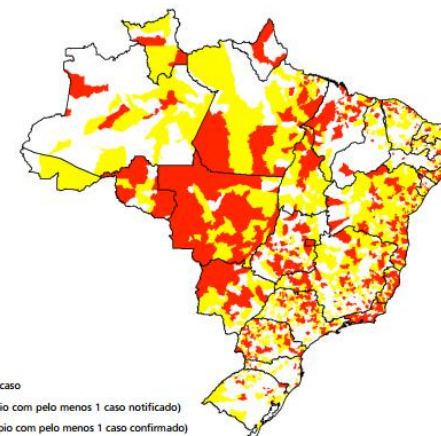
Chikungunya:



Fonte: Sinan-Net (atualizado em 08/07/2016).
Dados sujeitos a alteração.

Figura 3 – Casos notificados e confirmados de febre de chikungunya por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 27, Brasil, 2016

Zika:



Fonte: Sinan-Net (atualizado em 08/07/2016).
Dados sujeitos a alteração.

Figura 5 – Distribuição dos casos notificados e confirmados de febre pelo vírus Zika por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 27, Brasil, 2016

Aedes aegypti

Fatores biológicos, Comportamentais e adaptações



Culicídeos X Relação com os humanos X Urbanização



<http://iaraabreu.blogspot.com/>

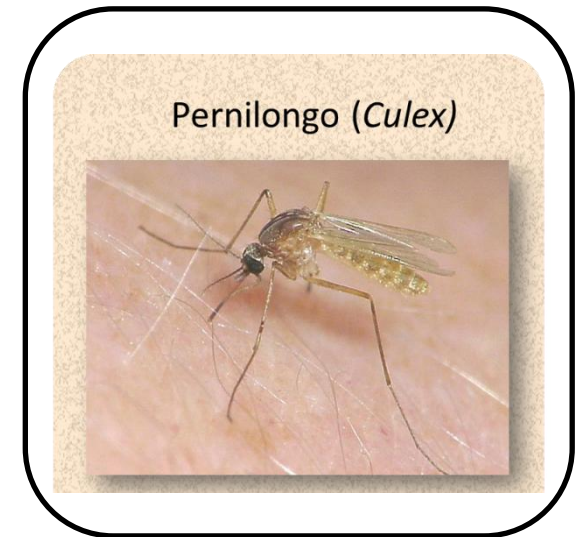


blog.ambientebrasil.com.br

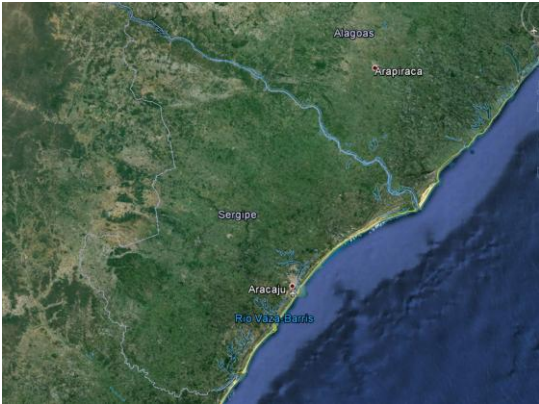


www.treehugger.com/files/2007/08/architects_aren.php

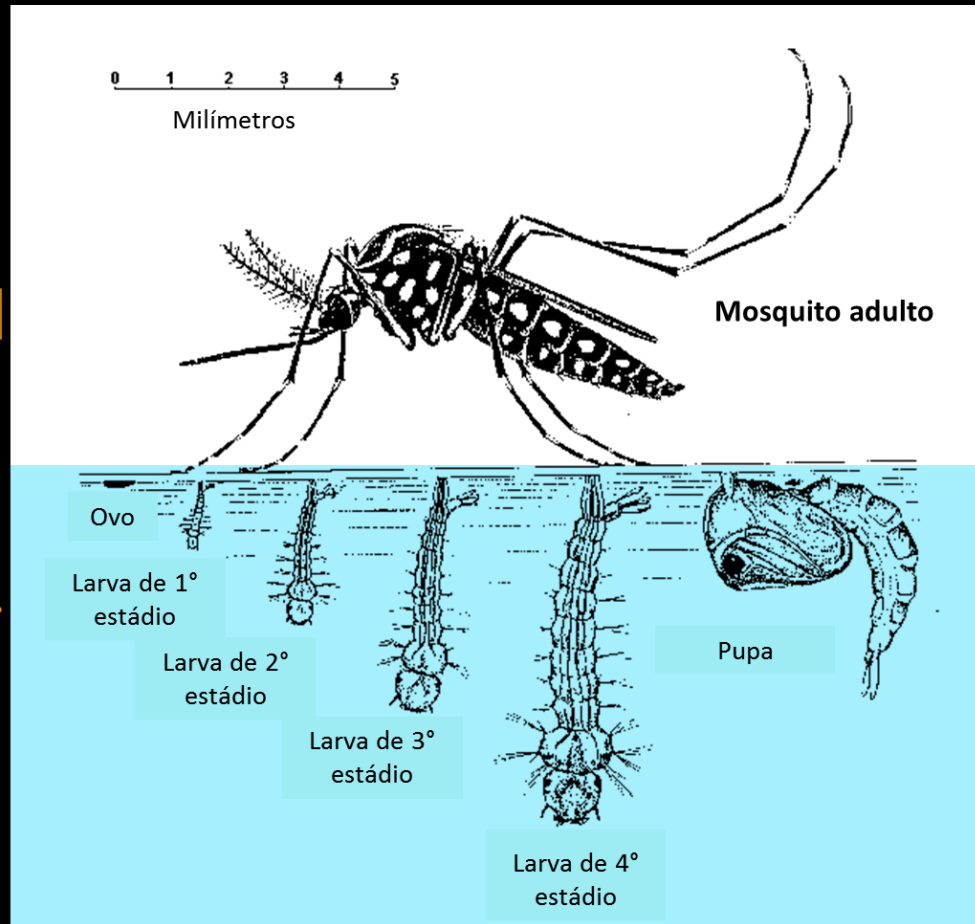
Culicídeos X Relação com os humanos X Urbanização



Culicídeos X Relação com os humanos X Urbanização



Ciclo de vida dos mosquitos:



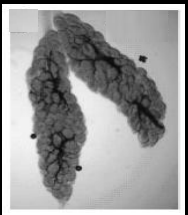
Culicídeos e o repasto sanguíneo:

Hematofagia:

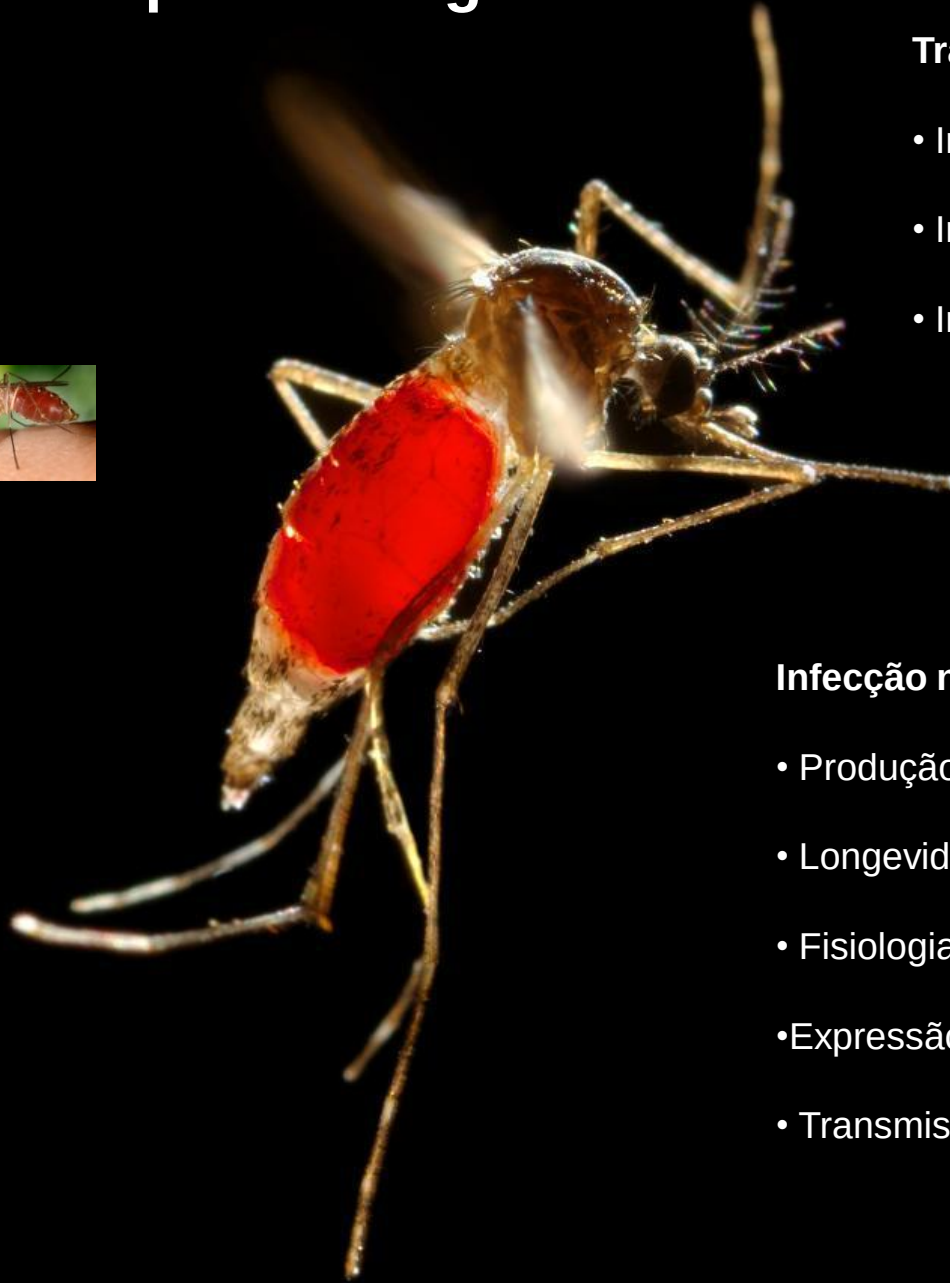


Reprodução:

- Proteínas de vitelo
- Produção de ovos

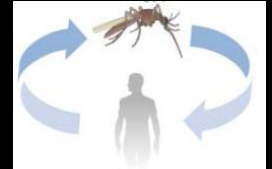


Par de ovários



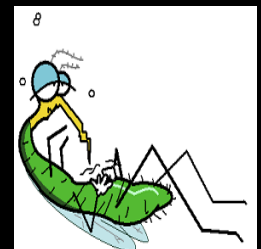
Transmissão de patógenos:

- Ingestão
- Infecção
- Inoculação

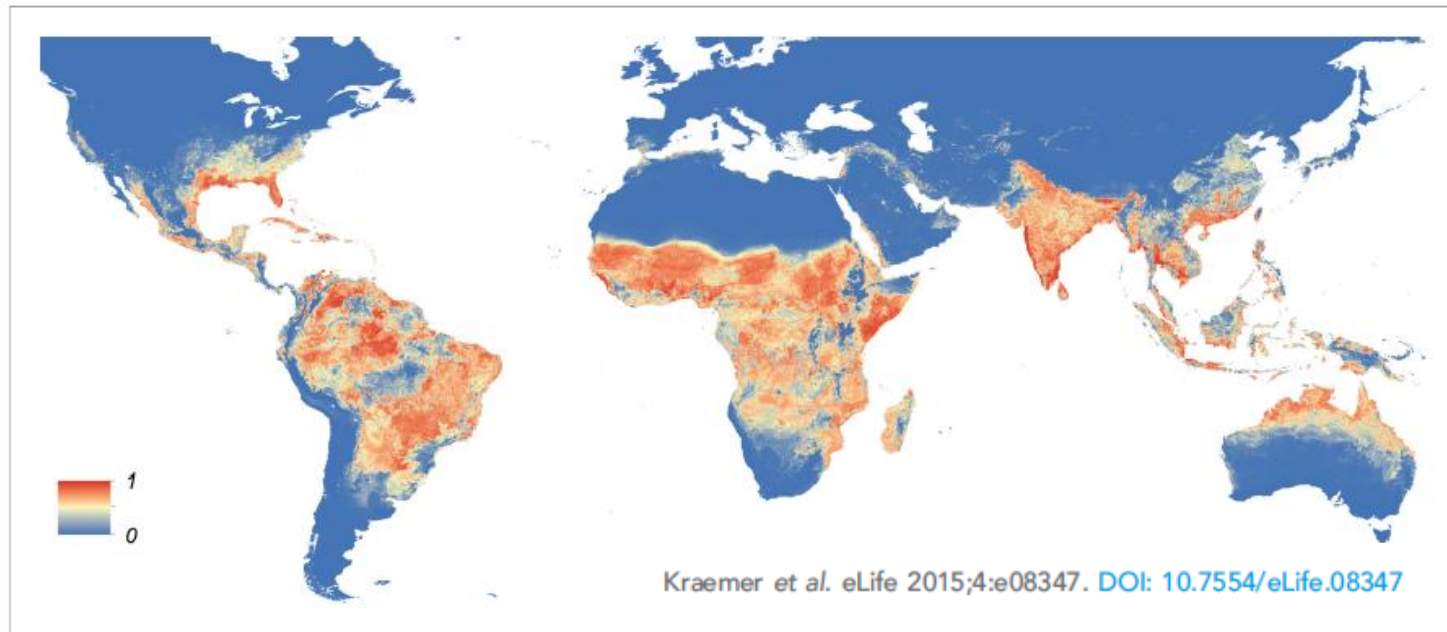
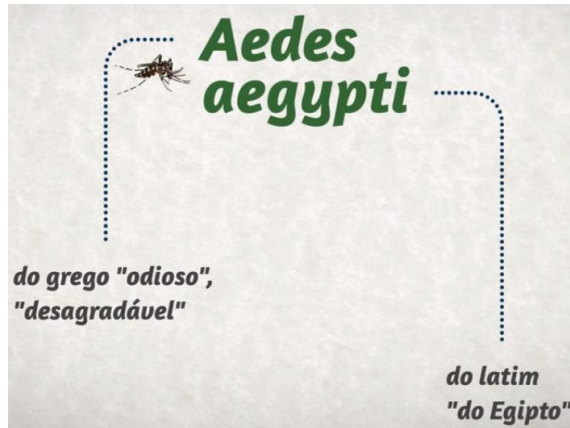


Infecção no invertebrado:

- Produção de ovos
- Longevidade
- Fisiologia alterada
- Expressão gênica
- Transmissão vertical



Aedes aegypti – Centro de dispersão e distribuição atual



Aedes aegypti – Evolução do sistema olfatório

ARTICLE

doi:10.1038/nature13964

Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor

Carolyn S. McBride^{1,2†}, Felix Baier^{1†}, Aman B. Omondi^{3†}, Sarabeth A. Spitzer^{1†}, Joel Lutumiah⁴, Rosemary Sang⁴, Rickard Ignell³ & Leslie B. Vosshall^{1,2}

222 | NATURE | VOL 515 | 13 NOVEMBER 2014

©2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

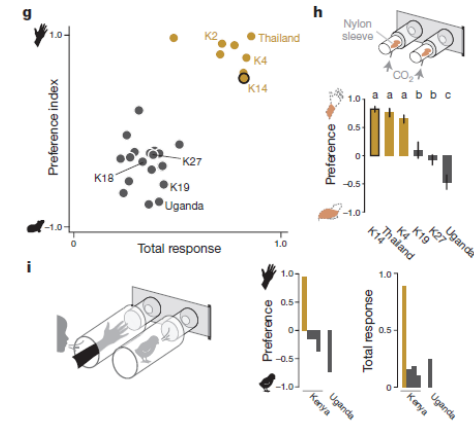
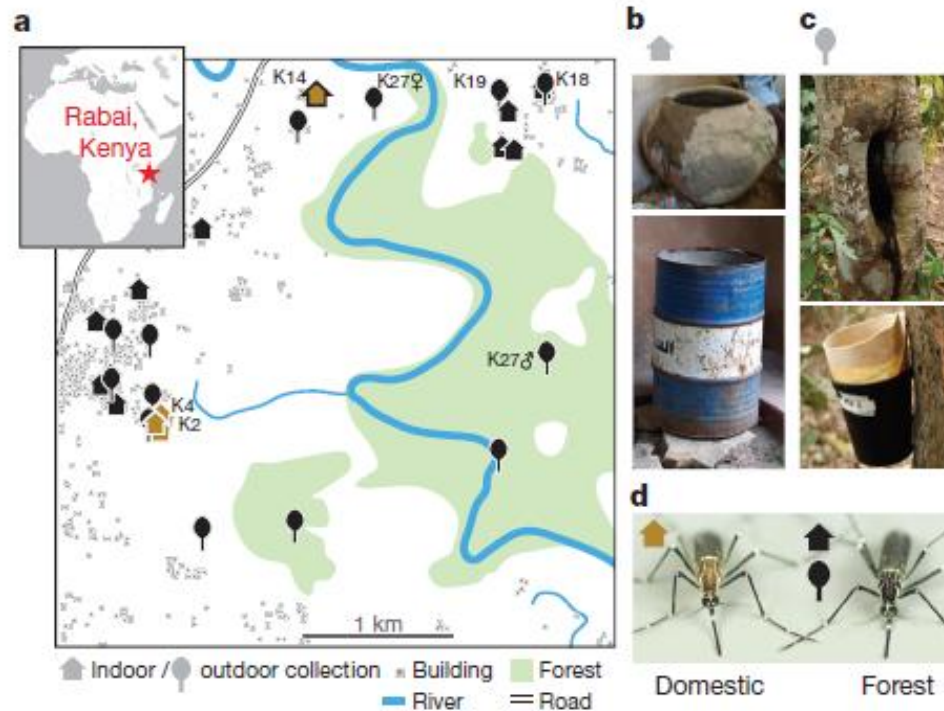


Figure 2 | Forest and domestic females differ in host preference. a–c, Biting assay. a, Assay schematic. b, c, Host preference (b) and total response of

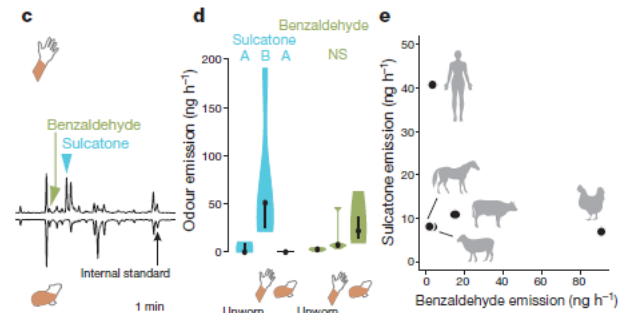
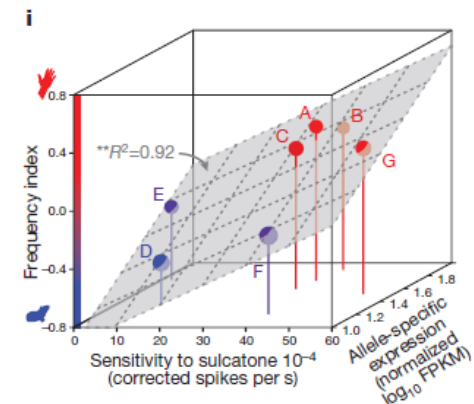


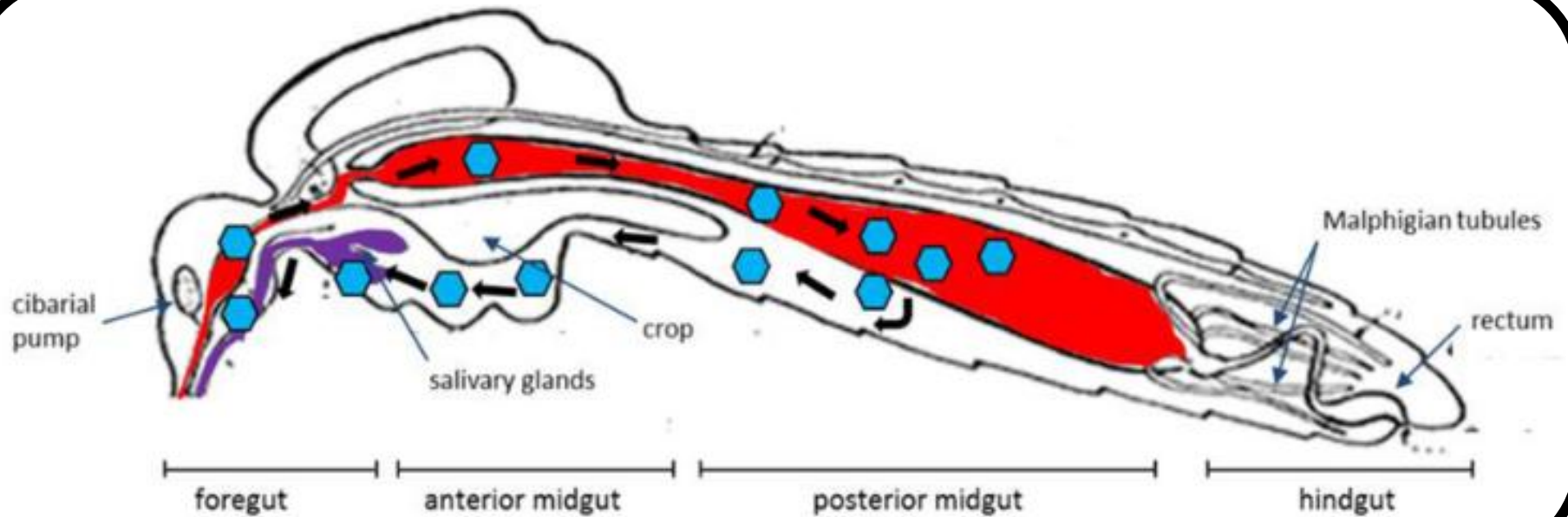
Figure 4 | *Or1* responds to sulcatone, a human odorant. a, Schematic of gas



Como entender melhor as interações entre *Aedes aegypti* e as arboviroses emergentes



Ciclo de vidas dos arbovírus – Hospedeiro invertebrado....



Repasto sanguíneo – Alimentadores artificiais....

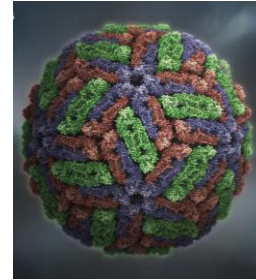
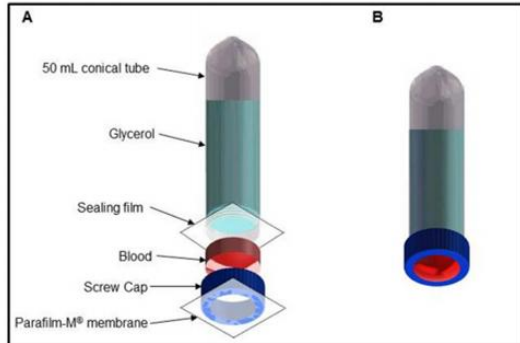
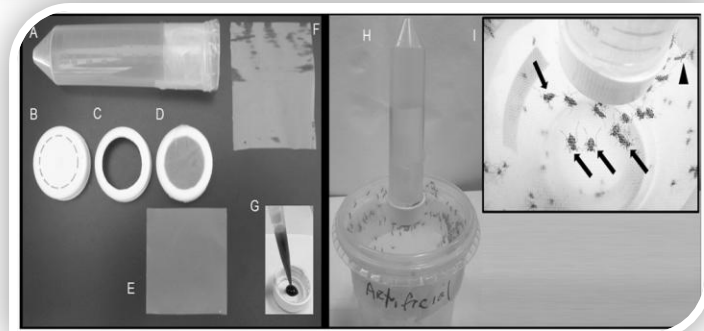
OPEN ACCESS Freely available online



Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*

André Luis Costa-da-Silva^{1*}, Flávia Rosa Navarrete¹, Felipe Scassi Salvador², Maria Karina-Costa¹, Rafaella Sayuri Ioshino¹, Diego Soares Azevedo¹, Desirée Rafaela Rocha¹, Camila Malta Romano², Margareth Lara Capurro¹

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, ²Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil



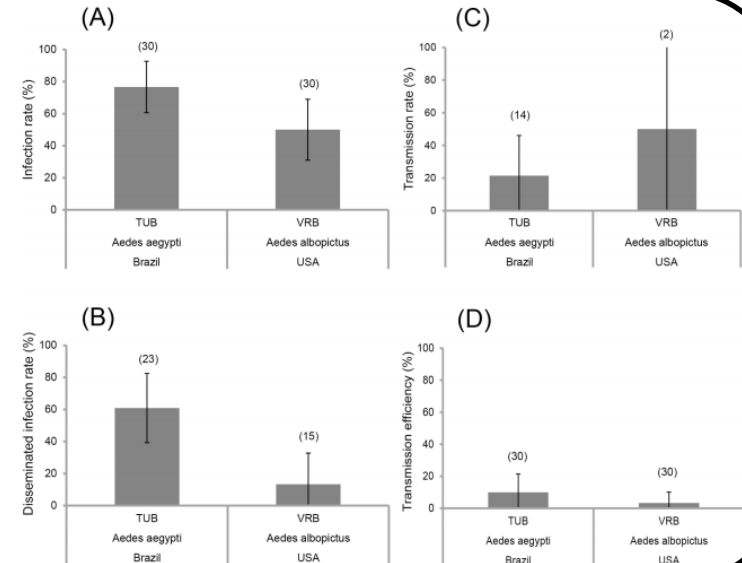
Estudos de competência vetorial – Populações de campo

RESEARCH ARTICLE

Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus

Thais Chouin-Carneiro^{1*}, Anubis Vega-Rua^{2,3*}, Marie Vazeille², André Yebakima³, Romain Girod⁴, Daniella Goindin⁵, Myrielle Dupont-Rouzeyrol⁶, Ricardo Lourenço-de-Oliveira¹, Anna-Bella Failloux^{2*}

Published: March 3, 2016

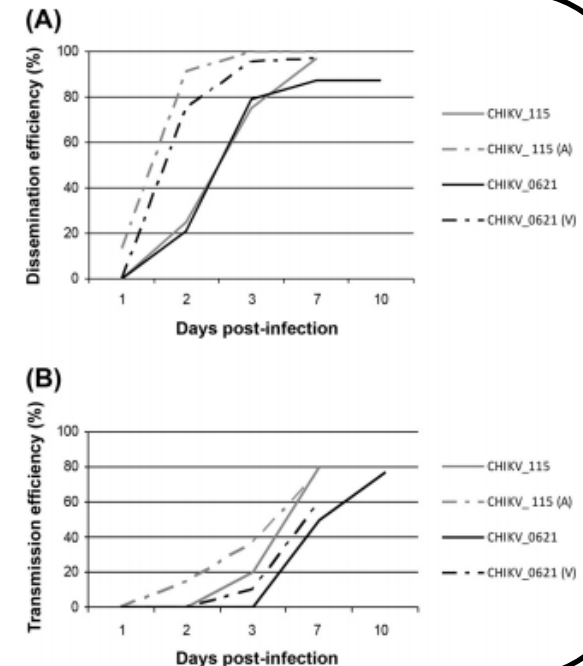


High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus

Anubis Vega-Rúa,^{a,b} Karima Zouache,^a Romain Girod,^c Anna-Bella Failloux,^a Ricardo Lourenço-de-Oliveira^{a,d}

Institut Pasteur, Department of Virology, Arboviruses and Insect Vectors, Paris, France^a; Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, Paris, France^b; Institut Pasteur de la Guyane, Unité d'Entomologie Médicale, Cayenne, French Guiana^c; Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil^d

June 2014 | Volume 88 | Number 11

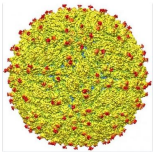


Estudos de competência vetorial – Cepas de laboratório

Title: Laboratory strains of *Aedes aegypti* are Competent to Brazilian Zika virus

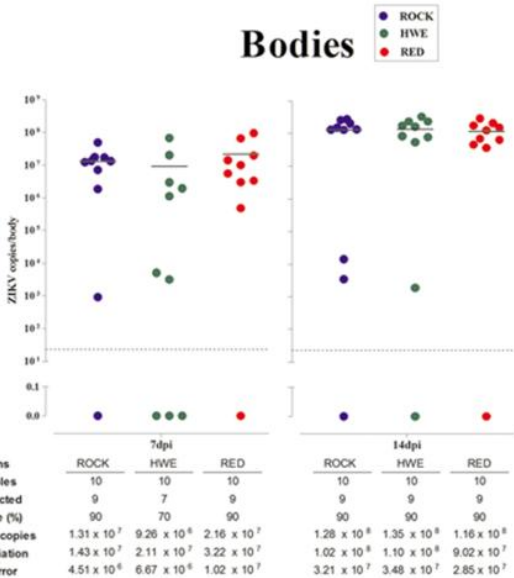
Short title: *Aedes aegypti* laboratory strains and Zika virus

André Luis Costa-da-Silva^{1,2}, Rafaella Sayuri Ioshino^{1,2}, Helena Rocha Corrêa Araújo^{1,2}, Bianca Burini Kojin^{1,2}, Paolo Marinho de Andrade Zanotto³, Danielle Bruna Leal Oliveira³, Stella Rezende Melo³, Edison Luiz Durigon³, Margareth Lara Capurro^{1,2*}



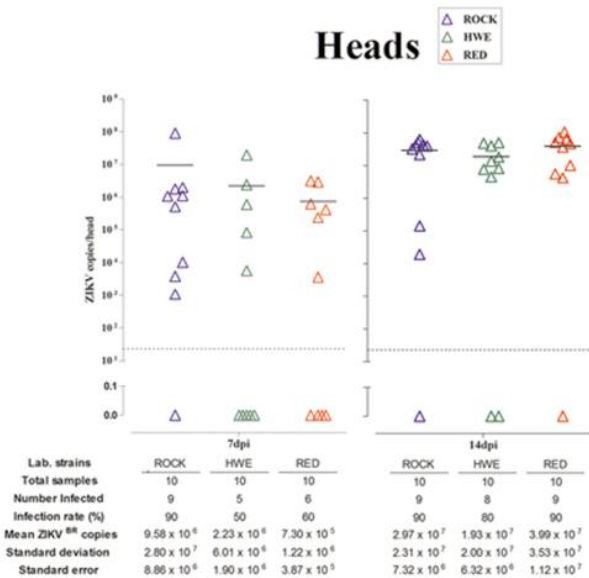
A

Bodies

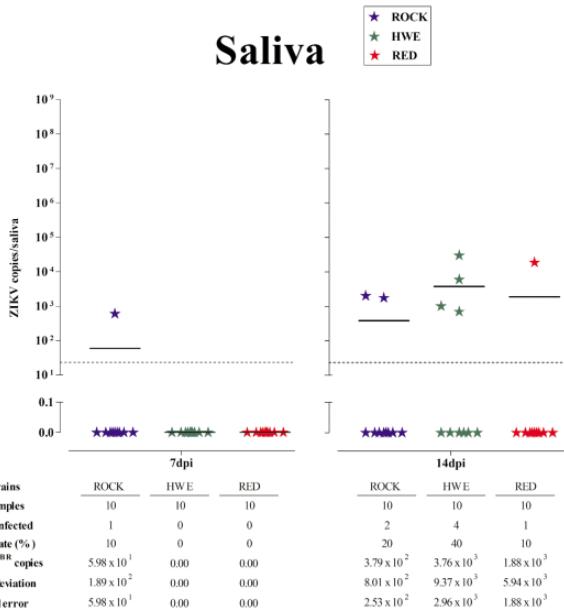


B

Heads



Saliva

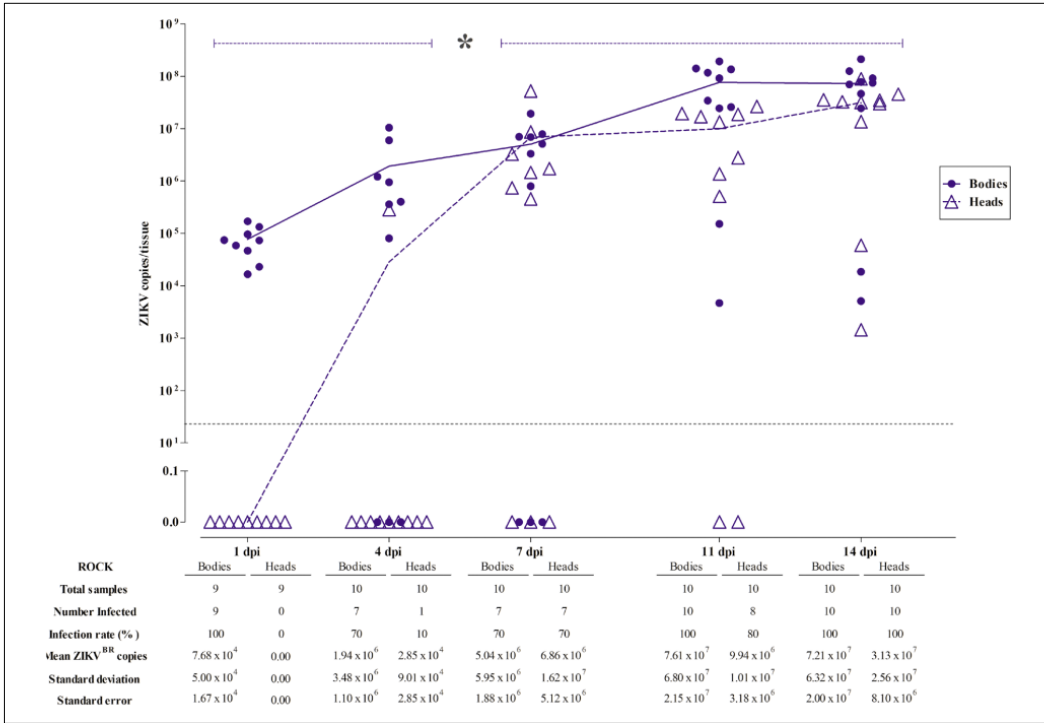
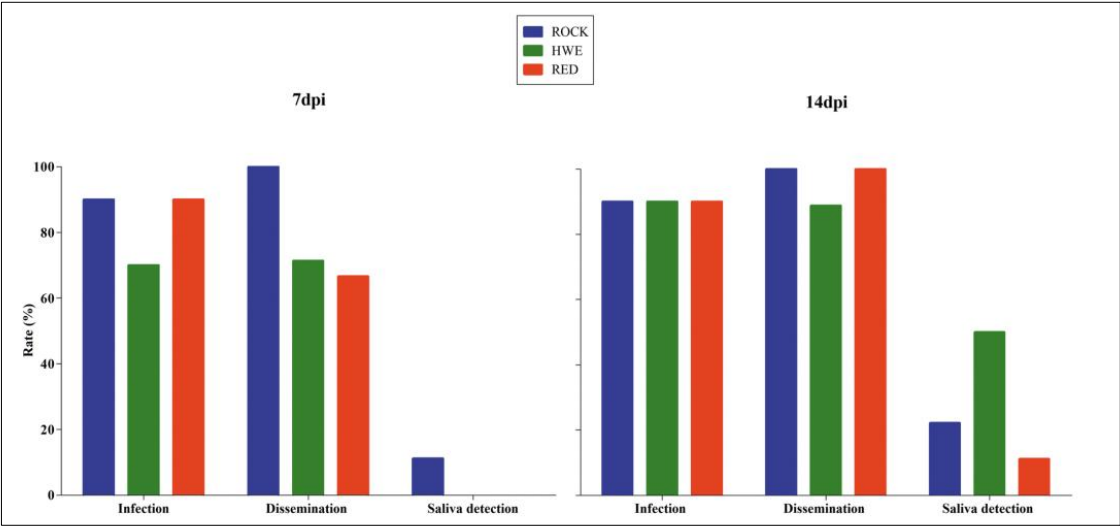


Estudos de competência vetorial – Cepas de laboratório

Title: Laboratory strains of *Aedes aegypti* are Competent to Brazilian Zika virus

Short title: *Aedes aegypti* laboratory strains and Zika virus

André Luis Costa-da-Silva^{1,2}, Rafaella Sayuri Ioshino^{1,2}, Helena Rocha Corrêa Araújo^{1,2}, Bianca Burini Kojin^{1,2}, Paolo Marinho de Andrade Zannotto³, Danielle Bruna Leal Oliveira³, Stella Rezende Melo³, Edison Luiz Durigon³, Margareth Lara Capurro^{1,2*}



Estudos de capacidade vetorial:

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011

Diawo Diallo^{1*}, Amadou A. Sall², Cheikh T. Diagne¹, Oumar Faye², Ousmane Faye², Yamar Ba¹, Kathryn A. Hanley³, Michaela Buenemann⁴, Scott C. Weaver⁵, Mawlouth Diallo¹

¹ Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal, ² Unité des Arbovirus et Virus des Fièvres Hémostatiques, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal, ³ Department of Biology, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico, United States of America, ⁴ Department of Geography, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico, United States of America, ⁵ Institute for Human Infections and Immunity, Center for Tropical Diseases, and Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, United States of America

Published October 13, 2014

Table 2. Mosquitoes collected and Zika virus infection of potential vectors, Kédougou, 2011.

Species	Total collected	Proportion of the collection (%)	Females collected	Proportion of the collection (%)	Positive female pools	Minimum infection rate (%)
<i>Aedes aegypti</i>	250	2.22	245	2.20	1	4.08
<i>Aedes africanus</i>	505	4.49	505	4.54	5	9.90*
<i>Aedes dalzielii</i>	1718	15.27	1718	15.44	2	1.16
<i>Aedes furcifer</i>	2966	26.37	2939	26.42	5**	1.36
<i>Aedes hirsutus</i>	34	0.30	34	0.30	2	58.82*
<i>Aedes luteocephalus</i>	1259	11.19	1259	11.32	5	3.97
<i>Aedes metallicus</i>	81	0.72	81	0.73	2	24.69*
<i>Aedes taylori</i>	422	3.75	395	3.55	2	5.06
<i>Aedes unilineatus</i>	38	0.34	38	0.34	1	26.31*
<i>Aedes vittatus</i>	1790	15.91	1728	15.53	3	1.74
<i>Anopheles coustani</i>	710	6.31	710	6.38	1	1.41
<i>Culex perfuscus</i>	22	0.19	22	0.20	1	45.45*
<i>Mansonia uniformis</i>	283	2.52	281	2.52	1	3.56
Others	1169	10.39	1169	10.51	0	
Total	11247		11124		30	

Minimum infection rate (estimated number of positive mosquitoes per 1000 mosquitoes tested), *Minimum infection rate with an asterisk are statistically significantly higher, **Five ZIKV isolates including 1 pool of males positive.

Others: *Ae. argenteopunctatus*, *Ae. centropunctatus*, *Ae. cumminsii*, *Ae. cozi*, *Ae. fowleri*, *Ae. mcintoshi*, *Ae. minutus*, *Ae. neafricanus*, *Ae. ochraceus*, *Ae. vexans*, *An. brohieri*, *An. funestus*, *An. domicola*, *An. flavicosta*, *An. freetownensis*, *An. gambiae* s.l., *An. hancocki*, *An. nili*, *An. pharoensis*, *An. rufipes*, *An. squamosus*, *An. ziemanni*, *Cx. Annulioris*, *Cx. antennatus*, *Cx. bitaeniorhynchus*, *Cx. cineris*, *Cx. decens*, *Cx. duttoni*, *Cx. ethiopicus*, *Cx. neavei*, *Cx. pollicipes*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Eretmapodites quinquevittatus*, *Ma. Africana*, *Fi. circumtestea*.

doi:10.1371/journal.pone.0109442.t002

Estudos de capacidade vetorial:

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 111(10): 655-658, October 2016 655

First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America

Anielly Ferreira-de-Brito¹, Ieda P Ribeiro², Rafaella Moraes de Miranda¹,
Rosilainy Surubi Fernandes¹, Stéphanie Silva Campos¹, Keli Antunes Barbosa da Silva¹,
Marcia Gonçalves de Castro¹, Myrna C Bonaldo², Patrícia Brasil³, Ricardo Lourenço-de-Oliveira^{1/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

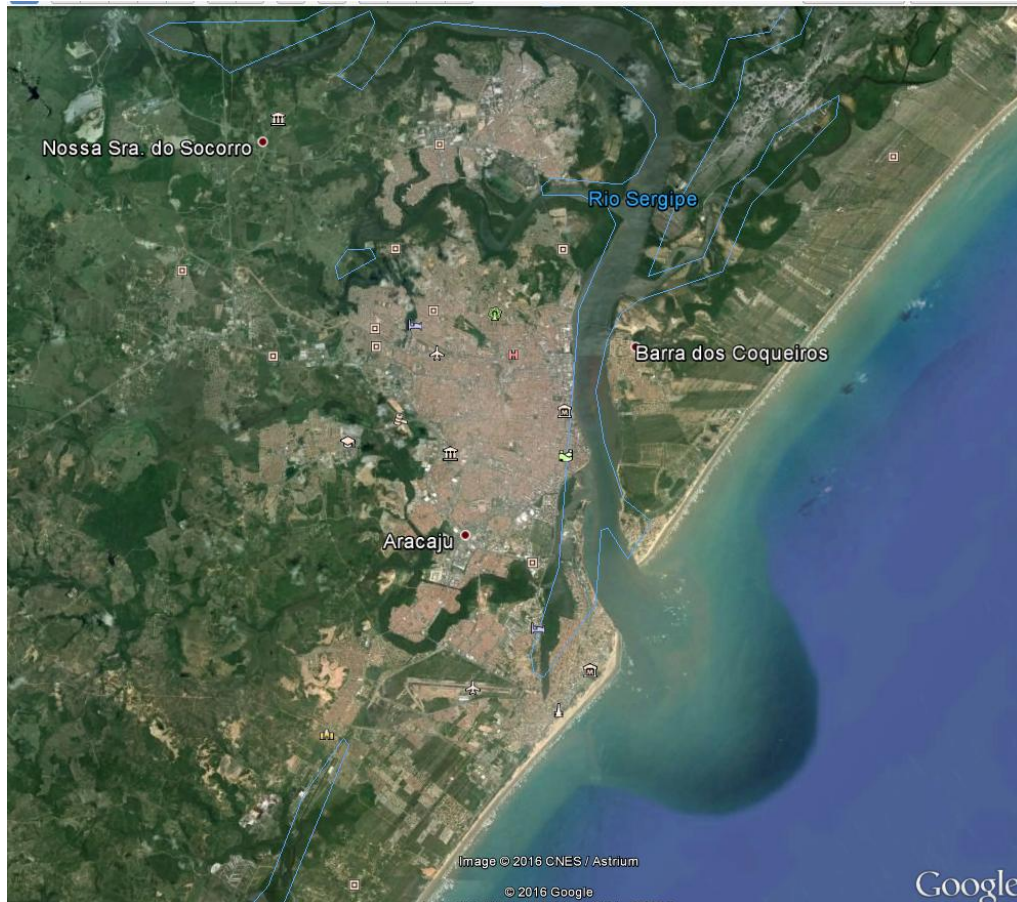
²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Instituto Nacional de Infectologia, Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças Febris Agudas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil



Estudos de capacidade vetorial - Cidade de Aracaju - SE

- ~600.000 Habitantes
- ~180.000km²



• Rede Zika - FAPESP

• Atividades em Aracaju

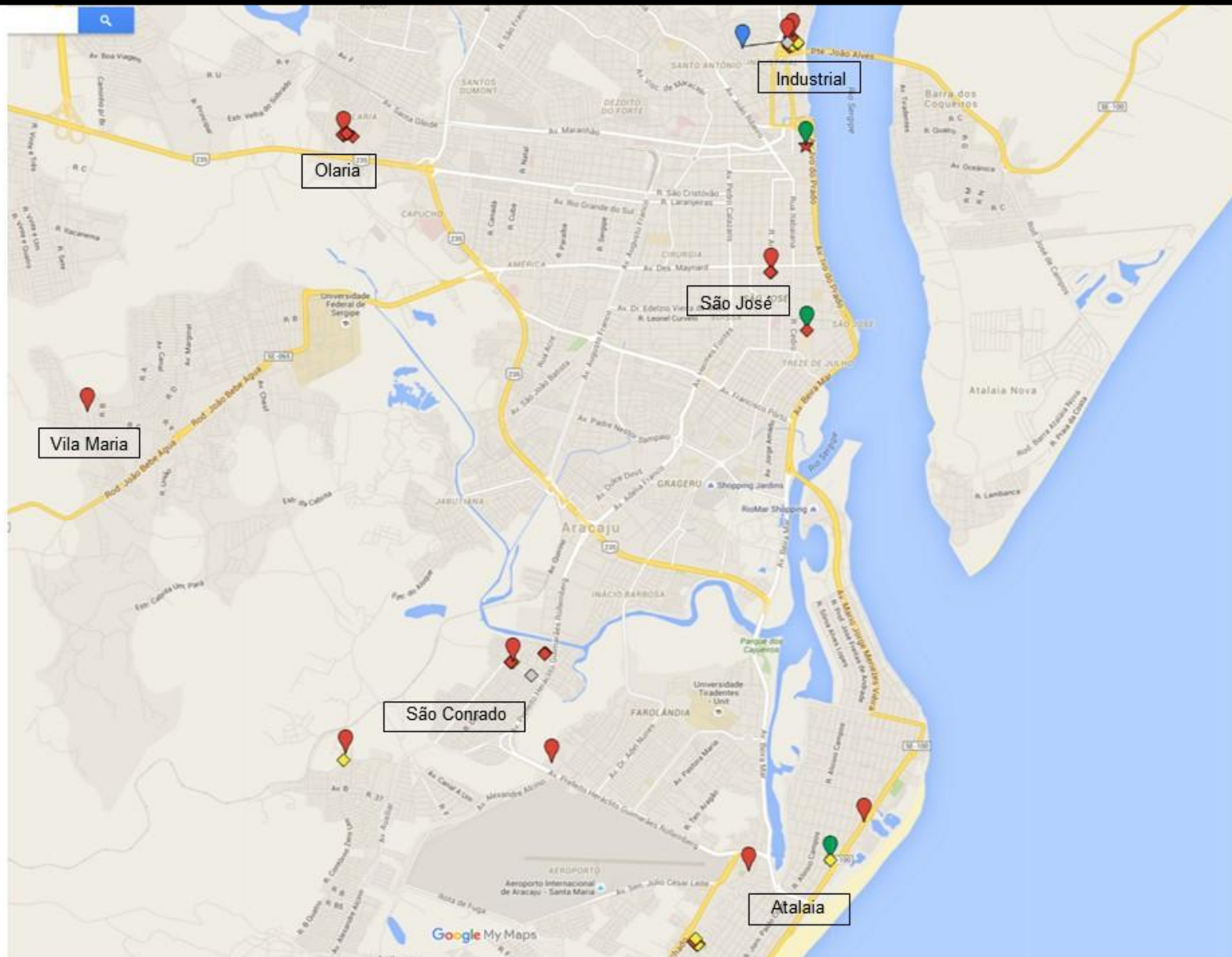
• Fevereiro 2016

A BUSCA PELO MOSQUITO E O
ATENDIMENTO NO BAIRRO INDUSTRIAL

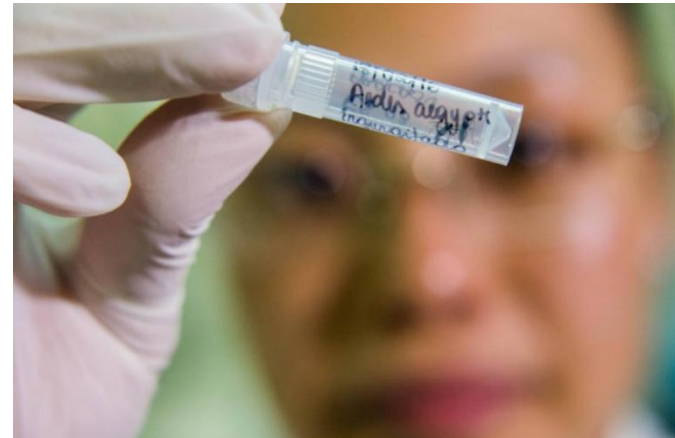


1 | 5 A proposta dos pesquisadores é usar Sergipe como um laboratório para entender o que está acontecendo com esses vírus no Nordeste e no resto do país Foto: TIAGO QUEIROZ/ESTADÃO

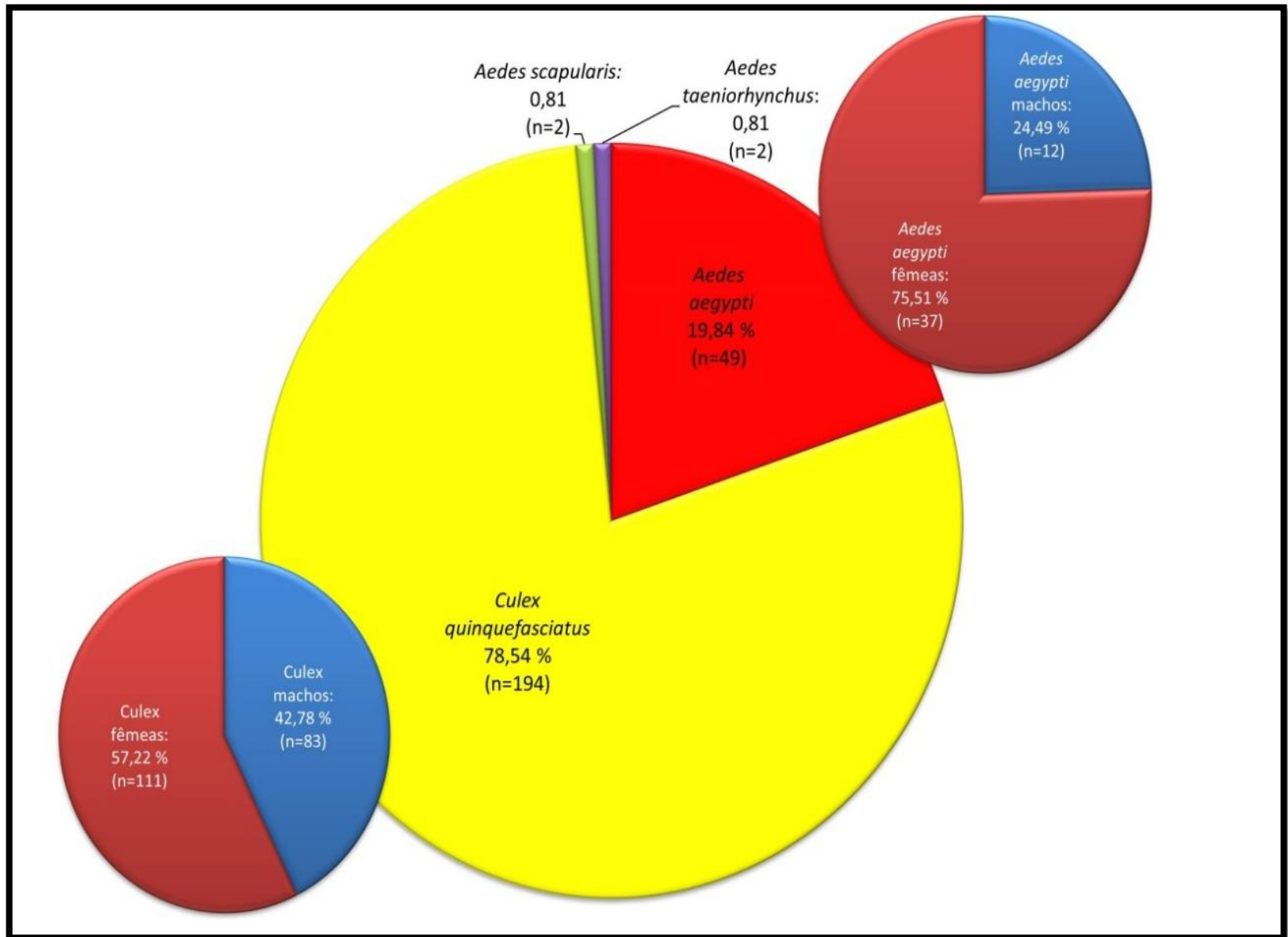
Bairros visitados em Aracaju:



Coletas e triagem em laboratório:



Resultados das Coletas:



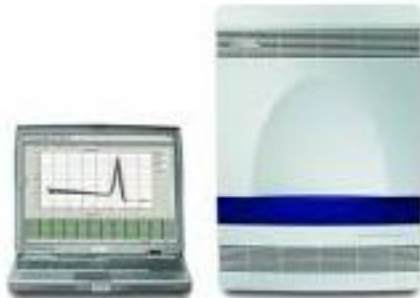
Ensaio em laboratório:

Diagnóstico



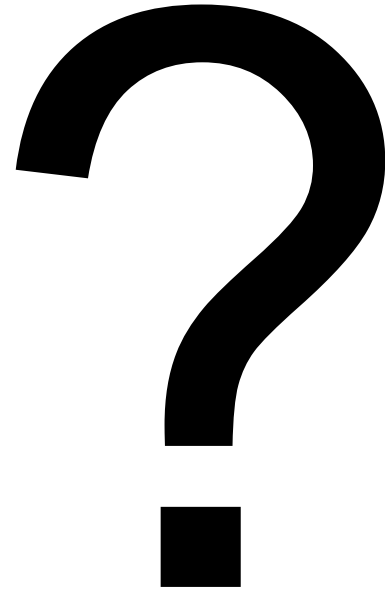
**Mosquitos coletados
Na cidade**

**Isolamento
Viral**

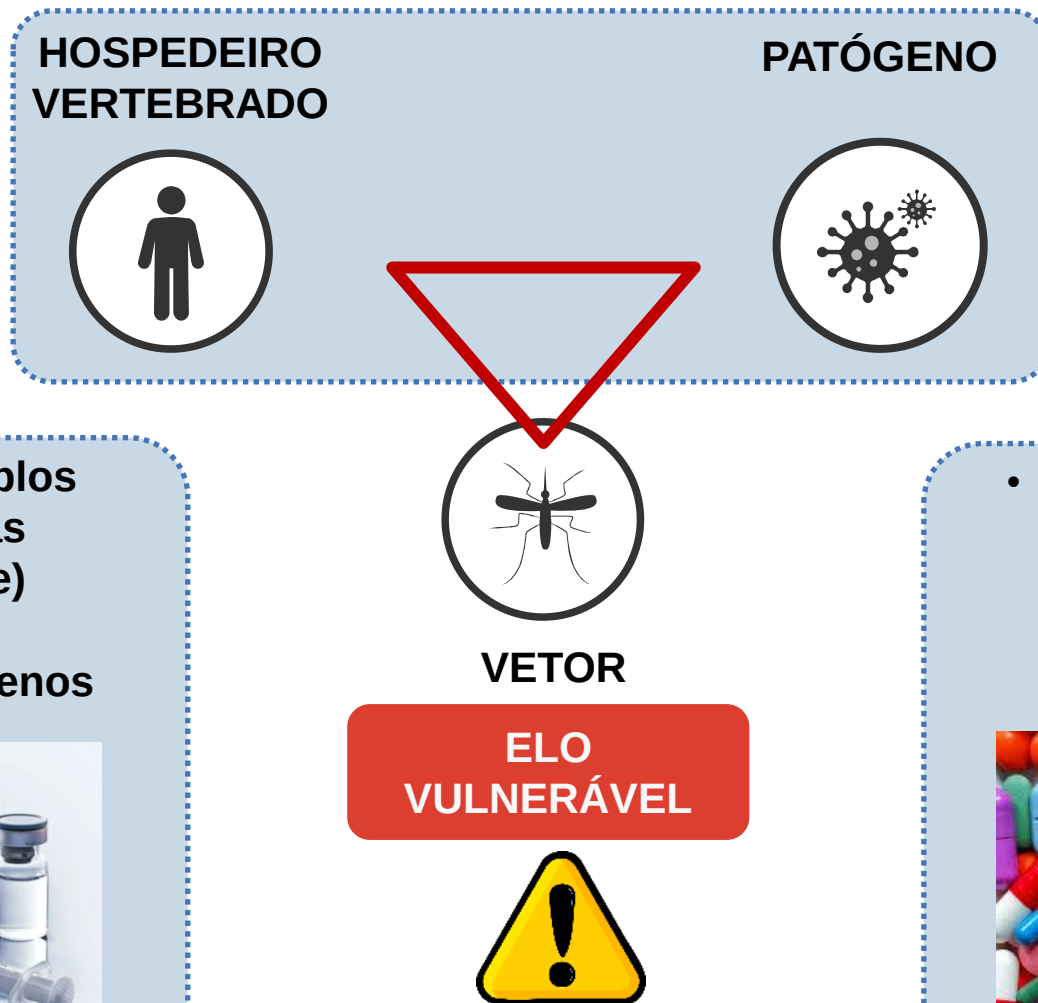


?

COMO CONTROLAR O MOSQUITO VETOR



Como controlar a transmissão das arboviroses?



- Falta de amplos programas (Dengue)
- Novos patógenos



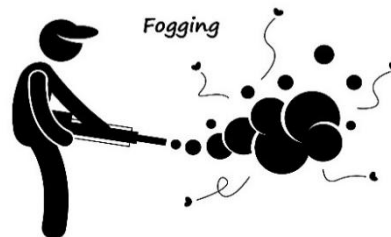
- Falta de drogas efetivas
- Resistência



Manejo Integrado de Vetores:



VETOR



Manejo Integrado de Vetores:



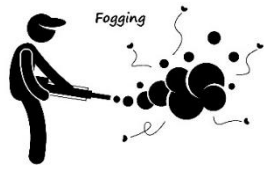
1

Controle Mecânico

Remoção de criadouros
Difícultar ação do mosquito



Manejo Integrado de Vetores:



2

Controle químico

Inseticidas (adulticidas e larvicidas)
Repelentes



Manejo Integrado de Vetores:



3

Controle biológico

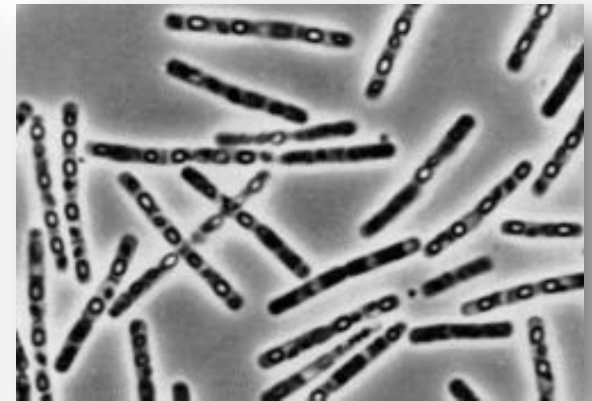
Predadores naturais (peixes/larvas)
Agentes patogênicos



Gambusia affinis



Toxorhynchites theobaldi



Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)

Manejo Integrado de Vetores:

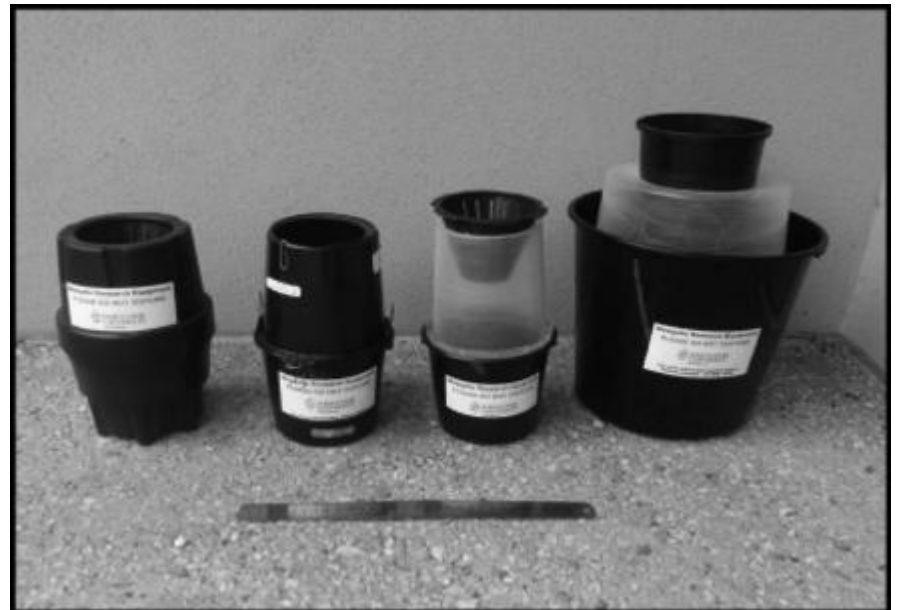


4

Coleta massiva

Armadilha de adultos

Armadilha de ovos



Estratégias alternativas de controle



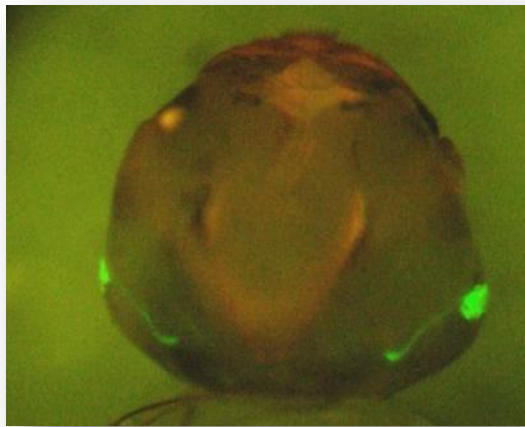
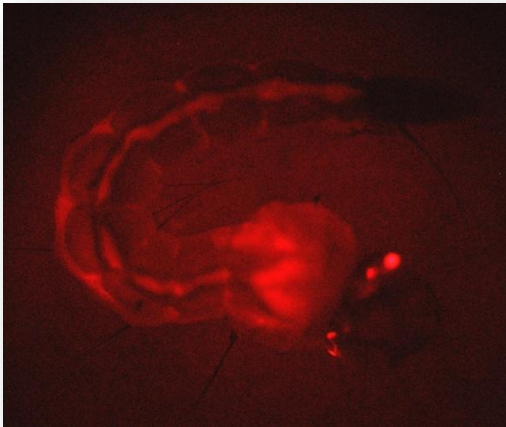
Manejo Integrado de Vetores:



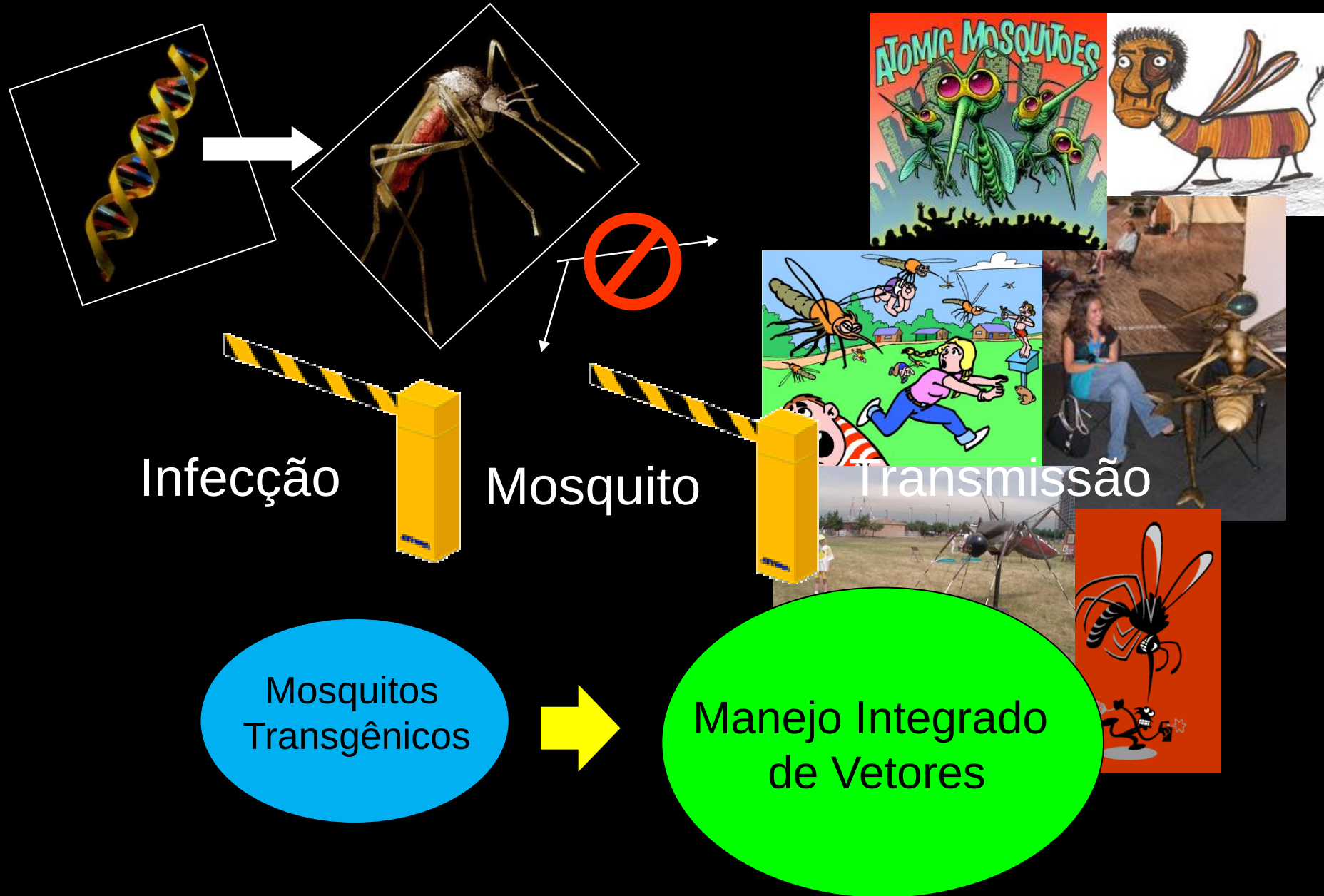
5

Métodos Genéticos

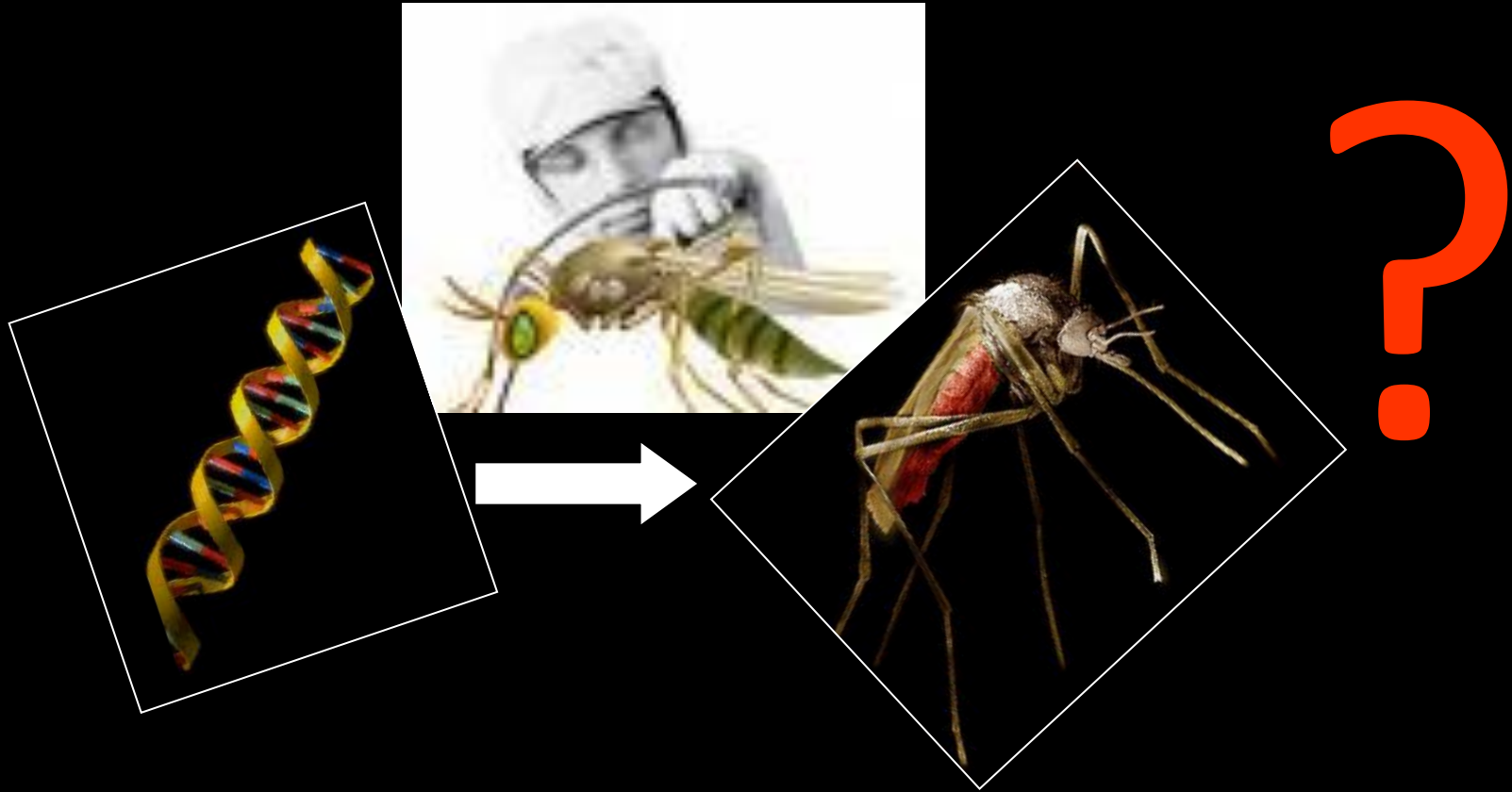
Transgenia de mosquitos



Laboratório - Manipulação genética de mosquitos



Como transformar os mosquitos...



A primeira obtenção de mosquitos transgênicos

- 1998:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 95, pp. 3748–3751, March 1998
Genetics

Mariner* transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti

CRAIG J. COATES, NIJOLE JASINSKIENE*, LINDA MIYASHIRO, AND ANTHONY A. JAMES†

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Bio Sci II, Room 3205, University of California, Irvine, CA 92697-3900

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 95, pp. 3743–3747, March 1998
Genetics

Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly

NIJOLE JASINSKIENE*†, CRAIG J. COATES*, MARK Q. BENEDICT‡, ANTHONY J. CORNEL‡§, CRISTINA SALAZAR RAFFERTY‡, ANTHONY A. JAMES*, AND FRANK H. COLLINS‡¶

Elementos genéticos móveis ou de transposição



Barbara McClintock
Prêmio Nobel de
Fisiologia/Medicina (1983)

Elementos de transposição de classe II (1.3 a 3 Kb)

10-30 repetições terminais invertidas

Unidade transcricional interna codifica a transposase

Promove o “corta e cola”

Edição de DNA – CRISPr/CAs9:

Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*

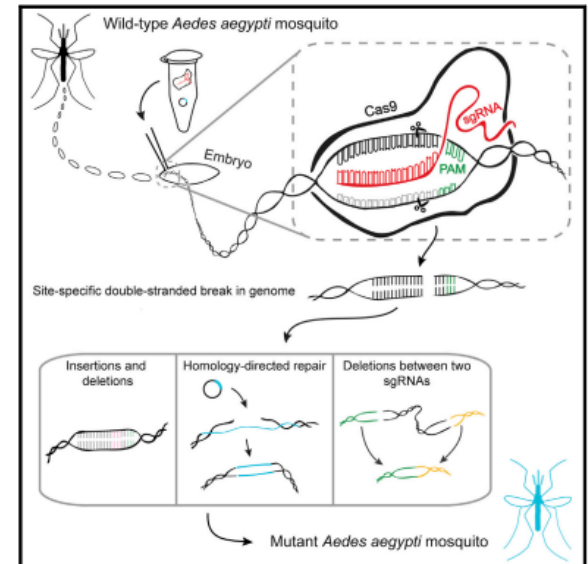
Kathryn E. Kistler,¹ Leslie B. Vosshall,^{1,2} and Benjamin J. Matthews^{1,2,*}

¹Laboratory of Neurogenetics and Behavior, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10065, USA

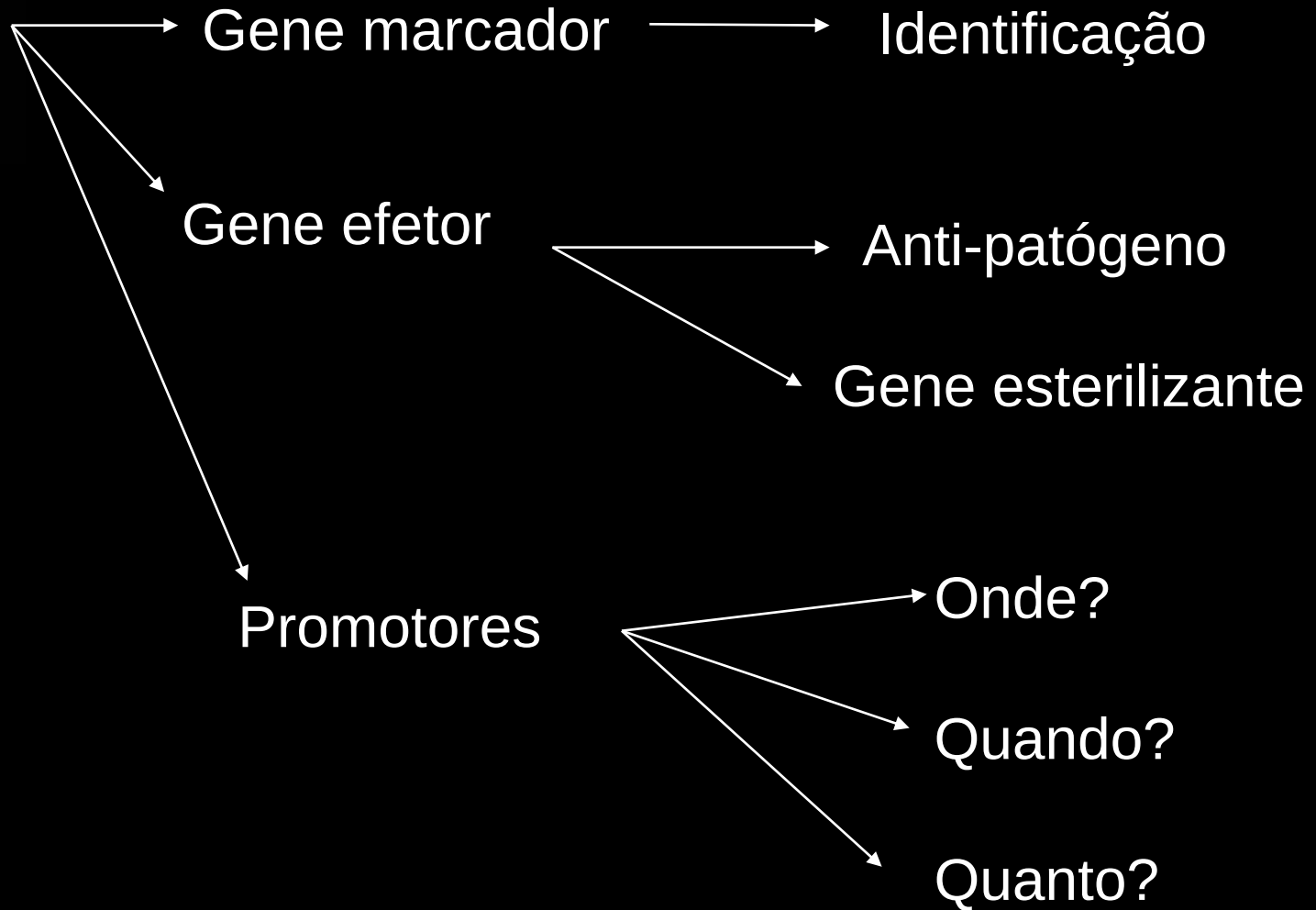
²Howard Hughes Medical Institute, 1230 York Avenue, New York, NY 10065, USA

Kistler et al., 2015, Cell Reports 11, 51–60

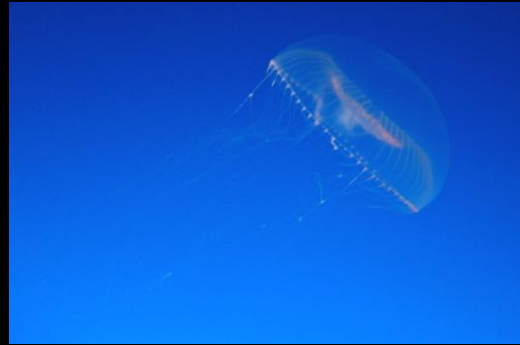
April 7, 2015 ©2015 The Authors



Desenho e construção de genes:

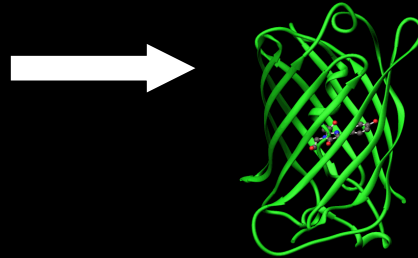


Identificação do mosquito transformado...



Água-viva
Aequorea victoria

Osamu Shimomura
Prêmio Nobel de Química (2008)



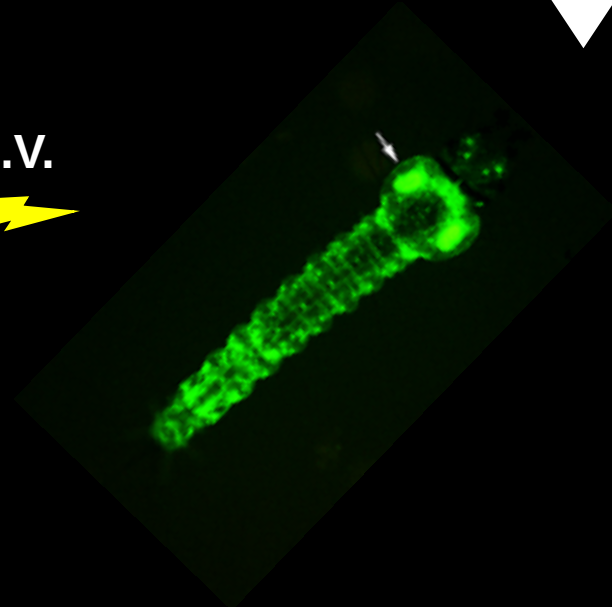
Green Fluorescent protein
(GFP)



Gene GFP



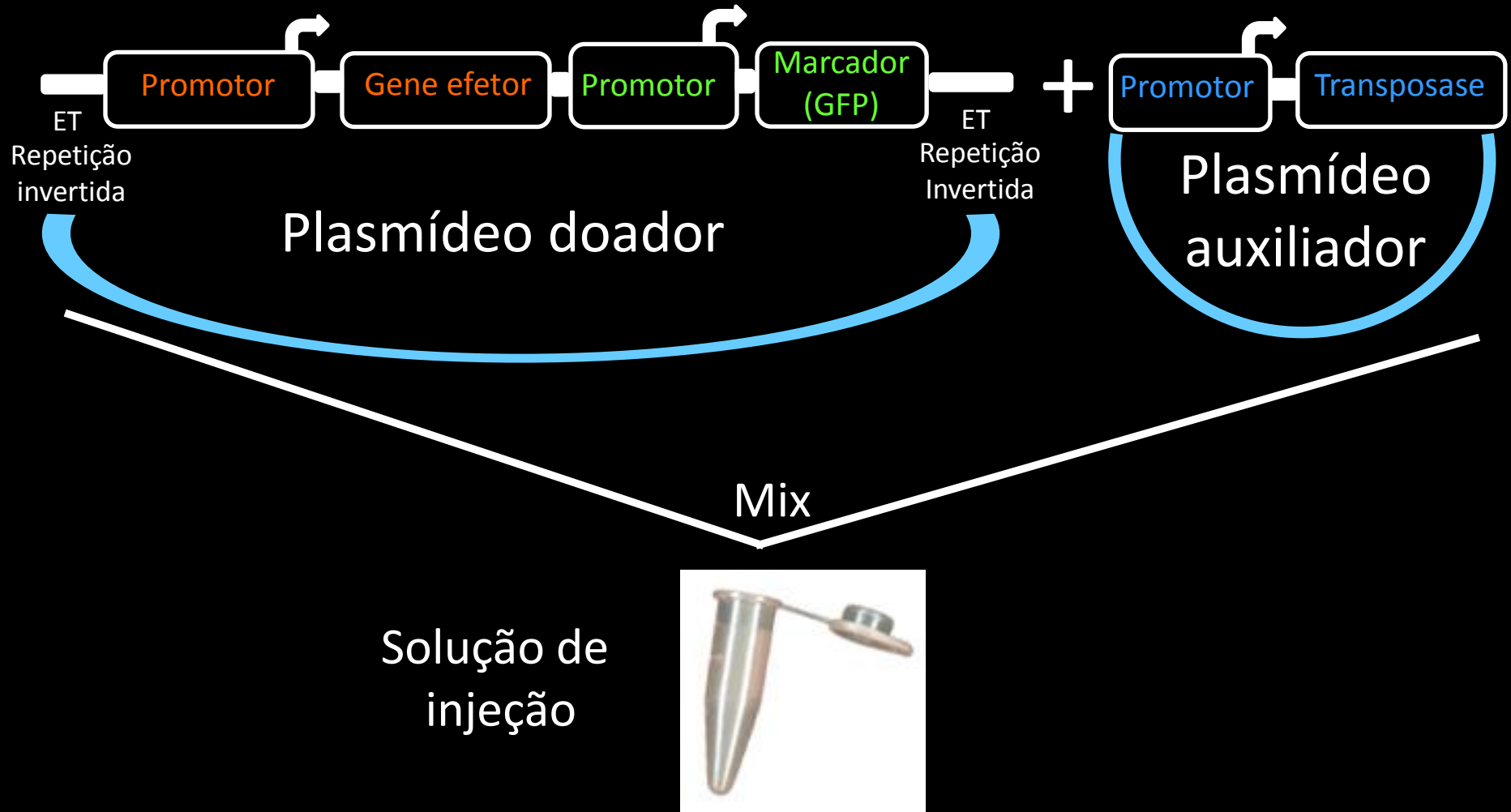
U.V.



• Sistema de transposição bipartido:

1- Plasmídeo doador

2- Plasmídeo auxiliador (codifica a transposase)



Microinjeção de ovos embrionados



Capilar de vidro



Estirador de capilar

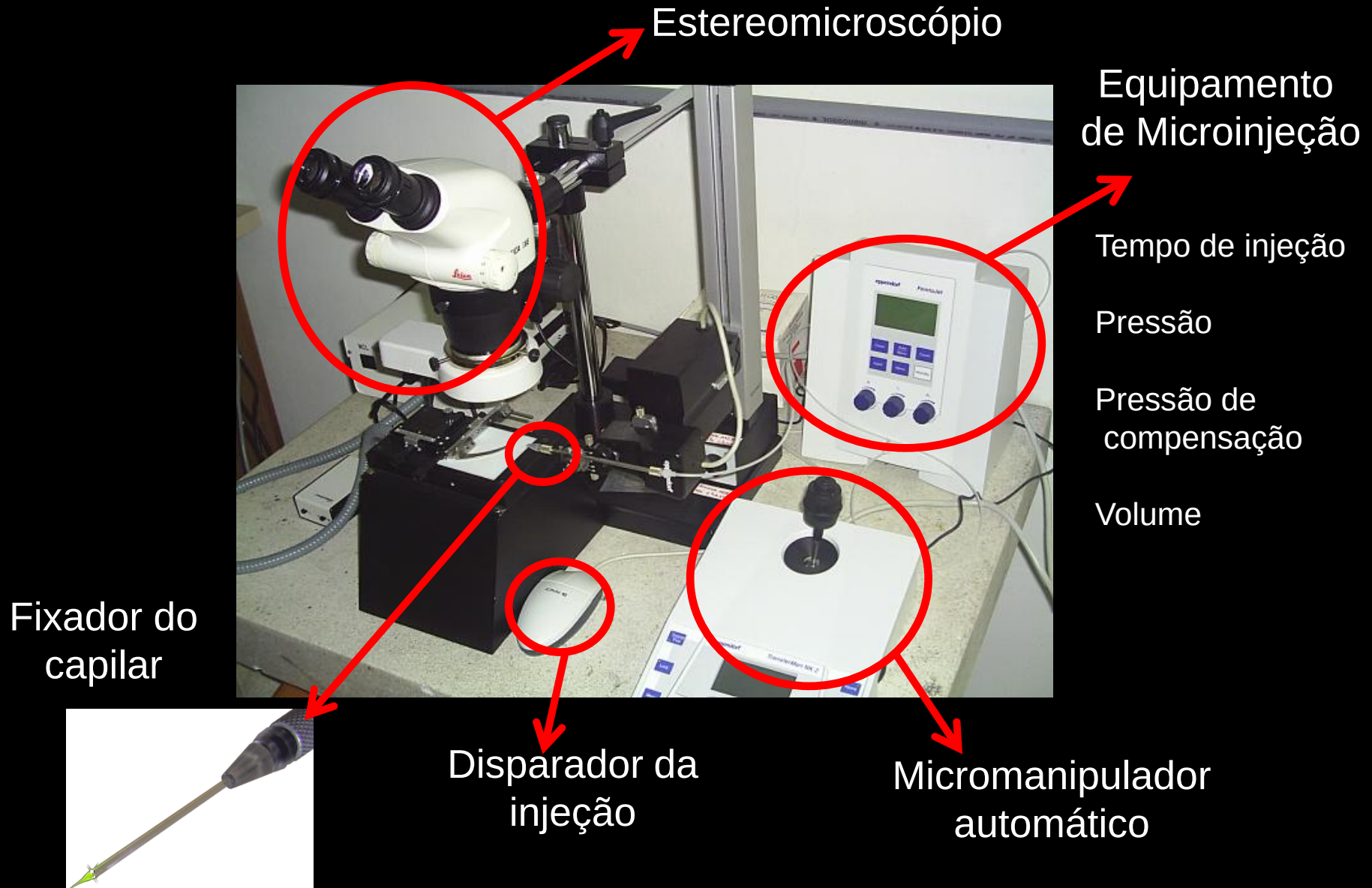


Agulha de vidro



O ponto mais importante de uma boa injeção
é a qualidade da agulha

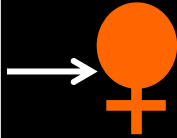
Sistema de microinjeção:



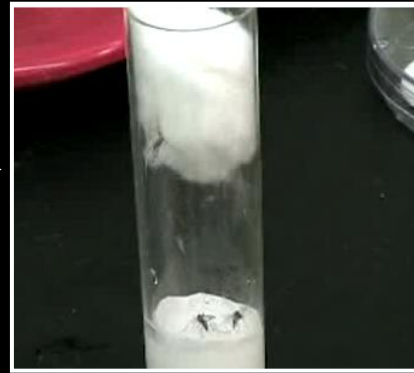
Protocolo de microinjeção:



1-3 dias



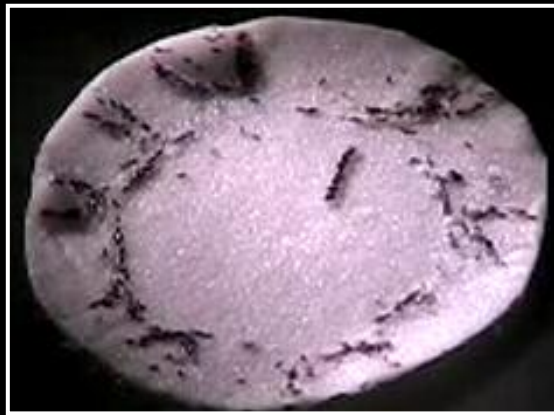
3 dias



Tubo plástico
com algodão úmido
e papel filtro

1h e
15min

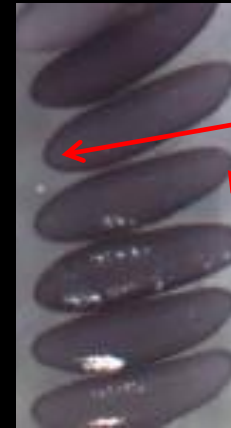




Sob lupa:
Alinhar os ovos
(Pincel de pintura fino)

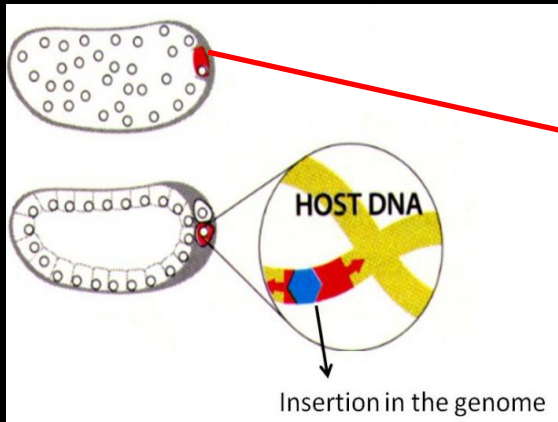


Usar ovos cinzas
ou
Cinza-escuros



Mesma
orientação

Pólo anterior é
levemente
mais largo
que o
Pólo posterior



Injeção é feita no pólo posterior

Células
Precursoras da
linhagem
germinativa

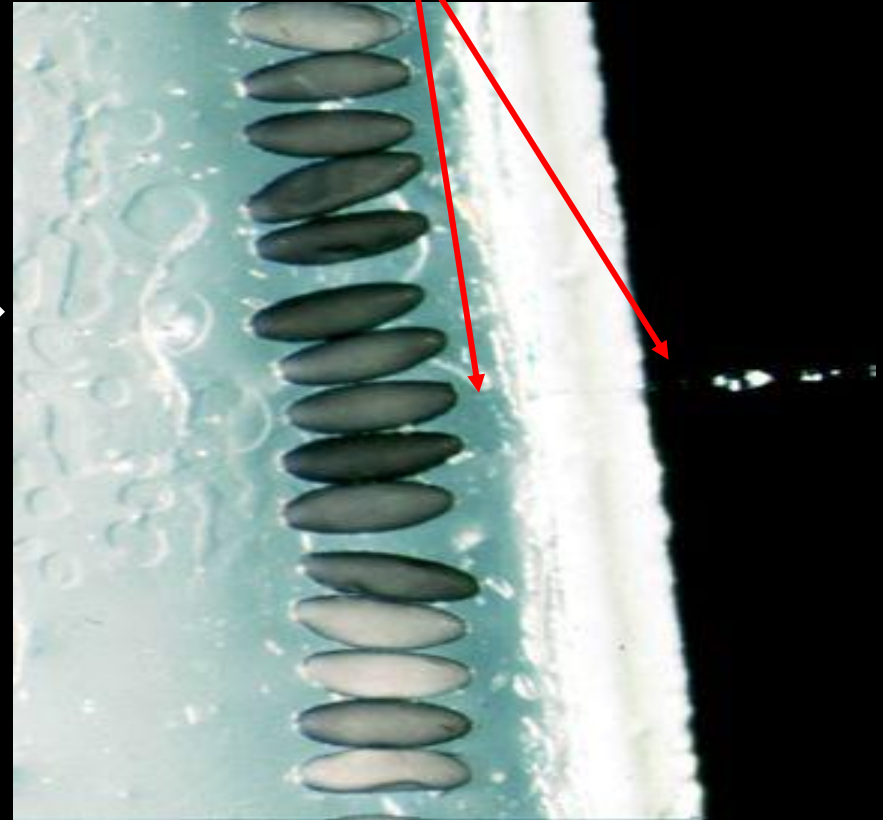


Produzirão gametas
na fase adulta



Estável X Transiente

- 1- Dessecar os embriões em torno de 1 minuto
- 2- Cobrir com óleo – Parar dessecação



Agulha de vidro

Após microinjeção:

→ 4-5 dias - Eclosão dos ovos microinjetados

↓
Desenvolvimento até fase adulta

↓
Adultos G0 injetados X Mosquitos selvagens



↓
Desenvolvimento da progênie
até larva L4

↓
Triagem de larvas G1
(uma por uma)
Detecção do marcador
Ex.: **GFP**

Pools de machos

1 ♂ Injetado : 10 ♀ Selvagens

Pools de fêmeas

10 ♀ Injetadas : 10 ♂ Selvagens



Esteromicroscópio
fluorescente
com
Filtro **GFP**

Adultos **GFP** positivos X Selvagens → Estabelecimento da linhagem

• Experimentos de microinjeção:

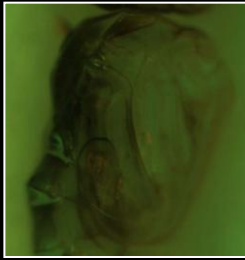
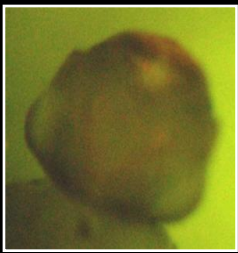
Construção	Numero de embriões	Adultos G0	Larvas Triagem G1	Positivas (GFP) G1	Linhagem Transgênica
<i>pMos</i> [3XP3-eGFP-AeVg-Malt-Micro]	665	63	4.221	37	2
	87	20	968	9	2

Larva

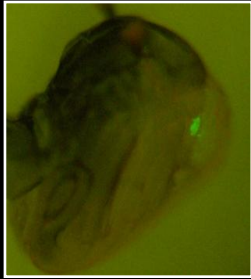
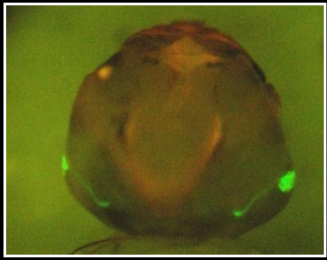
Pupa

Adulto

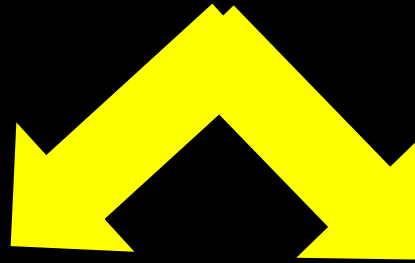
Selvagem



Positivo GFP



TRANSGENIA DE MOSQUITOS



**SUPRESSÃO
DE
POPULAÇÃO**

**NÃO HÁ INTRODUÇÃO
DO TRANSGENE NA
POPULAÇÃO**

GENE ESTERILIZANTE

AUTO-LIMITANTE

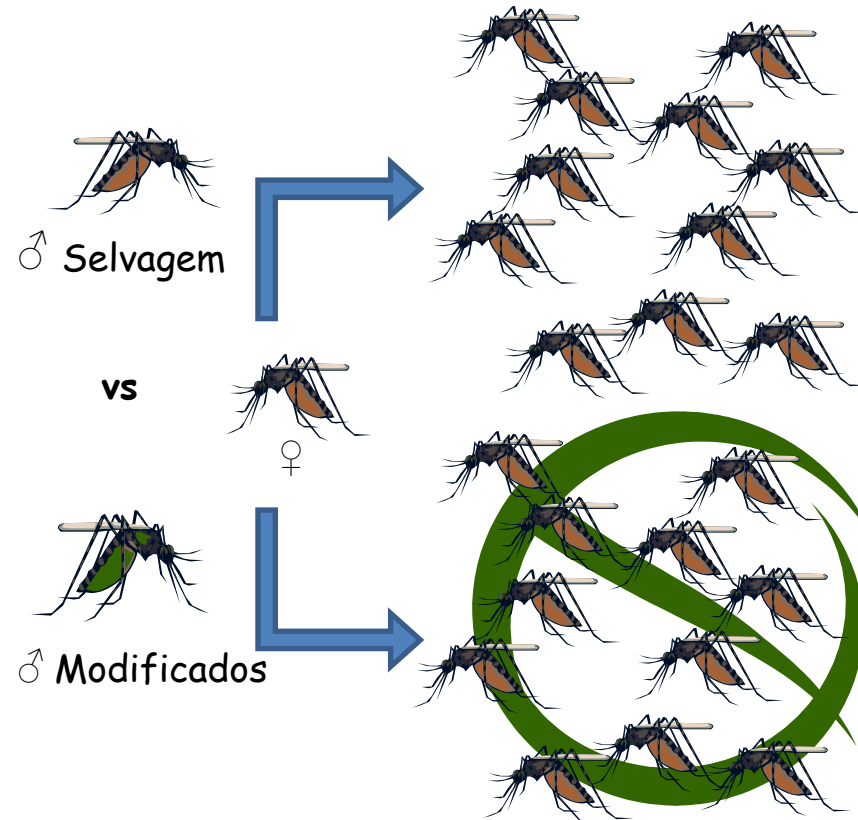
**SUBSTITUIÇÃO
DE
POPULAÇÃO**

**HÁ INTRODUÇÃO DO
TRANSGENE NA
POPULAÇÃO**

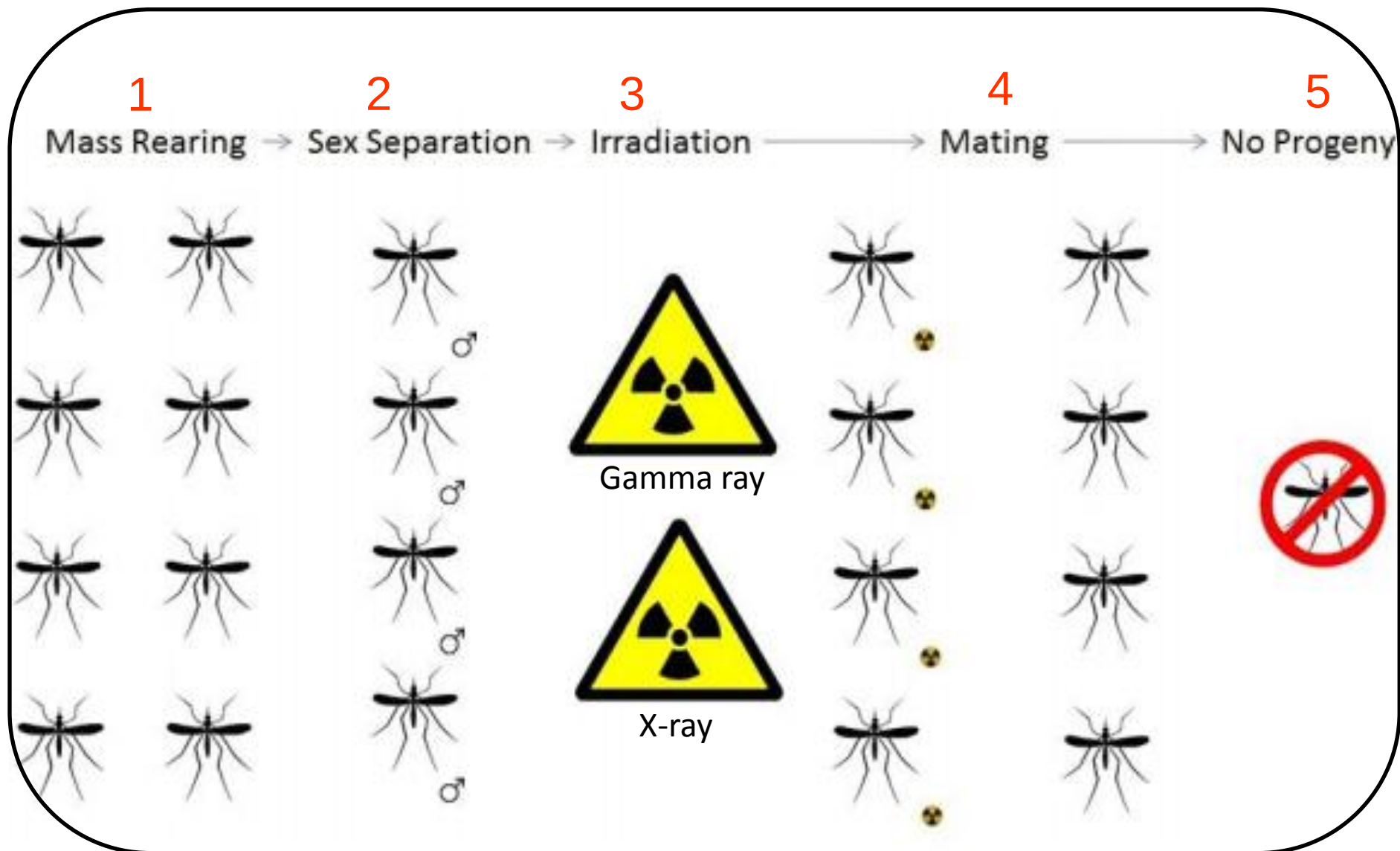
GENE ANTI-PATÓGENO

AUTO -SUSTENTÁVEL

SUPRESSÃO DA POPULAÇÃO



Técnica do Inseto Estéril (SIT)



Técnica do Inseto Estéril (SIT)

1. Esterilização do Macho



Irradiação

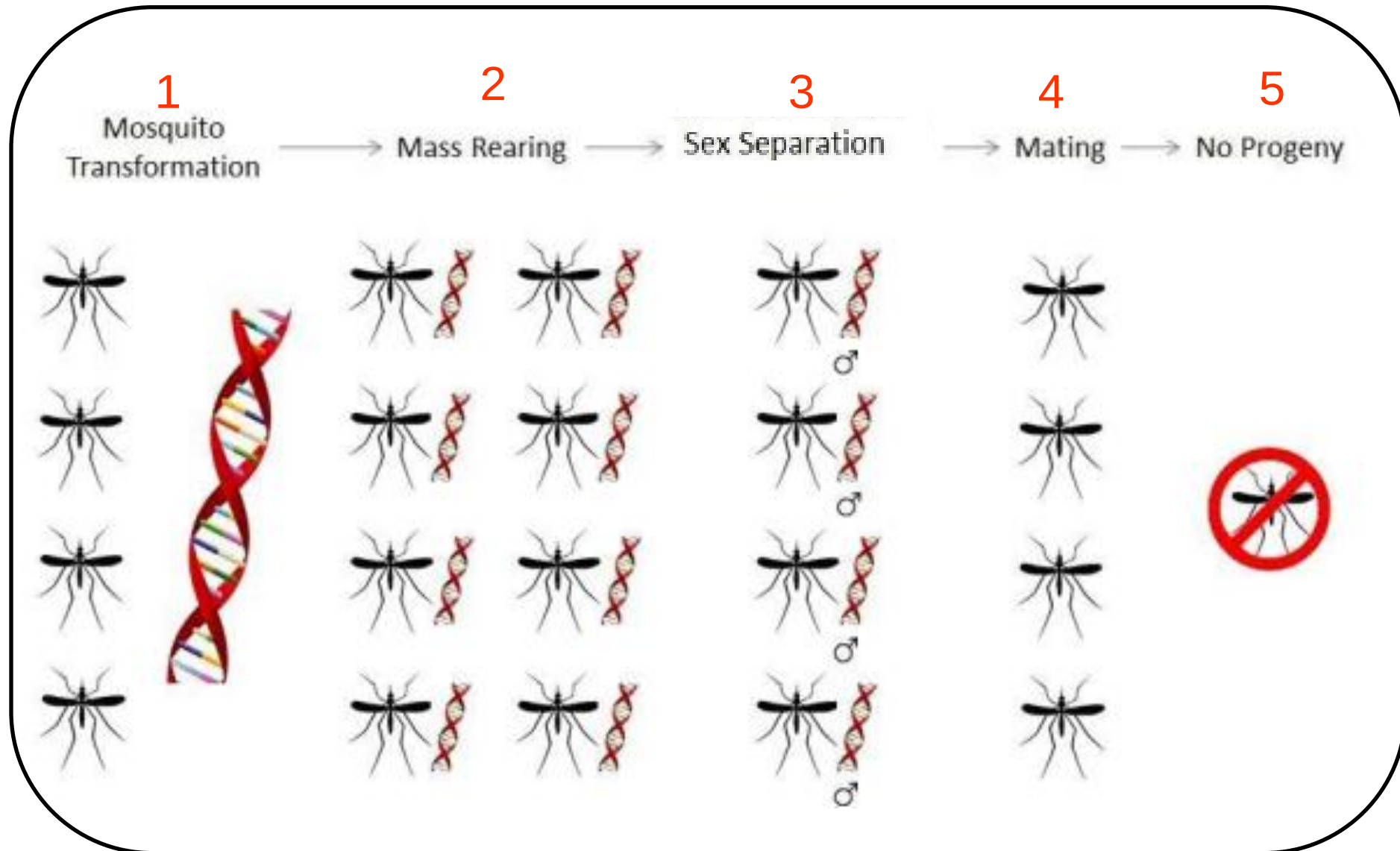
2. Liberação



3. Supressão da População

- Criação em massa
 - Separação por sexo
 - Esterilização
 - Transporte
 - Liberação
 - Cópulas/Machos estéreis
- = Prole inviável**

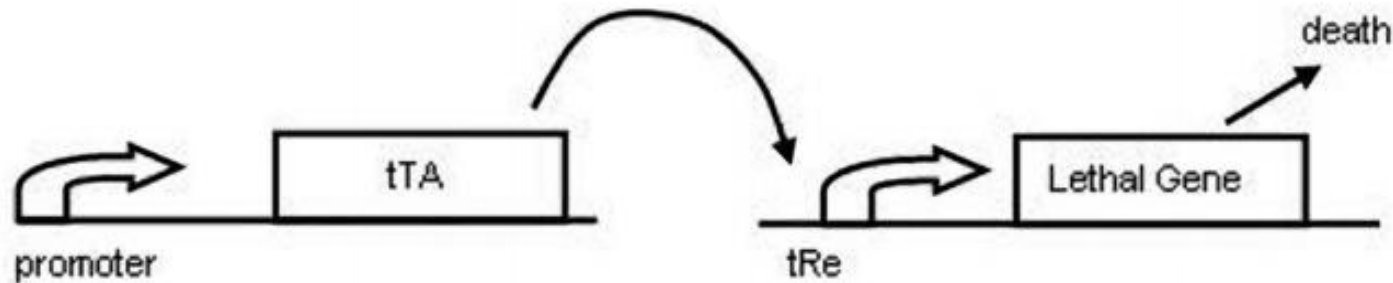
Evolução do SIT pelo uso de transgenia



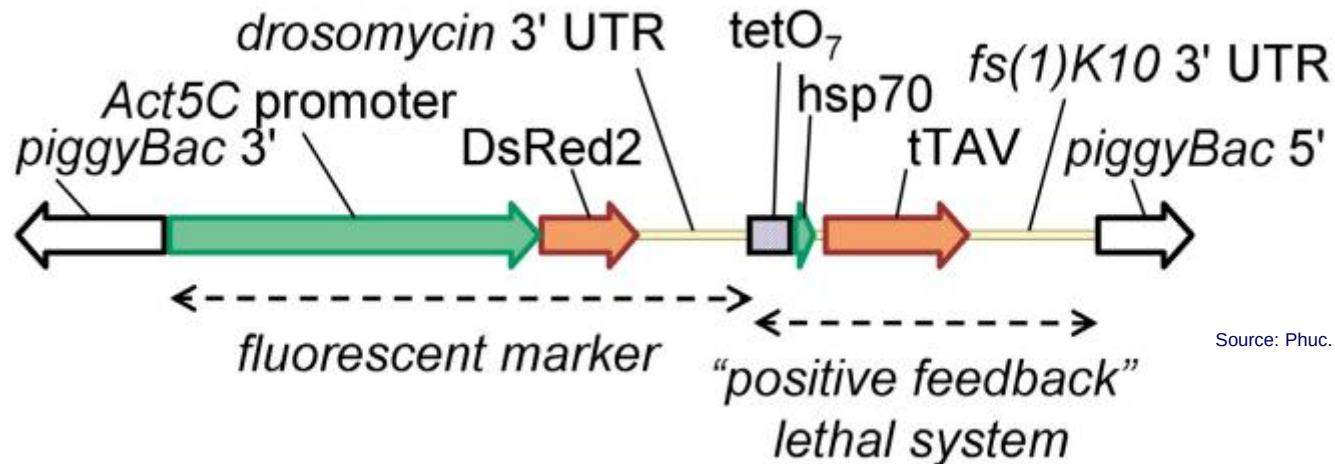
Liberação de insetos carregando gene letal dominante (RIDL®: Release of Insects with Dominant Lethality)

- Sistema condicional:

OXITEC Biotech (UK)
OX513A



Source: Alphey, 2002; Wilke & Marrelli 2012

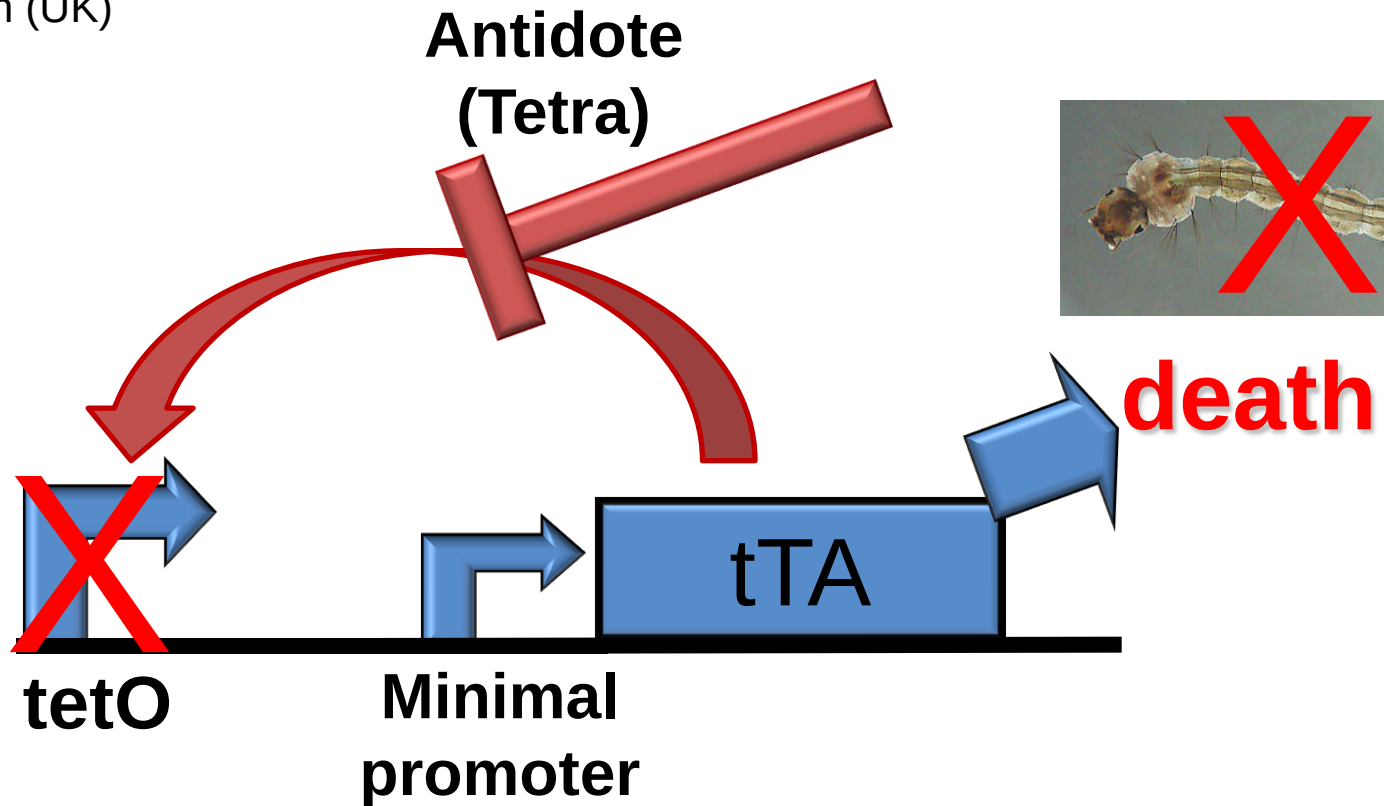


Source: Phuc. et al, 2007

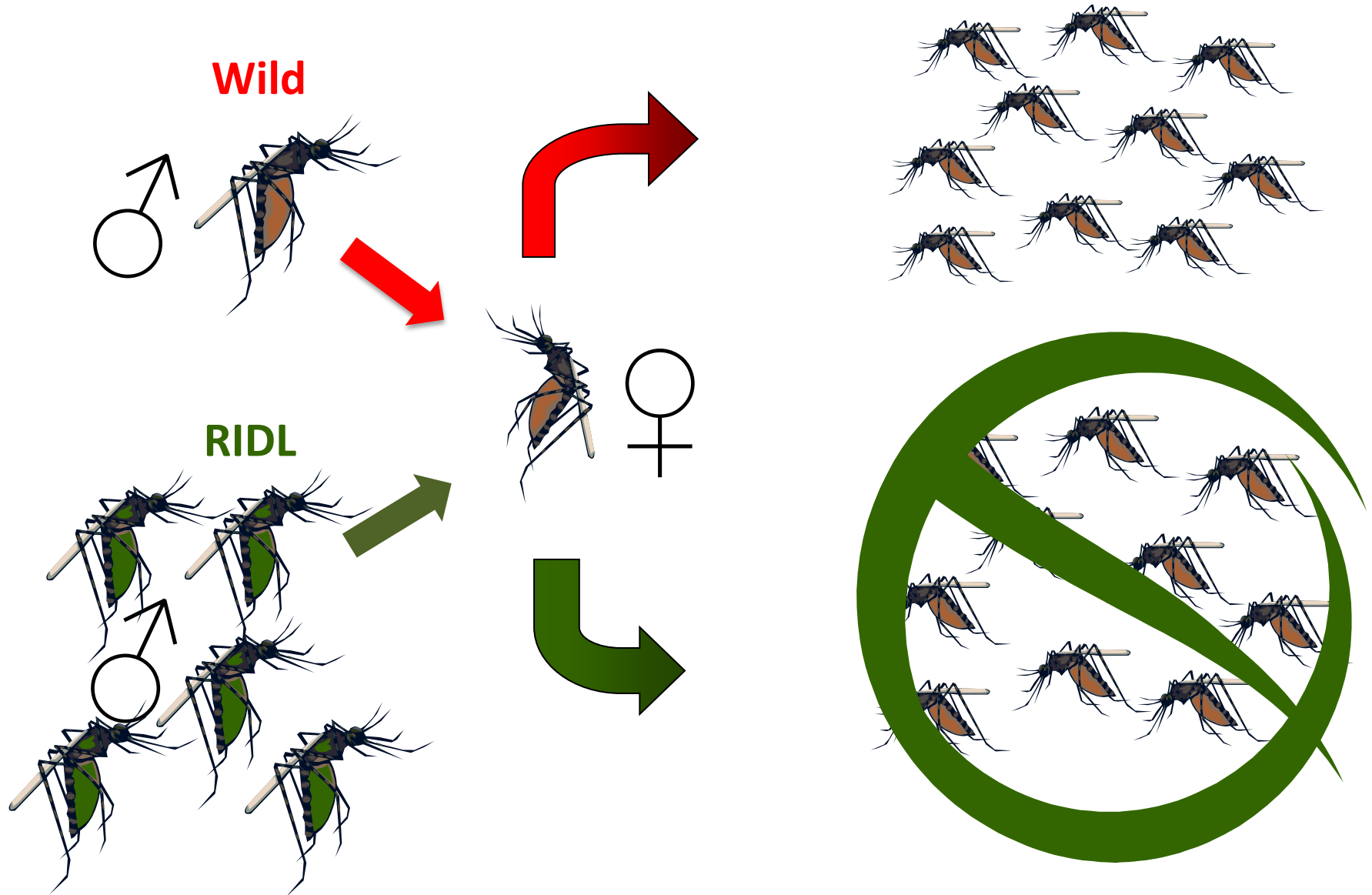
Liberação de insetos carregando gene letal dominante (RIDL®: Release of Insects with Dominant Lethality)

- Sistema condicional:

OXITEC Biotech (UK)
OX513A



Supressão – Liberação inundativa:



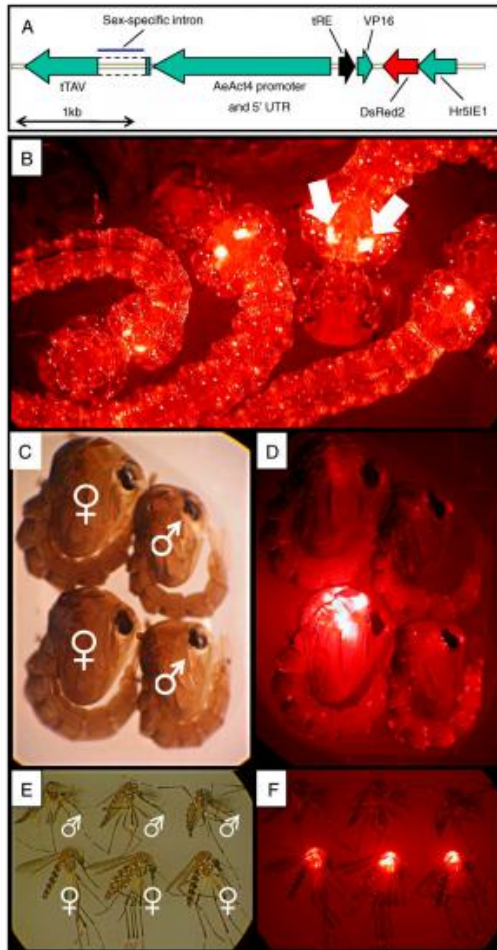


Female-specific flightless phenotype for mosquito control

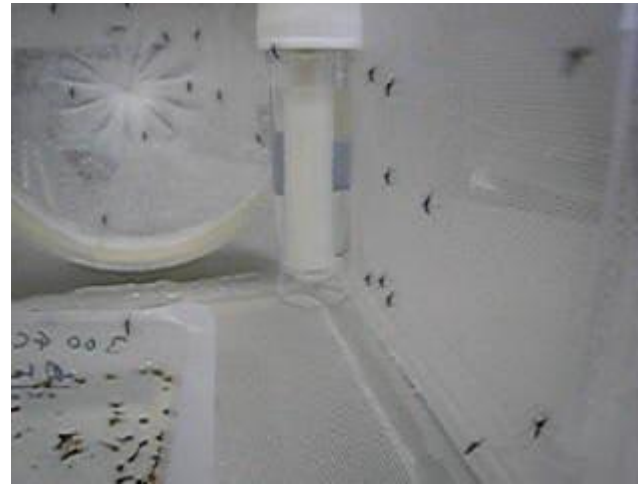
Guoliang Fu^{a,b,1}, Rosemary S. Lees^{a,b,1}, Derric Nimmo^{a,1}, Diane Aw^c, Li Jin^{a,b}, Pam Gray^a, Thomas U. Berendonk^b, Helen White-Cooper^b, Sarah Scaife^a, Hoang Kim Phuc^c, Osvaldo Marinotti^c, Nijole Jasinskiene^c, Anthony A. James^{c,d,2}, and Luke Alphey^{a,b,2}

^aOxitec Limited, 71 Milton Park, Oxford OX14 4RX, United Kingdom; ^bDepartment of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, United Kingdom; ^cDepartment of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, Irvine, CA 92697-3900; and ^dDepartment of Microbiology and Molecular Genetics, University of California, Irvine, CA 92697-3900

Contributed by Anthony A. James, January 14, 2010 (sent for review September 11, 2009)



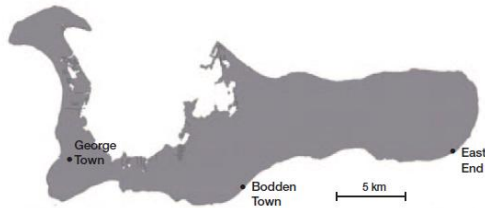
Com Tetraciclina



Sem Tetraciclina



O primeiro teste em campo da OX513A – Machos RIDL:



- Ilhas Cayman - UK
- 41.200 habitantes
- 23 semanas - 2010-2011
- 3,3 milhões de machos liberados
- 80% de supressão

Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes

VOLUME 30 NUMBER 9 SEPTEMBER 2012 **NATURE BIOTECHNOLOGY**

Angela F Harris^{1,2}, Andrew R McKemey³,
Derric Nimmo³, Zoe Curtis³, Isaac Black^{3,4},
Siân A Morgan³, Marco Neira Oviedo³,
Renaud Lacroix³, Neil Naish³, Neil I Morrison³,
Amandine Collado^{3,4}, Jessica Stevenson³,
Sarah Scaife³, Türieg Dafaïalla³,
Guoliang Fu^{3,4}, Caroline Phillips³,
Andrea Miles³, Norzahira Raduan^{3,5},
Nick Kelly¹, Camilla Beech³, Christl A Donnelly⁶,
William D Petrie¹ & Luke Alphe^{3,4}

SUPRESSÃO
DA
POPULAÇÃO

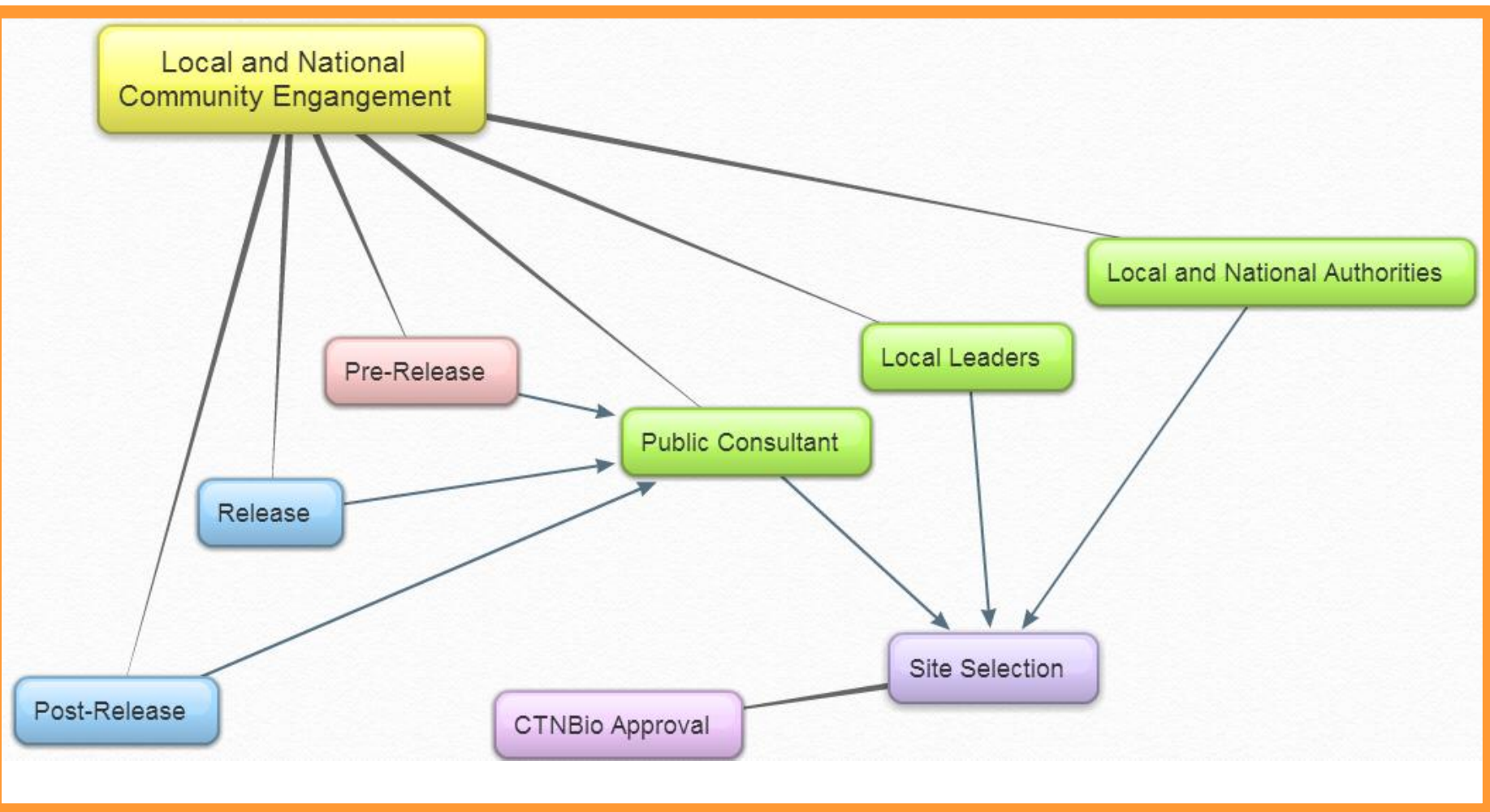


Projeto Aedes Transgênico



Liberação de *Aedes aegypti* OX513
Avaliação da linhagem transgênica no Brasil

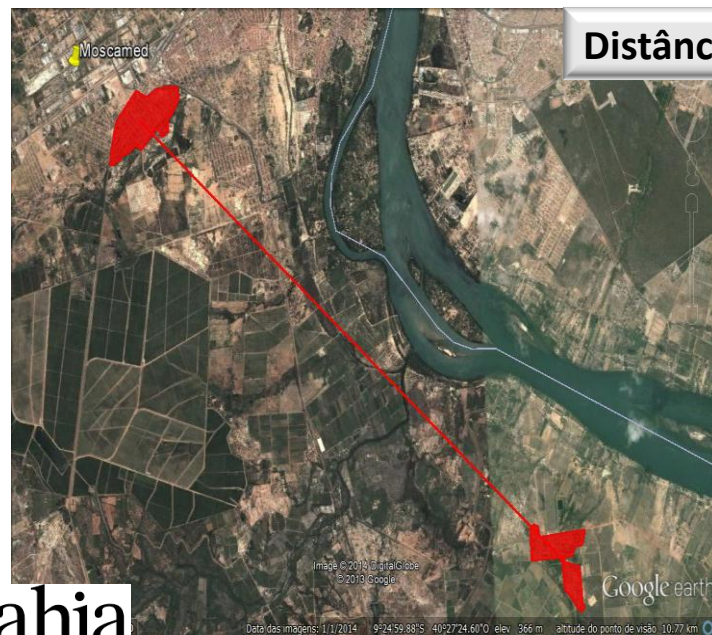
As atividades do projeto:



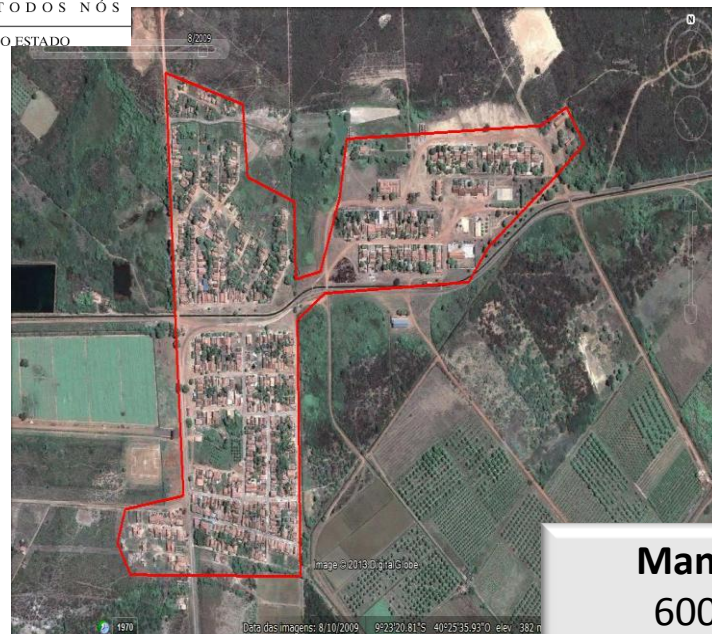
Locais:
Juazeiro
Bahia



Distância ~ 15 Km



Itaberaba
1400 casas
550 km²



Mandacaru
600 casas
360 km²

Unidade de produção de *Aedes aegypti* (UPAT)



COLÔNIAS
4 A 6 milhões de ovos/
semana

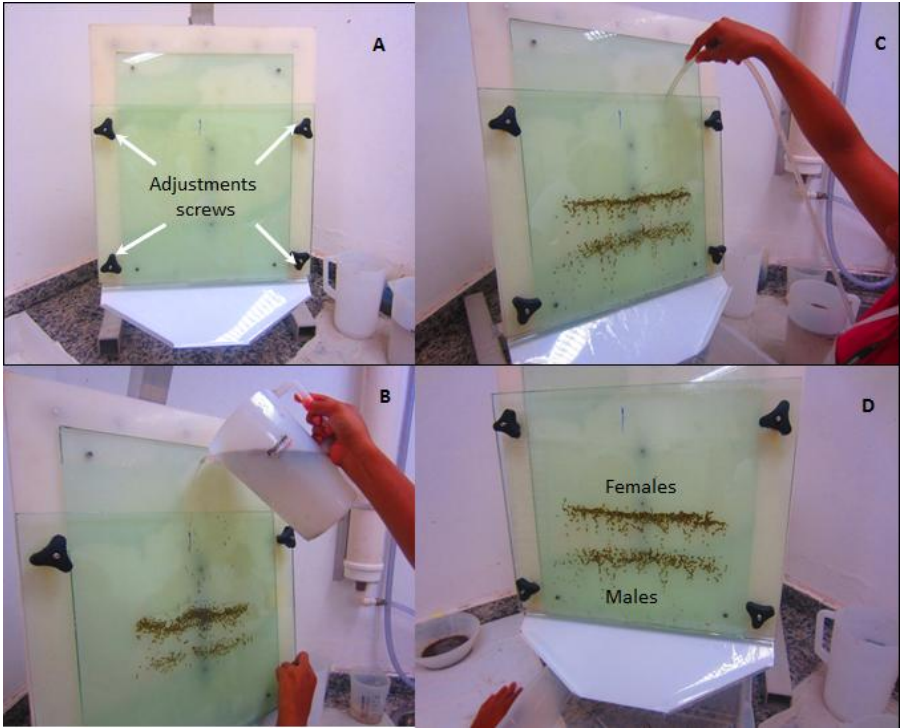
Machos - liberação
1 milhão/semana

Processo de criação em massa:

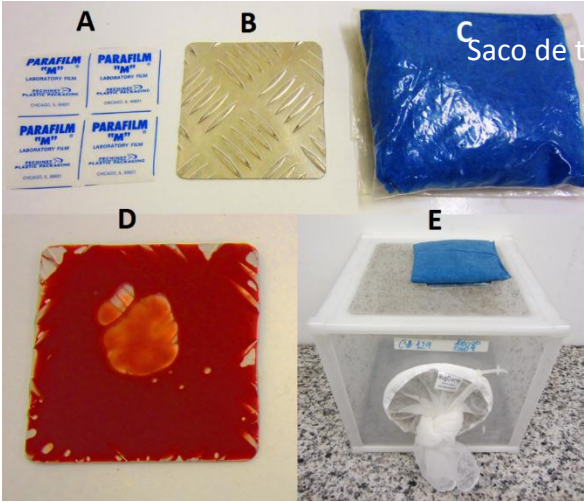
Video Article

Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil

Danilo O. Carvalho^{1,2}, Derric Nimmo¹, Neil Naish¹, Andrew R. McKemey¹, Pam Gray¹, André B. B. Wilke³, Mauro T. Marrelli³, Jair F. Virginio⁴, Luke Alphey^{1,5}, Margareth L. Capurro^{2,6}



Fay, Morlan. Mosq News 19: 144–147, 1959



Controle de
qualidade

Produção -> Liberação -> Monitoramento:

Colônia



Geração para liberação



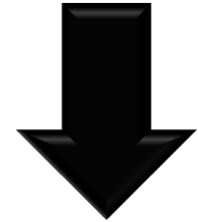
Ovos -> Pupas
1 milhão/semana

Separação de pupas machos



Controle de qualidade

Distribuição em potes de liberação



Liberações de Machos adultos



Armadilha de ovos

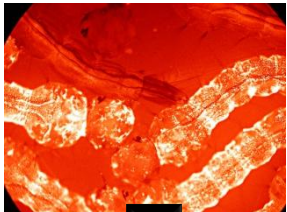


Monitoramento

Armadilha de adultos



Eclosão dos ovos



Larvas analisadas
Presença marcador fluorescente

Resultados do projeto:

RESEARCH ARTICLE

Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes

Danilo O. Carvalho^{1,2}, Andrew R. McKemey^{1*}, Luiza Garziera³, Renaud Lacroix¹, Christi A. Donnelly⁴, Luke Alphey^{1,5,6}, Aldo Malavasi³, Margareth L. Capurro^{2,7}

1 Oxitec Ltd, Abingdon, Oxfordshire, United Kingdom, **2** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, **3** Moscamed Brasil, Juazeiro, Bahia, Brasil, **4** Medical Research Council Centre for Outbreak Analysis and Modelling, Department of Infectious Disease Epidemiology, Faculty of Medicine, Imperial College London, St Mary's Campus, London, United Kingdom, **5** Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **6** The Pirbright Institute, Pirbright, Woking, Surrey, United Kingdom, **7** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, Brasil

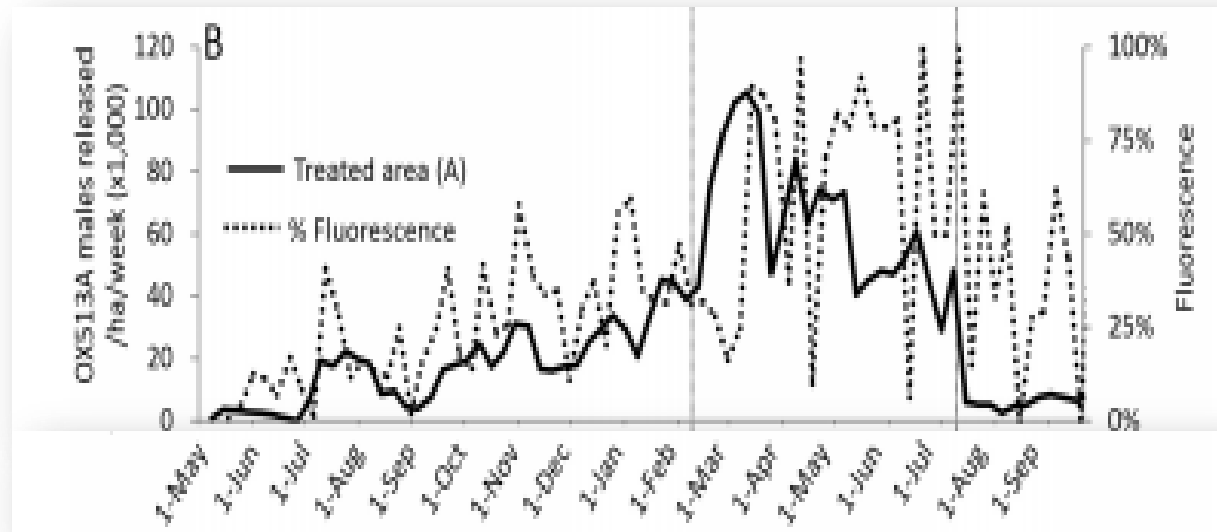
These authors contributed equally to this work.

* andrew.mckemey@oxitec.com

PLOS Neglected Tropical Diseases | DOI:10.1371/journal.pntd.0003864 July 2, 2015

- 2011-2013
- Liberações: 1 ano e 5 meses
- 26 milhões de machos liberados
- Supressão:

Índice de ovitrampa: 81%
(95% CI: 74.9-85.2%)



Novo Projeto – Jacobina/Bahia



**80 mil
habitantes**

Outros testes da OX513 no mundo:

OPEN ACCESS Freely available online



Open Field Release of Genetically Engineered Sterile Male *Aedes aegypti* in Malaysia

Renaud Lacroix^{1,2,3}, Andrew R. McKemey^{2,3}, Norzahira Raduan^{1,3}, Lim Kwee Wee³, Wong Hong Ming³, Teoh Guat Ney³, Siti Rahidah A.A.³, Sawaluddin Salman³, Selvi Subramaniam³, Oreenaiza Nordin³, Norhaida Hanum A.T.³, Chandru Angamuthu³, Suria Marlina Mansor³, Rosemary S. Lees⁴, Neil Naish², Sarah Scaife², Pam Gray², Geneviève Labbé², Camilla Beech², Derric Nimmo², Luke Alphey^{2,5*}, Seshadri S. Vasan^{1,4}, Lee Han Lim^{3*}, Nazni Wasi A.³, Shahnaz Murad³

Research Article

SCI

Received: 11 August 2015 Revised: 8 September 2015 Accepted article published: 16 September 2015 Published online in Wiley Online Library: 16 October 2015

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.4151

Short-term suppression of *Aedes aegypti* using genetic control does not facilitate *Aedes albopictus*

Kevin Gorman,^{a*} Josué Young,^b Lleysa Pineda,^b Ricardo Márquez,^b Nestor Sosa,^b Damaris Bernal,^b Rolando Torres,^b Yamilitzel Soto,^b Renaud Lacroix,^a Neil Naish,^a Paul Kaiser,^a Karla Tepedino,^a Gwilym Philips,^a Cecilia Kosmann^a and Lorenzo Cáceres^b

HEALTH

FDA APPROVES GENETICALLY MODIFIED MOSQUITOES FOR RELEASE IN FLORIDA

THE METHOD WOULD TARGET THE AEDES AEGYPTI MOSQUITOES THAT TRANSMIT ZIKA AND OTHER DISEASES

By Claire Maldarelli August 5, 2016

Press release: Oxitec and Piracicaba City Hall Start Downtown Release of Friendly™ *Aedes*

July 19, 2016

Malasia

- 2011- área sem habitantes
- Estudos de sobrevivência e dispersão

Panama

- Abril – Outubro 2014
- Supressão entre 78-86%
- Abundância de *Ae. albopictus* não foi afetada

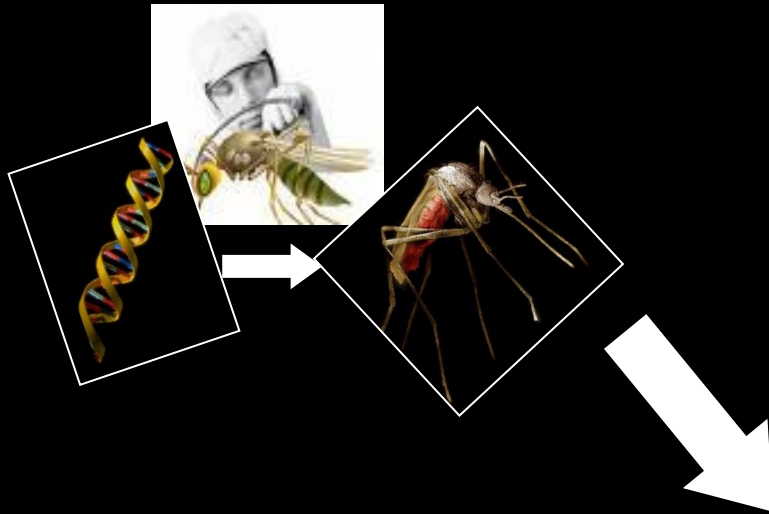
USA – aprovação do FDA – Agosto de 2016

- Nenhum impacto significativo - Riscos
- Aprovações adicionais do Florida Keys Mosquito Control District

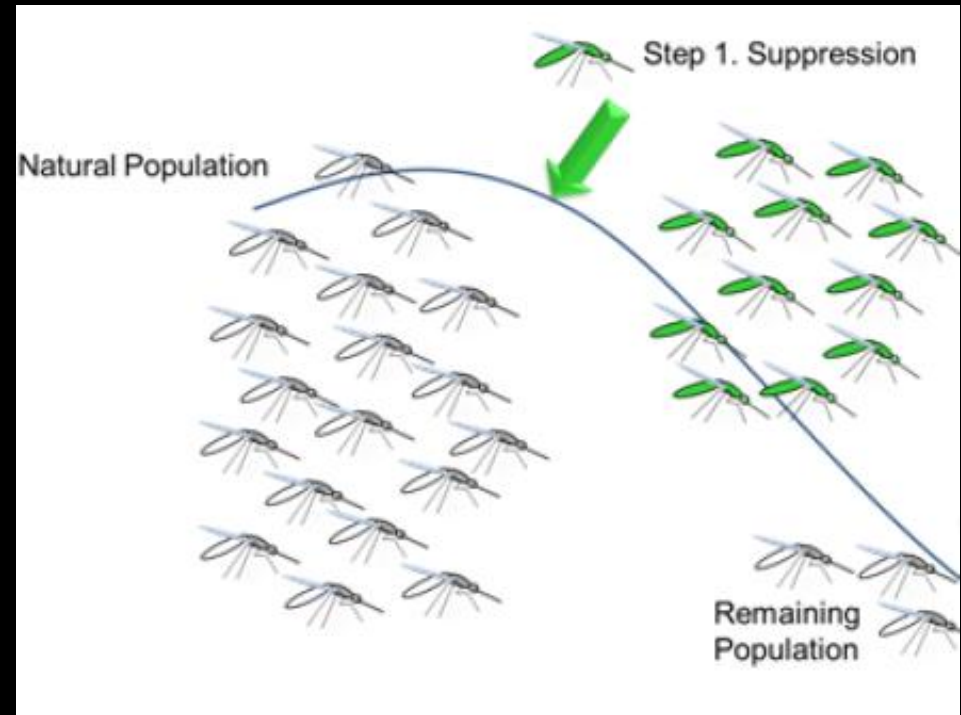
Brazil - Piracicaba

- Testes em campo - Oxitec

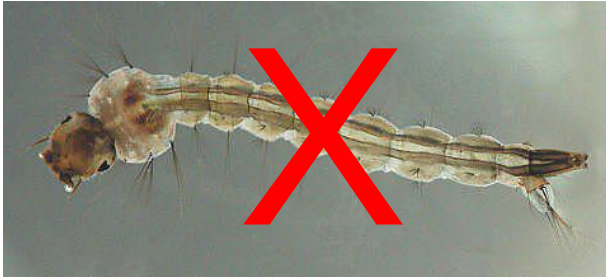
How to improve *Aedes aegypti* transgenic lines for population suppression?



**POPULATION
SUPPRESSION**



How to improve *Aedes aegypti* transgenic lines for population suppression?



- RIDL – Death at late stages
- Problem for surveillance
- Infestation index



- Mosquito mass production
- Tetracycline

Producing sterile male strain

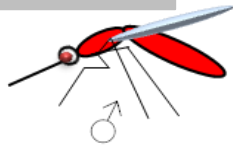
- No larvae
- Use of tetracycline only for colonies.
- Sterile conditional construct (SCC

Conditional Genetic Sterilization

Gene condition: DEACTIVATED

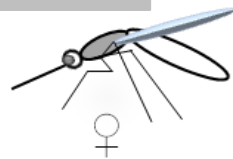


Transgenic



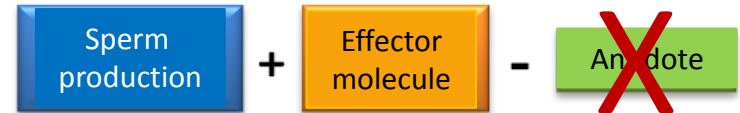
Release

Wild

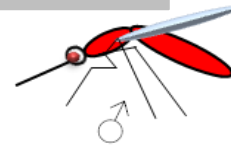


Viable eggs

Gene condition: ACTIVATED

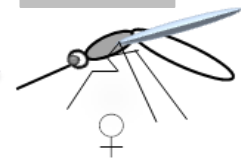


Transgenic



Release

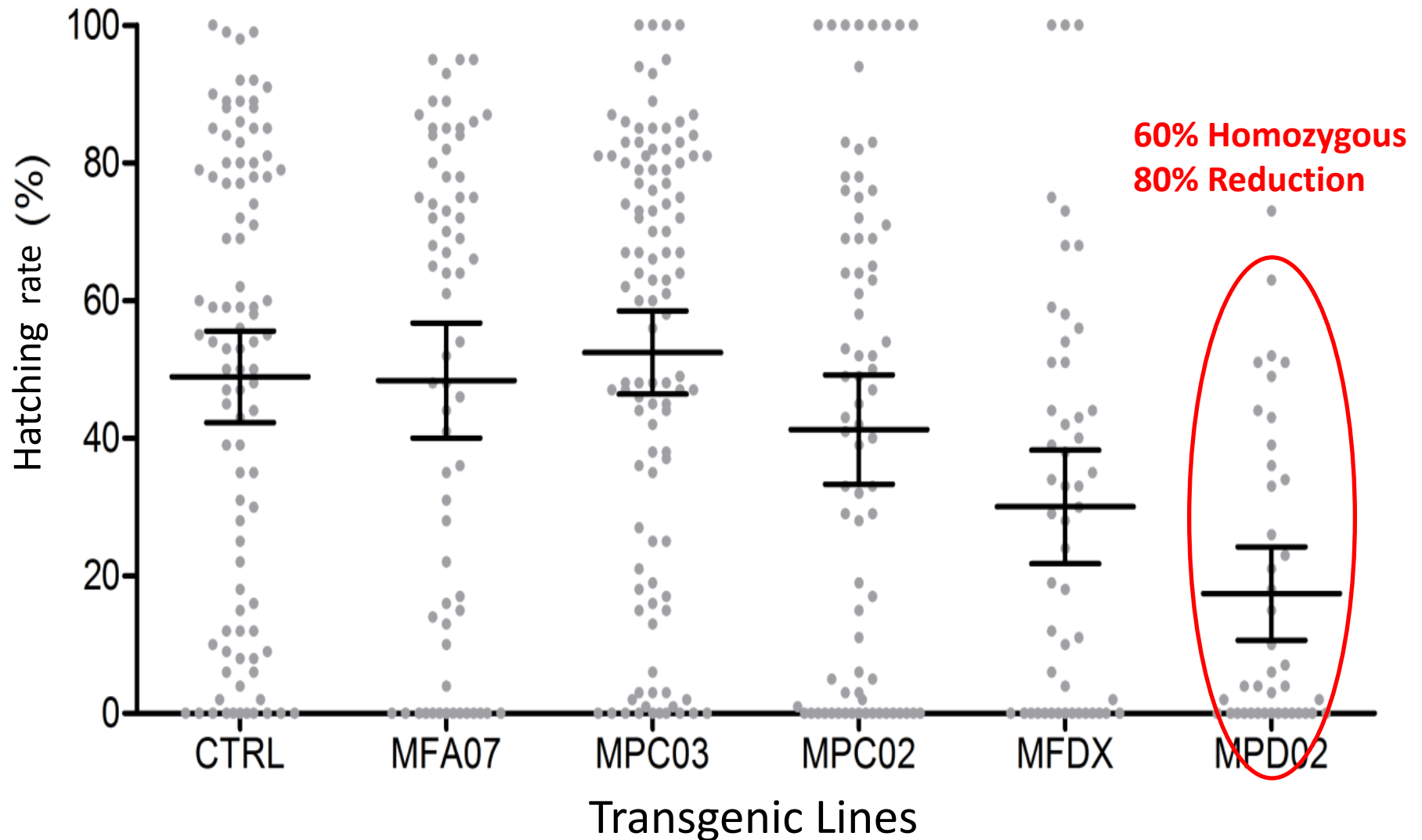
Wild



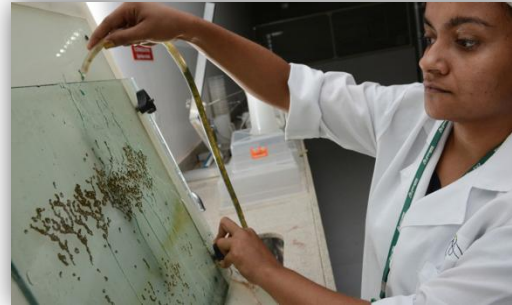
Unviable eggs

Viable eggs

Sterile Conditional Construct (SCC) – Transgenic lines:



How to improve transgenic lines of *Aedes aegypti* for population suppression?

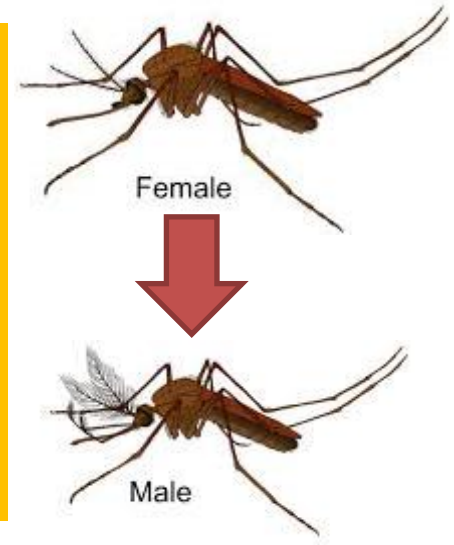


- Mosquito mass production
- Sex separation – Male release

- Time consuming
- Cost-ineffective

Producing Genetic Sexing Strain

- Sex conversion – Females to Males
- Manipulating the sex determining pathway





SUPRESSÃO DA POPULAÇÃO

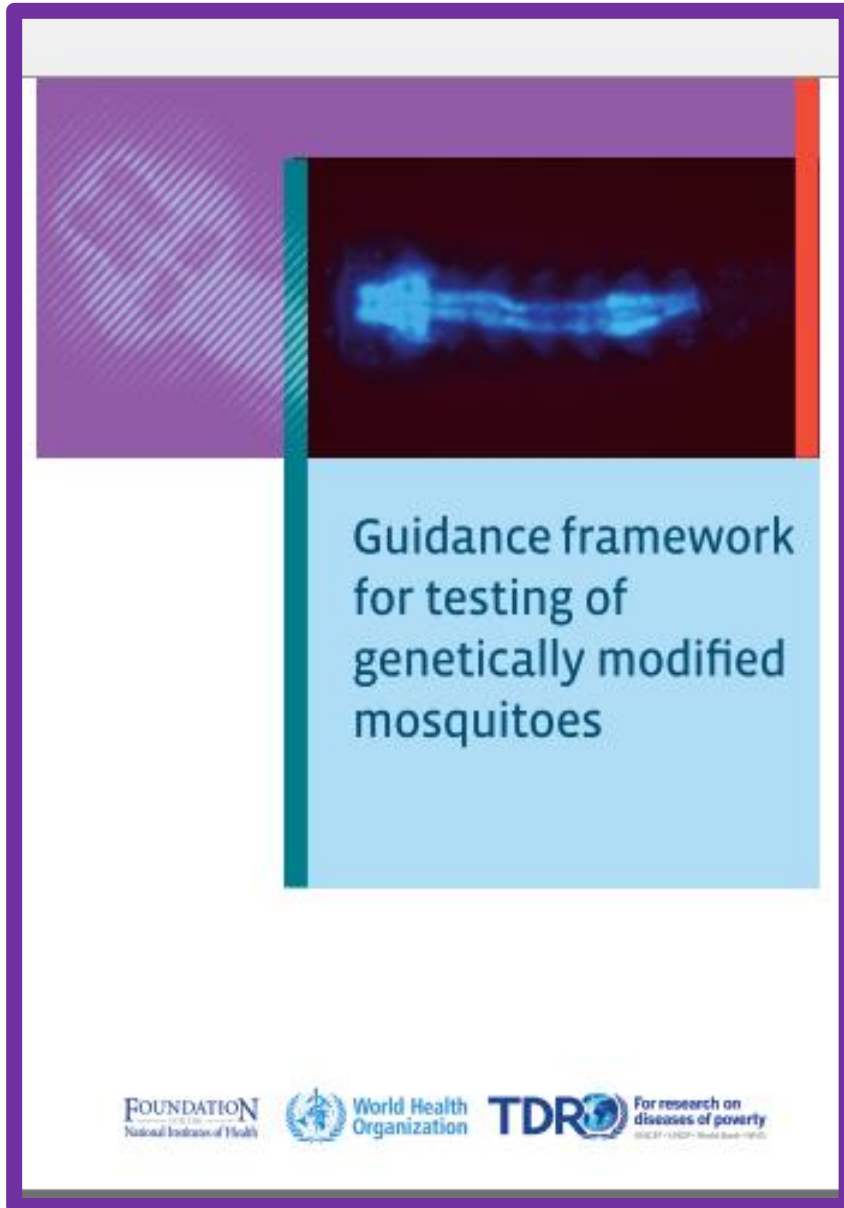
Em aplicação!

Reintrodução

Liberações constantes

“Inseticida”

TDR/World Health Organization:

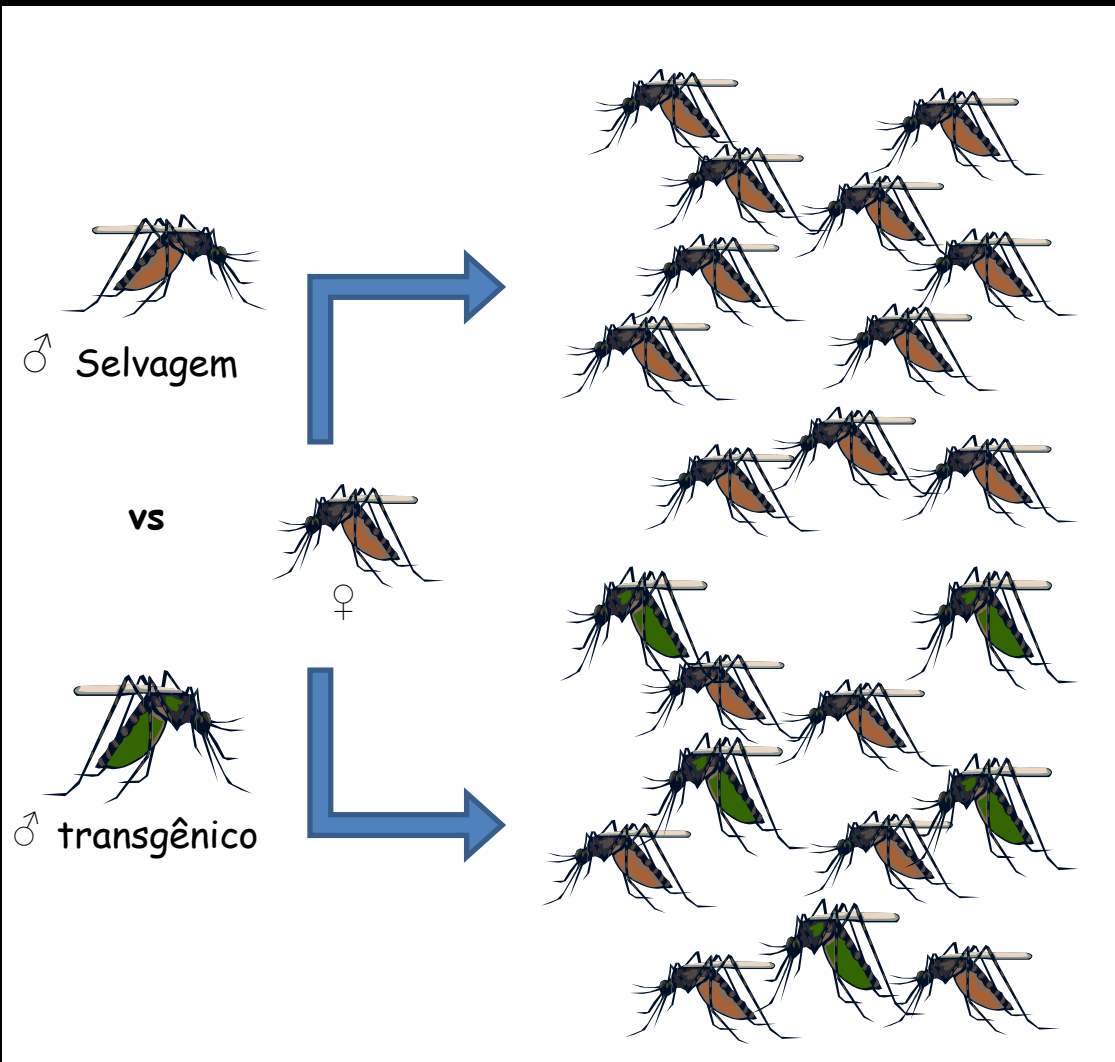


Key messages:

- Efficacy evaluation
- Biosafety
- Ethics and public engagement
- Regulatory Frameworks

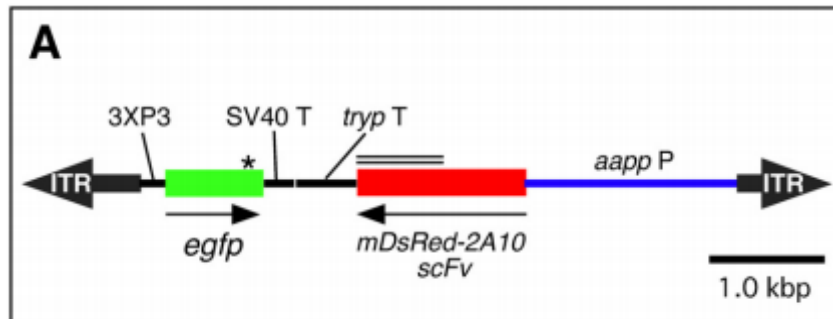
Source: www.who.int/tdr/

SUBSTITUIÇÃO DE POPULAÇÃO



Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an ant sporozoite antibody in their salivary glands

M. Sumitani^{*}, K. Kasashima[†], D. S. Yamamoto[‡],
K. Yagi[‡], M. Yuda[§], H. Matsuoka[‡] and S. Yoshida[¶]



C

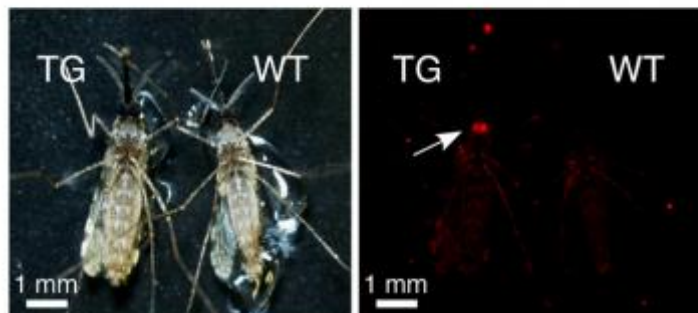


Table 1A. Vectorial competence of transgenic mosquitoes

Vectorial competence* (3 ≤ mosquito bites/ mouse ≤ 11)	Number of infected/total (% infected mice)	
	WT	TG
EXP 1 (day 14)	6/7 (85.7)	2/6 (33.3)
EXP 2 (day 21)	4/5 (80.0)	1/6 (16.7)
Total	10/12 (83.3)	3/12 (25.0) [†]

*Vectorial competence is an evaluation of the vector's ability to transmit the parasite to normal malaria naïve mice. Transgenic (TG) and wild-type (WT) mosquitoes were fed on the same PfcSP/Pb-infected mouse. To measure transmission, 3–11 mosquitoes were fed on individual naïve mice on day 14 (EXP 1) or day 21 (EXP 2) after the infectious blood meal. The infection status of each mouse was evaluated by daily microscopic examination of a Giemsa stained tail vein blood smear. Mice that had no parasites by day 20 were considered to be uninfected.

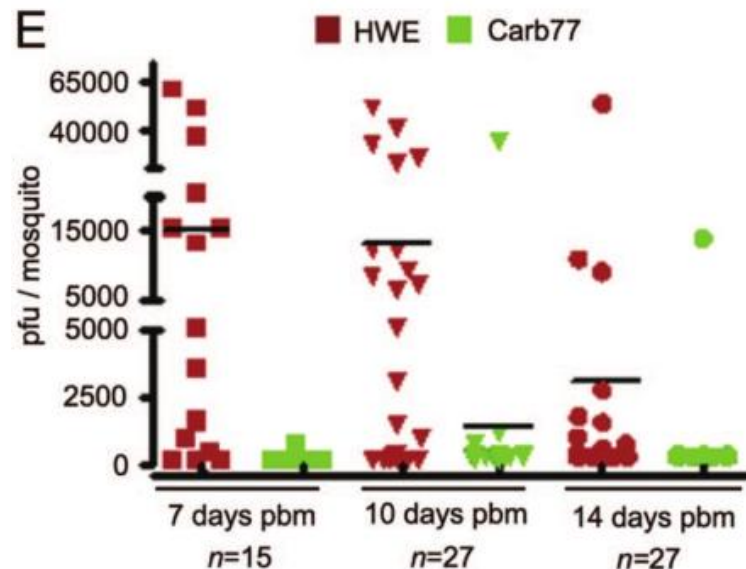
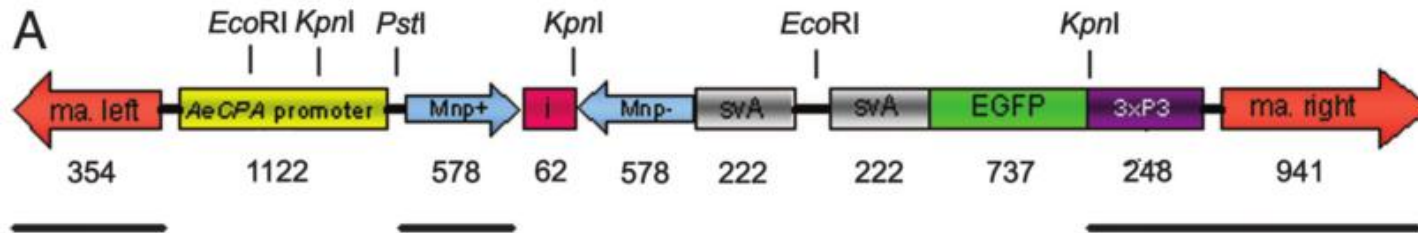
[†]A significant difference ($P = 0.0123$) in vector competence for WT vs. TG mosquitoes was determined using Fisher's exact probability test.

Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*

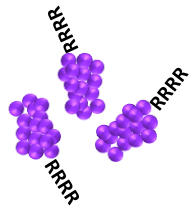
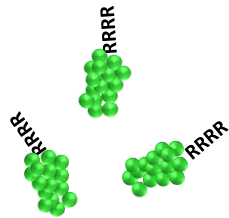
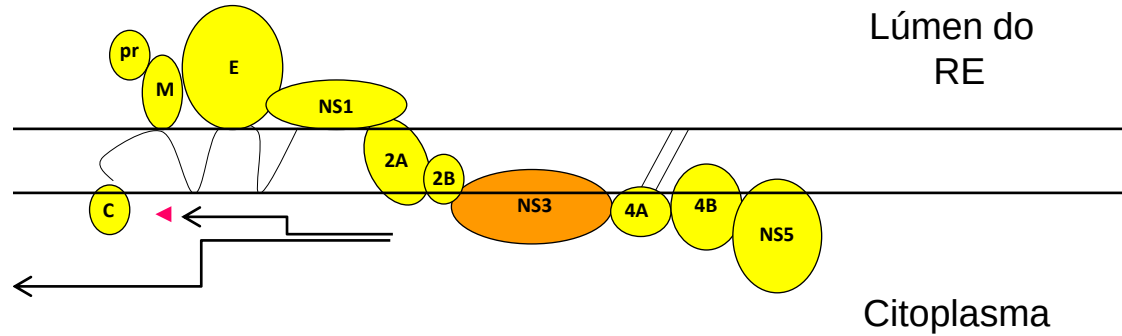
Alexander W. E. Franz^{**†}, Irma Sanchez-Vargas^{**†}, Zach N. Adelman[‡], Carol D. Blair^{*}, Barry J. Beaty^{*§}, Anthony A. James^{||}, and Ken E. Olson^{*§}

^{*}Arthropod-Borne and Infectious Diseases Laboratory, Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523; [†]Department of Entomology, 320 Price Hall, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061; and Departments of [‡]Molecular Biology and Biochemistry and ^{||}Microbiology and Molecular Genetics, University of California, Irvine, CA 92697

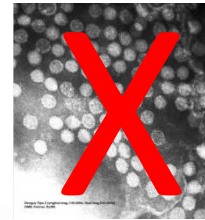
Contributed by Barry J. Beaty, January 18, 2006



Linhagem anti-dengue - Fenótipo de morte dupla:

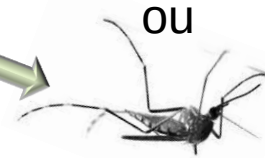


Apoptose

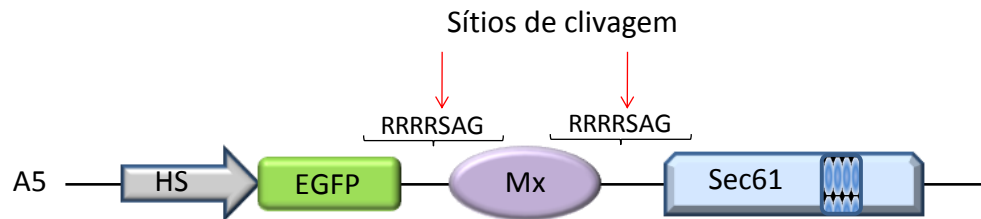


**Intestino -
Previne a infecção
(Replicação inicial)**

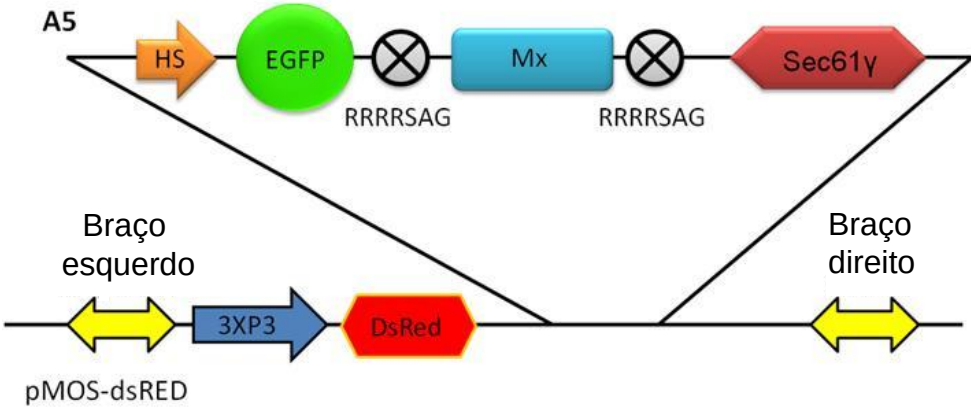
OU



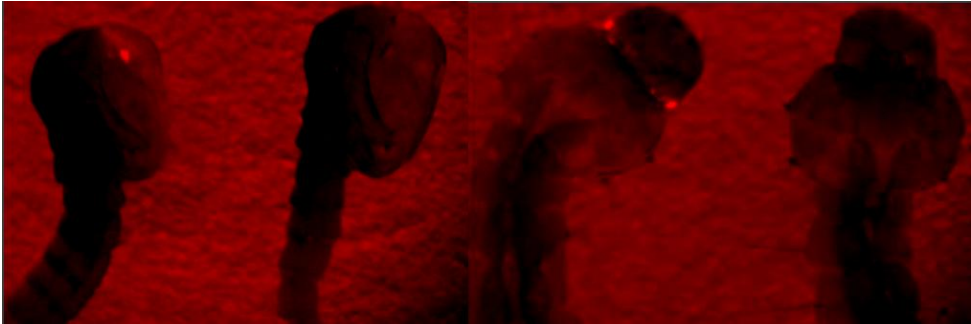
**Mosquito morre
(Disseminação viral)**



Obtenção da linhagem transgênica:



Embriões	G0	Famílias	Larvas	Positivas
1732	64	32	8019	4



Repasto sanguíneo – Alimentadores artificiais....

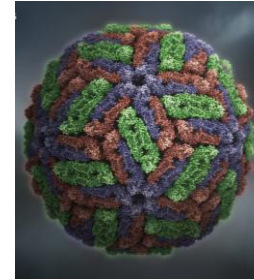
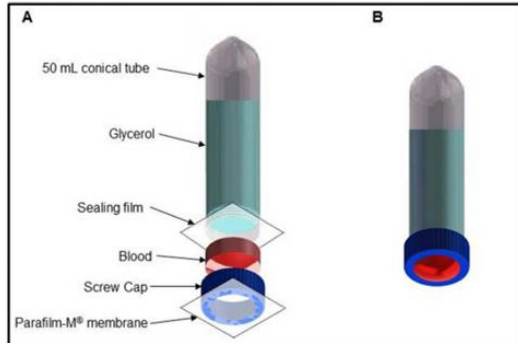
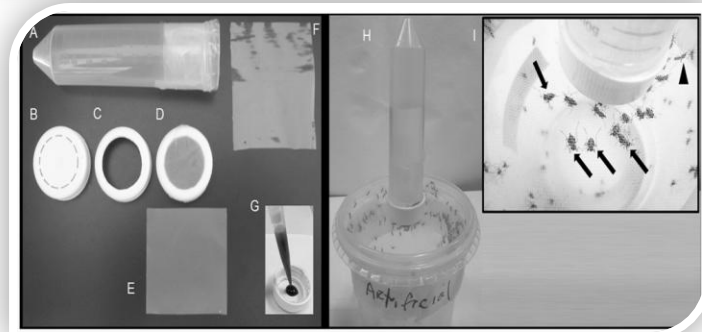
OPEN ACCESS Freely available online



Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*

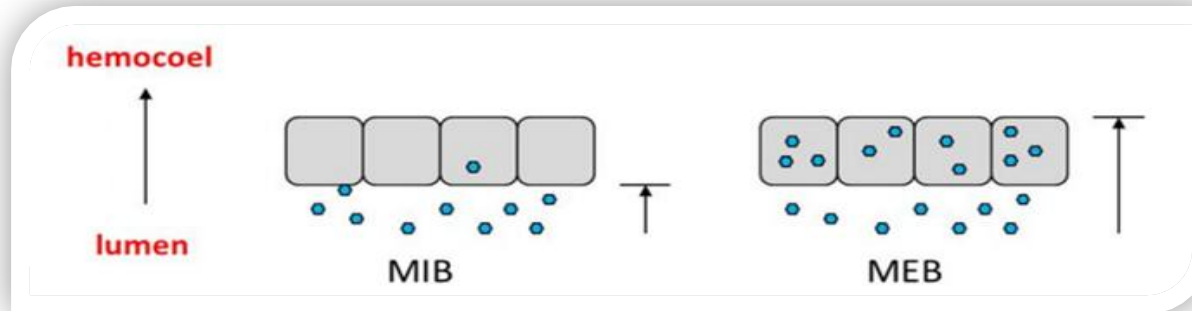
André Luis Costa-da-Silva^{1*}, Flávia Rosa Navarrete¹, Felipe Scassi Salvador², Maria Karina-Costa¹, Rafaella Sayuri Ioshino¹, Diego Soares Azevedo¹, Desirée Rafaela Rocha¹, Camila Malta Romano², Margareth Lara Capurro¹

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, ²Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

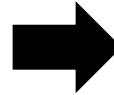
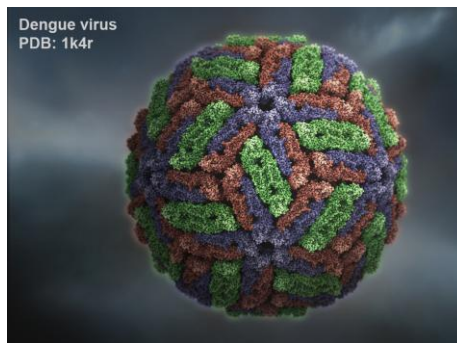


Desafio com vírus Dengue – Injeção intratorácica:

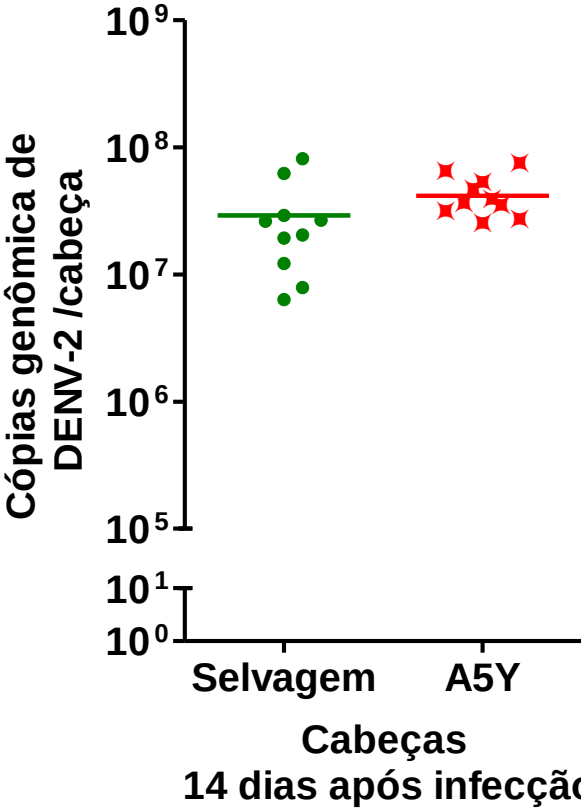
- Intestino – Barreiras de infecção (MIB) e barreiras de escape (MEB)



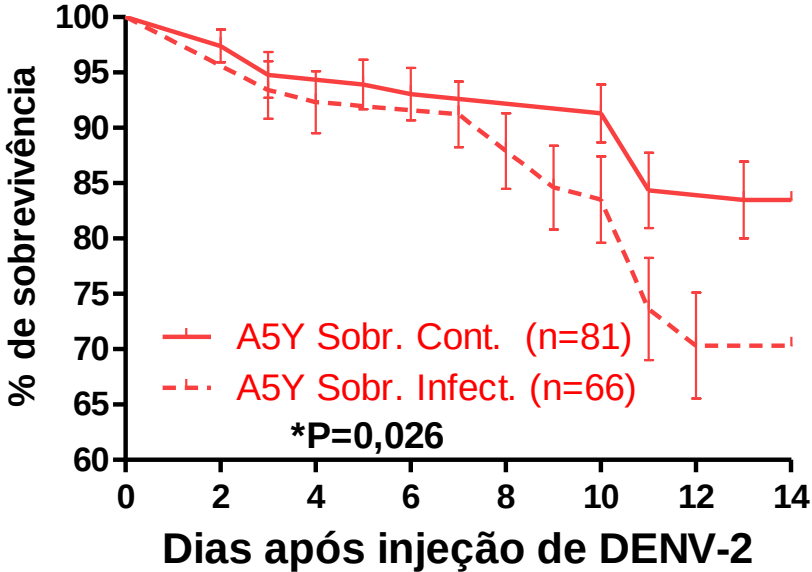
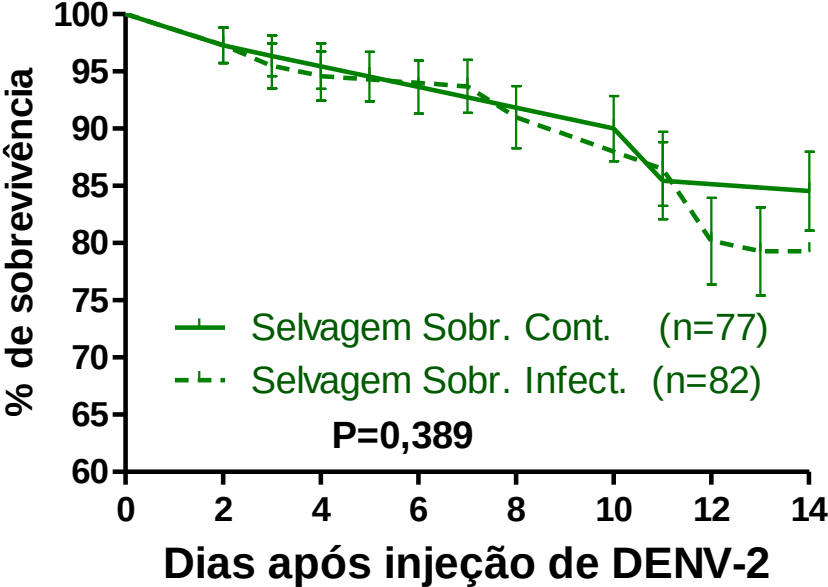
Modified from Franz et al., 2015



Desafio com vírus Dengue – Injeção intratorácica:



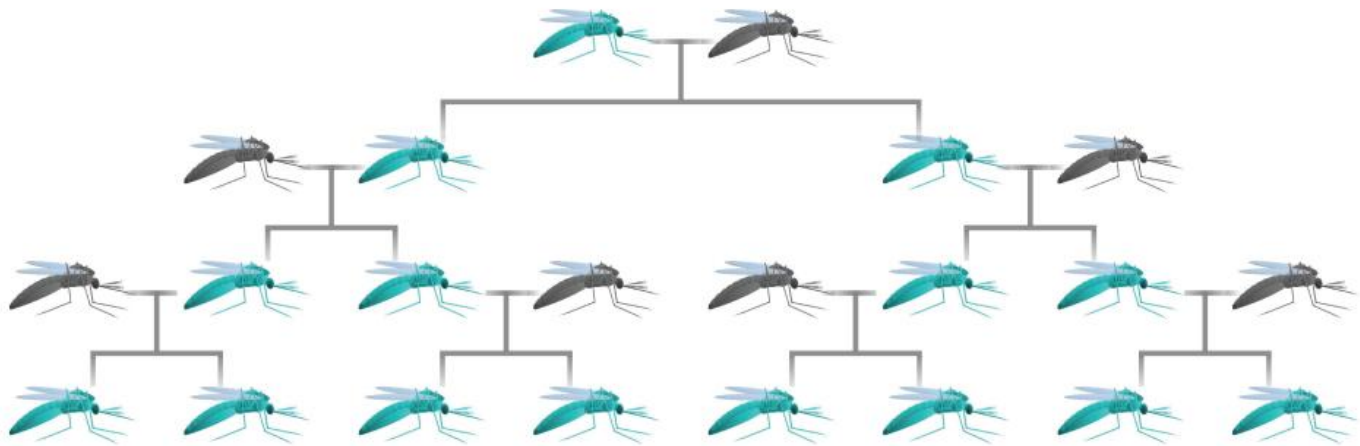
Linhagens	Selvagem	A5Y
Amostras	10	10
Infectadas	10	10
% de infecção	100	100
N médio de cópias	$2,9 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
Desvio padrão	$2,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$



SUBSTITUIÇÃO
DE
POPULAÇÃO

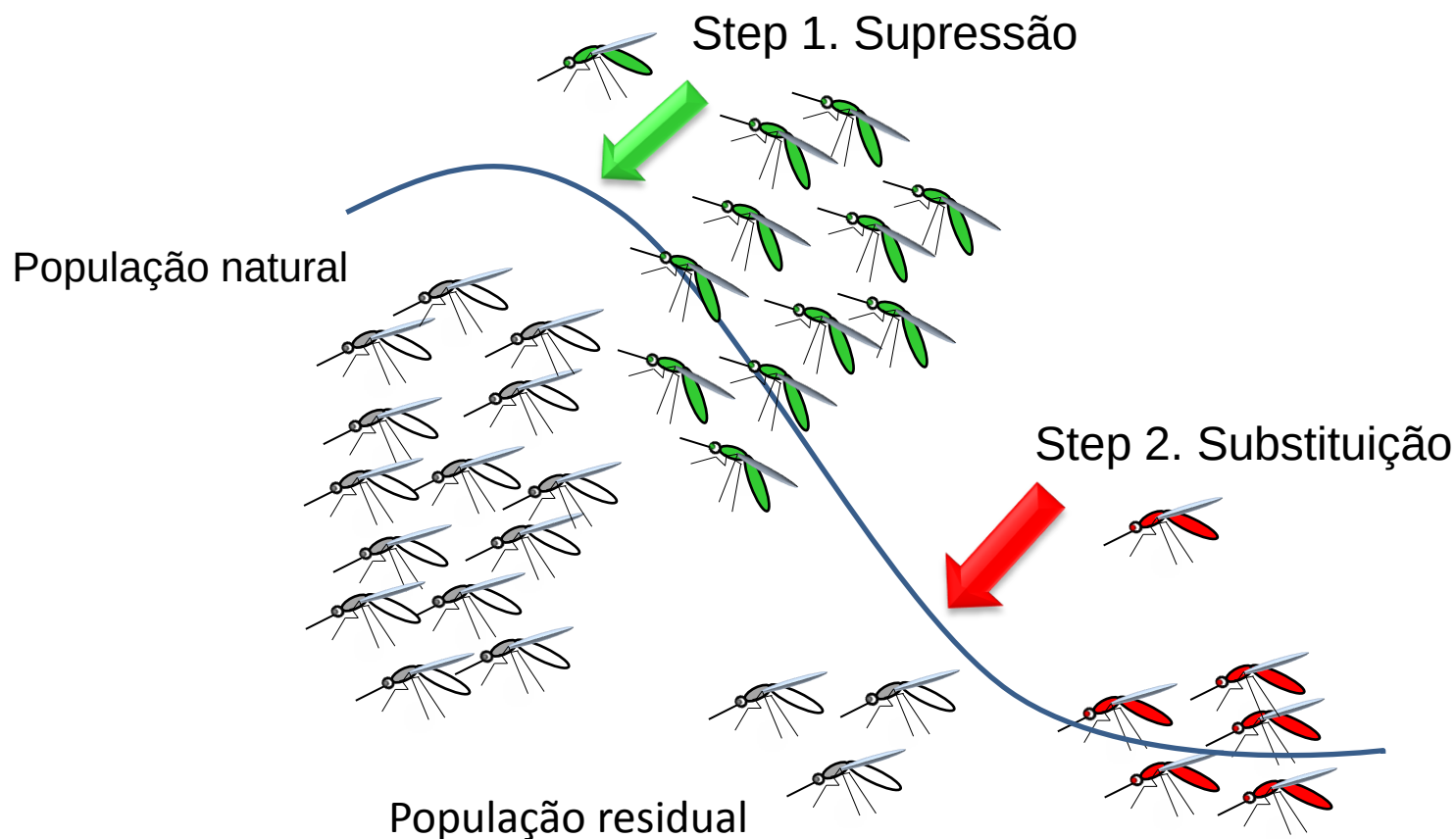
Legislação / Aprovação

Fixação do alelo / Gene drive



Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases

Danilo Oliveira Carvalho^{a, b}, André Luis Costa-da-Silva^{a, b}, Rosemary Susan Lees^c, Margareth Lara Capurro^{a, b},  



Moscamed Brasil

UPAT



LEMI

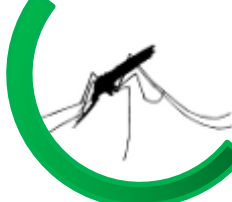


Universidade de São Paulo

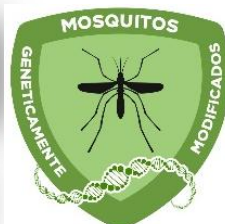




Agradecimentos:



- À Profa. Dra. Tania Bijovsky
- Aos Professores organizadores:
Bruna Alencar, Lourdes Isaac, Benedito Corrêa,
Carlos Taborda, Alejandro Katzin.
- A todos estudantes e ouvintes do curso.



Secretaria de Ciência,
Tecnologia e Inovação



INCT - EM
PRONEX/DECIT

