

HISTÓRICO E ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DA POPULAÇÃO DE MOSQUITOS.

HYSTORY AND ALTERNATIVES FOR MOSQUITO CONTROL POPULATION.

RESUMO

Alguns Culicidae (Diptera) transmitem patógenos ao homem e apresentam grande importância em saúde pública, pois geram elevada mortalidade e morbidade. Existem muitos esforços para tentar controlar as populações de mosquitos e patógenos, porém alguns métodos não obtêm o sucesso desejado. Nesta revisão propõe-se a utilização da tecnologia de RNA de interferência para reduzir a competência vetorial do mosquito e também como alternativa para o controle das populações de mosquitos.

ABSTRACT

Some Culicidae (Diptera) transmit pathogens to the human and are very important to public health, once may cause death and morbidity. There are many efforts in order to control these populations, but some methods are not sucessfully as it would be. On this review, the purpose is use the RNA interference tecnologia to reduce the insect vetorial competence and also as an alternative to its population control.

1. INTRODUÇÃO.

As doenças transmitidas por mosquitos (Diptera, Culicidae), continuam gerando grandes problemas em saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Apesar do esforço para o controle das populações de vetores a incidência de arboviroses, protozooses e helmintoses têm aumentado significativamente nas últimas duas décadas. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que as doenças transmitidas por mosquitos estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. Aproximadamente 500 milhões de casos de malária resultam em 2,7 milhões de mortes por ano. Segundo dados da OMS, a malária é a 4ª maior causa de mortes entre crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2005). As filarioses linfáticas, apresentam morbidade para cerca de 120 milhões de pessoas no mundo. A dengue, principalmente na sua forma hemorrágica atinge mais de 2,5 bilhões de pessoas, gerando anualmente cerca de 24 mil óbitos (SEVERSON *et al*, 2001).

Diante do quadro de gravidade e do elevado número de mortes e morbidade, gerados devido às doenças, causadas pelos patógenos e transmitidos por culicídeos, existem grandes esforços para prevenir ou limitar a transmissão dos agentes patogênicos, mas muitos deles falham em algum aspecto, como os citados a seguir. A) O insucesso no desenvolvimento de vacinas contra os patógenos. B) O desenvolvimento de resistência aos remédios anti-maláricos pelo *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885. C) A deterioração das condições sócio-econômicas em muitas áreas endêmicas resultam no colapso dos programas de monitoramento e controle das doenças. D) Os programas de controle da população de mosquitos estão sendo reduzidos devido a perda de estabilidade dos mesmos e também pelo desenvolvimento de resistência das população de mosquitos aos inseticidas (Severson *et al*, 2001).

1.2 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE.

A transmissão dos arbovírus, protozoários e helmintos é totalmente dependente da presença de populações de mosquitos vetores, desta forma os programas de controle ainda são o mecanismo de maior sucesso na prevenção dessas doenças. O controle dos culicídeos objetiva reduzir ou interromper o contato entre as populações humanas e as populações de mosquitos vetores.

Medidas de controle dos mosquitos podem visar as larvas ou os adultos. As tomadas contra as larvas podem compreender a eliminação ou modificação dos habitats (drenagem por exemplo), ou a aplicação de inseticidas nestes lugares. As medidas contra os adultos podem ser de maneira preventiva (o uso de roupas protetoras, de telas ou de repelentes) ou aplicação de inseticidas (BORROR & DELONG, 1988).

O controle integrado esta baseado em três procedimentos técnicos, o controle ambiental, químico e o biológico, que geralmente são utilizados em conjunto (FORATTINI, 2002). O controle ambiental consiste em modificar ao ambiente, tornando-o pouco propício para a sobrevivência dos mosquitos, como por exemplo, tomando-se medidas de saneamento básico e na eliminação de criadouros, naturais ou artificiais, transitórios ou permanentes.

Do ponto de vista teórico, parecem simples a execução de medidas de controle ambiental, como por exemplo, campanhas de eliminação de criadouros instituídas pelos governo federal, estadual e municipal (para que não se deixe acumular água em pneus, ou outro qualquer recipiente que possa servir como criadouro para mosquitos e também para que a população não acumule entulho que possa servir como criadouro). Mas estas necessitam também de uma campanha educativa bem planejada. Caso este fator educativo não seja satisfatório, corre-se o risco de voltar a situação anterior à das campanhas de erradicação dos vetores. A modificação do ambiente, de modo que este torne os criadouros não produtivos, deve ser feita de maneira que não leve a degradação do mesmo, trazendo conseqüências desagradáveis, tão discutidas atualmente.

O controle químico se dá através de uso de substâncias, conhecidas por inseticidas ou larvicidas. De acordo com o modo de ação os larvicidas químicos podem ser classificados como: 1) Asfixiantes, que obstruem os espiráculos (óleos minerais); 2) De contato, substâncias que atravessam a superfície corporal ou penetram no corpo pelo sistema respiratório (organofosforados, carbamatos e piretróides), 3) Gástricos, substâncias que são ingeridas pelas larvas e absorvidas pelo aparelho digestivo (Verde Paris e *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911) e 4) Inibidores de crescimento, que são os que interferem na ecdise ou comprometem formação da quitina (metoprene e difluorbenzofurona).

No controle das formas adultas utilizou-se por muito tempo o DDT, porém este composto tem a capacidade de persistir durante muito tempo no ambiente, acumulando-se nos organismos de animais e vegetais, desta forma seu uso foi desaprovado. Porém o uso freqüente de inseticidas (organofosforados, carbamatos e piretróides) pode levar ao desenvolvimento de resistência do mosquito a estes compostos, comprometendo o controle e favorecendo a transmissão de doenças (CARVALHO *et al.*, 2004). Por este motivo deve

existir o monitoramento periódico da susceptibilidade das populações incriminadas na transmissão dessas doenças (LUNA *et al.*, 2004; CAMPOS & ANDRADE, 2003). Além do desenvolvimento de resistência nas populações de mosquitos aos inseticidas, pode ocorrer a diminuição na população de inimigos naturais, riscos de saúde para homens e animais, contaminação dos lençóis freáticos e diminuição da biodiversidade (LACEY *et al.*, 2001)

O controle biológico pode ser definido como uma medida que visa à redução da densidade populacional de determinado vetor, pela influência de outra população que possa agir neste sentido (FORATTINI, 2002). A meta inicial do controle biológico é elevar a densidade populacional do agente escolhido, após introduzi-lo no ambiente.

São utilizados inimigos naturais, tanto vertebrados como invertebrados. Citam-se os predadores, como peixes do gêneros *Gambusia* Poey, 1854, *Poecilia* Schneider, 1801 e *Tilapia* Smith, 1840, crustáceos dos gêneros *Mesocyclops* Sars, 1914 e *Triops* Schrank, 1803 e insetos das famílias Chironomidae e Corethrellidae algumas espécies do gênero *Toxorhynchites* Theobald, 1901 (Culicidae). Os microparasitos são agentes infecciosos que visam a redução da população de mosquitos, como alguns fungos dos gêneros *Coelomomyces* Keilin, 1921, *Culicinomyces* Couch, 1974, *Lagenidium* Schenk, 1859 e algumas espécies de protozoários dos gêneros *Amblyospora* Hazard & Oldacre 1975, *Parathelohania* Codreanu 1966 e *Edharzardia aedis* (Kudo, 1930). Os macroparasitos, como o *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith, 1976 (Nematoda) que parasitam as larvas de mosquitos também revelaram-se como possíveis agentes de controle biológico (FORATTINI, 2002, LACEY *et al.*, 2001).

O sucesso do controle utilizando-se de fungos depende da correta propagação, da formulação, da aplicação na dosagem adequada, da presença de hospedeiros em estágios susceptíveis e o ambiente em condições favoráveis. O nematódeo *Romanomermis culicivorax*, é intolerante a ambientes poluídos, com muita matéria orgânica ou altos níveis de salinidade e temperatura (LACEY *et al.*, 2001).

As bactérias *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* Meyer & Neide, 1904 revelaram aspectos promissores com larvicidas. Estas bactéria são encontrada no solo, produzem toxinas de elevado poder inseticida e agem nas células gástricas da larva, provocando sua lise. A grande vantagem do uso dessas bactérias como larvicidas é de serem praticamente inócuas para o homem, permitem a sobrevivência de insetos benéficos e inimigos naturais e após cerca de 20 anos de utilização (*Bti*) não se tem revelado o desenvolvimento de resistência em populações naturais. No entanto, apesar de ainda não se dispor de dados mais concretos, em estudos laboratoriais, certos resultados

indicam que possa se desenvolver resistência ao *Bti* em algumas populações de mosquitos (Tabashnik, 1994). Outro ponto contrário à utilização do *Bti*, é que este apresenta baixa estabilidade quando exposto ao meio ambiente, para que a ação do inseticida perdure, há necessidade de aplicações seguidas. *B. sphaericus* traz algumas vantagens em relação ao *Bti*, pois é mais persistente em ambientes poluídos e pode ser reciclado (não requer aplicações constantes), mas seu espectro de ação sobre as espécies de mosquitos é menor quando comparado ao *Bti* (LACEY *et al.*, 2001)

O sucesso na aplicação do controle biológico deve levar em consideração fatores ecológicos e socioeconômicos. A eficácia do agente deve ser testada em condições de campo, juntamente com a viabilidade de produção em grande escala do inimigo natural (FORATTINI, 2002). Deve ser avaliado também o impacto da introdução destes agentes sobre o meio ambiente, procurando-se manter o equilíbrio ecológico e dando preferência pela utilização de organismos autóctones. No entanto, algumas espécies exóticas, como *Tilapia*, podem ser utilizadas para o controle, pois suporta a redução populacional dos mosquitos e tem-se a piscicultura como fonte de rendimentos e alimentação, concomitante ao controle.

Para a implantação desses programas de controle biológico, são necessários alguns avanços: melhoramento dos patógenos, sua produção e formulação, grande aceitação por suas vantagens (eficácia, segurança e seletividade) e não a simples comparação com um produto químico. No entanto, em saúde pública, são geralmente requeridos mais de um método de controle, como já mencionado, e costuma-se aplicar o controle integrado.

2. BIOLOGIA MOLECULAR E RNA DE INTERFERÊNCIA.

A combinação da genética com a bioquímica veio revolucionar a biologia, propiciando a extensão dos estudos moleculares. Ao rápido acúmulo de conhecimentos daí resultantes, somaram-se as possibilidades de manipulação dos genes. Assim os caracteres estruturais das moléculas serviram de guia para poder-se observar as conseqüências mutacionais do fenótipo (FORATTINI, 2002).

A biologia molecular mostra-se como uma importante ferramenta para diversas áreas da biologia, tanto na ciência básica quanto na aplicada, auxiliando na resolução de questões de taxonomia, filogenia, ecologia e dinâmica populacional. Tanto marcadores de DNA como de proteínas têm revolucionado as ciências biológicas em muitas áreas de estudo (LOXDALE & LUSHAI, 1998).

Os marcadores de proteínas (aloenzimas e izoenzimas) são um método mais barato, rápido, de fácil interpretação e por consequência de utilização mais simples. Os marcadores de DNA, são métodos mais caros quando comparados aos marcadores de proteínas e requerem protocolos de elaboração mais sofisticados, equipamentos laboratoriais caros, procedimentos de desenvolvimento prolongados (como por exemplo o isolamento de oligonucleotídeos clonados para desenvolver primers para detectar regiões de microsátélites), e em muitos casos os resultados não são repetidos com facilidade. Algumas técnicas de marcadores de DNA utilizadas são: RFLPs (Restriction fragment length polymorphisms); DNA fingerprint; RFLP e PCR (Polymerase chain reaction) aplicada ao DNA mitocondrial (mtDNA); PCR aplicada ao DNA nuclear (nDNA); microsátélites (Simple sequence repeats: SSRs); RAPDs (Randomly amplified polymorphic DNA); AFLPs (Amplified fragment length polymorphisms); DALPs (Direct amplification of length polymorphisms); FISH (Fluoresce in situ hybridization probes), RT-PCR (Reverse transcriptase PCR) e PCR ELISA (Enzyme-linked immuno-absorbent assay) (LOXDALE & LUSHAI, 1998).

A utilização de análises mais sofisticadas, como as moleculares, pode representar grandes avanços no controle das doenças e dos vetores. O campo da biologia molecular tem expandido-se grandemente nos últimos dez anos e muitos entomólogos utilizam esta tecnologia para campos além da taxonomia e ecologia.

Como exemplo da manipulação genética aplicado ao controle das populações de Culicidae vetores, têm procurado-se introduzir mediante processo de clonagem, as toxinas de *Bacillus* em outros organismos, como bactérias, que são encontradas nos criadouros dos mosquitos, dos quais as larvas costumam se alimentar (FORATTINI, 2002).

A introdução de RNA de dupla fita (dsRNA) em uma grande variedade de células animais e vegetais, resulta na degradação do RNA mensageiro homólogo (mRNA). Este fenômeno é conhecido como RNA de interferência (RNAi) (FLORES-JASSO *et al.*, 2004).

Tal tecnologia pode ser empregada para manipular a expressão e identificar funções de genes em um genoma e consequentemente a biologia de inúmeros organismos. (TAN & YIN, 2004, ABRAHAM & JACOBS-LORENA, 2004). Rapidamente esta tecnologia tornou-se uma importante ferramenta para o “silenciamento” de genes.

O mecanismo de funcionamento do RNAi ainda não é completamente conhecido e muitos pesquisadores estão utilizando esta técnica de diferentes formas. A rápida produção de organismos, onde os genes de interesse foram seletivamente silenciados é um bom indicativo que a técnica do RNAi é promissora em muitos campos, como por exemplo no campo da virologia, na prevenção de infecções; supressão da transcrição do genoma viral, bloqueio da

replicação viral e no esclarecimento das interações vírus-hospedeiro (TAN & YIN, 2004). Muitos destes estudos tem gerado grande otimismo para a utilização da técnica de RNAi, pois esta pode apresentar potencial terapêutico para o combate de doenças como a hepatite e a AIDS (ABRAHAM & JACOBS-LORENA, 2004)

O processo tem início, a partir da formação ou introdução de moléculas de DNA em dupla fita (dsRNA), seja no núcleo ou citoplasma da célula. As moléculas de dsRNA são reconhecidas e clivadas pela enzima RNase III (Dicer), formando pequenos segmentos com 21 a 26 nucleotídeos de comprimento (small interfering RNAs ou siRNAs). Por uma via ainda não determinada, os siRNAs degradam de maneira específica moléculas de mRNAs cujas sequências sejam homólogas a dos siRNAs, ou pela inibição da tradução de moléculas de mRNA alvo, resultando em redução total ou supressão na expressão destes genes (TAN & YIN, 2004; TENERIUS, 2004; FINNEGAN *et al.*, 2003, SCHWARZ *et al.* 2002).

2.1 APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE RNAI COM EFEITO NA REDUÇÃO DA COMPETÊNCIA VETORIAL.

A competência vetorial de um mosquito resulta na avaliação, de caráter experimental, da propriedade do vetor de se infectar, propiciar a multiplicação do agente infeccioso e/ou desenvolvimento e a subsequente transmissão do agente infeccioso ao novo hospedeiro (FORATTINI, 1992).

A manutenção e transmissão de arboviroses na natureza, dependem que as populações de mosquitos sejam geneticamente competentes e que suportem a infecção viral. Novas estratégias devem ser investigadas para controlar os agentes infecciosos e seus vetores.

Uma dessas novas estratégias de controle, utilizando a técnica de RNAi, seria a manipulação genética de mosquitos, como *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) para reduzir profundamente e permanentemente a competência vetorial e conseqüentemente a transmissão do vírus. Este bloqueio poderá ocorrer pela expressão de moléculas antivirais específicas no mosquito, como nas glândulas salivárias ou no intestino do mosquito transgênico, prevenindo a replicação e transmissão do arbovírus. A técnica do RNAi pode ser este potencial antiviral, que pode ser iniciado pela presença de dsRNA (TRAVANTY *et al.*, 2004). Estes dsRNA são um dos primeiros sinais de alarme da invasão de RNA vírus, que iniciam uma cascata de RNAi resultando na destruição do mRNA que possuem uma sequência homóloga aos dsRNA.

Muitos RNA vírus geram dsRNA nas células infectadas como bioproduto da replicação e estes intermediários podem induzir a reação de RNAi. Existem evidências que

Aedes aegypti e *Anopheles gambiae* Giles, 1902 desenvolvem um RNAi de resposta, podendo silenciar a expressão de genes endógenos ou a replicação do vírus após a introdução de dsRNA direcionados a um gene específico (TRAVANTY *et al.*, 2004). Mas se os RNA vírus podem desencadear o processo de RNAi, porque os mosquitos são eficientes vetores de arboviroses? Provavelmente o vírus da dengue escape da ação antiviral do RNAi, porque a concentração destes dsRNA seja insuficiente para desencadear o processo de RNAi. UCHIL & SATCHIDANANDAM (2003) sugerem que algumas arboviroses seqüestram o dsRNA no citoplasma das células infectadas, que possivelmente limita o mecanismo de ação do RNAi.

Todavia é possível induzir uma resposta de RNAi ao vírus da dengue no intestino médio quando o mosquito ingere sangue infectado, resultando neste modo na destruição do genoma do vírus, antes que este possa livrar-se da resposta de RNAi e consequentemente modificaria profundamente a competência vetorial do mosquito.

Para desenvolver essa linhagem de mosquitos transgênicos que transcrevessem uma molécula efetora antivírus (vetor), formando dsRNA nas células dos mosquitos e disparando a reação de RNAi. SANCHEZ-VARGAS *et al.* (2004) conduziram experimentos para observar se Sindbis vírus (SINV, *Alphavirus*, *Togaviridae*) podem induzir resistência em mosquitos ao vírus da dengue do tipo 2 (DENV-2), similar àquela apresentada pelo mecanismo de RNAi. Os autores infectaram células de mosquitos fêmeas com este vírus recombinante contendo 290 nucleotídeos do DENV-2 nas orientações sense e antisense. A infecção das células com o vírus recombinante em ambas orientações resultou na diminuição da capacidade infectante do DENV-2.

A priori, não existe nenhuma razão que impeça a utilização da tecnologia de RNAi contra filárias ou protozoários, como o *Plasmodium*. Uma transgênese designada a expressar dsRNAs no intestino médio do mosquito, poderia induzir o processamento desses dsRNAs em siRNAs. Estes siRNAs poderiam ser capazes de penetrar nas formas do *Plasmodium* e por sua atividade poderiam iniciar a reação de RNAi. Se a transgênese produzir dsRNAs que forem determinados a atingir um mRNA cujos produtos, por exemplo forem requeridos para a mobilidade, infectibilidade ou viabilidade do esporozoíto, este pode não avançar para o próximo estágio do ciclo de vida do *Plasmodium*, desta forma impedindo a transmissão da doença (ADELMAN, *et al.*, 2002)

Todavia, dsRNA gerados por Sindbis recombinante, não podem ser usados para atingir genes envolvidos no desenvolvimento embrionário e talvez não seja estratégia efetiva contra genes larvais, pupais (OLSON, *et al.*, 2000).

2.2 APLICAÇÕES DA TÉCNICA DE RNAI COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DAS POPULAÇÕES DE MOSQUITOS.

A quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, é um dos principais componentes da cutícula e da matriz peritrófica dos insetos. Sua função é revestir estruturas, dando suporte a epiderme cuticular, traquéias e a matriz peritrófica. O crescimento e desenvolvimento dos insetos é estritamente dependente da capacidade de remodelação das estruturas que contém quitina. Para isto, os insetos sintetizam e degradam continuamente a quitina. A coordenação da síntese da quitina e sua degradação requerem um controle estrito das enzimas participantes, para permitir as ecdises e a regeneração da matriz peritrófica (MERZENDORFER & ZIMMACH, 2003).

A cutícula, é secretada pela epiderme e constitui-se de três camadas relativamente distintas, epicutícula, exocutícula e endocutícula. A epicutícula é uma camada externa fina e não contém quitina; a exocutícula e a endocutícula são camadas mais espessas e contém quitina. As extremidades anterior e posterior do intestino são revestidos por uma fina camada de cutícula (BORROR & DELONG, 1988). A síntese e deposição de quitina são fundamentais para o desenvolvimento e são estritamente coordenadas dentro do ciclo de mudas (ecdises). Cada mudança de estágio larval estão associados a secreção de uma nova epicutícula e endocutícula e a cada estágio, a endocutícula torna-se mais fina. A cutícula pupal é depositada durante os estágios iniciais da metamorfose, pelas células da epiderme da larva e do adulto, ao passo que a cutícula do adulto é secretada apenas pela epiderme do adulto após a apólise da cutícula pupal, no qual esta envolvido o hormônio ecdisona. Geralmente os genes envolvidos na morfogênese são expressos durante os períodos de alta concentração de ecdisona e aqueles envolvidos na formação da cutícula são expressos nos períodos de baixa concentração do hormônio (GAGOU, *et al*, 2002).

A matriz peritrófica reveste todo o intestino médio dos insetos, separando o conteúdo do lúmen intestinal das células do epitélio digestivo. Esta é a única região do inseto que não é recoberta por cutícula e que está em contato com o meio externo (na forma do alimento ou sangue). É composta de proteínas, proteoglicanos e quitina, que juntos formam uma estrutura robusta. Existem dois tipos de matriz peritrófica, a do tipo I que é encontrada nos adultos e só sintetizada após a alimentação com sangue e a do tipo II que é sintetizada de forma constitutiva (GUSMÃO *et al.*, 2002).

Suas funções são a proteção contra a abrasão nas paredes do intestino, facilitando a digestão, além da proteção química contra possíveis agentes tóxicos e também a proteção

contra a infecção por vírus e parasitas (PASCOA *et al.*, 2002, GUSMÃO, *et al.*, 2002). Através da compreensão da estrutura e função da matriz peritrófica, podem ser desenvolvidas novas estratégias para o controle de insetos vetores e também dos parasitas que alguns destes insetos transmitem.

A parede do intestino médio pode ser considerada um mecanismo de defesa do mosquito, pois é o primeiro tecido que os patógenos tem que atravessar e é o maior determinante da capacidade vetorial do culicídeo. Os patógenos são ingeridos durante o repasto sanguíneo e primeiramente encontram o intestino. Os arbovírus, por exemplo podem replicar-se no epitélio intestinal ou em outros lugares do corpo, antes de ter infectado as glândulas salivárias. Quando as glândulas estão infectadas com o vírus, a fêmea torna-se competente para a transmissão durante toda sua vida (TRAVANTY *et al.*, 2004).

Devido à alocação de peritrofinas (uma das proteínas constituintes da matriz peritrófica) no tecido, anticorpos podem ser produzidos no inseto através de vacinação. A ingestão destes anticorpos pelo insetos, conduz a formação de uma camada fina, amorfa que recobre a matriz peritrófica e conseqüentemente levaria a perda de permeabilidade da mesma. Desde que a matriz peritrófica possa ser uma barreira contra a penetração de vírus, bactérias e protozoários então os mecanismos através dos quais alguns destes organismos penetram através desta barreira podem ser alvos contra eles mesmos através interferência química e imunológica. A transmissão do *Plasmodium* pelo mosquito requer que o protozoário penetre a matriz peritrófica, através da secreção de uma quitinase. Esta quitinase é secretada em uma forma inativa, como uma proenzima que é ativada por uma tripsina secretada pelo intestino médio do inseto. A inibição desta quitinase ou da tripsina bloqueia a transmissão do vírus (ABRAHAM & JACOBS-LORENA, 2004, TELLAM *et al.*, 1999).

A enzima quitina sintase catalisa a etapa final de incorporação da N-acetilglicosamina no polímero de quitina. A síntese da quitina é específica e muito promissora para o desenvolvimento de pesticidas e conseqüentemente para o controle das populações de vetores. A clonagem e a caracterização da quitina sintase, a partir do cDNA do mosquito adulto *Aedes aegypti*, foram feitas por IBRAHIM *et al.* (2000) e os resultados demonstraram que a enzima é codificada por um único gene.

Devido à importância da quitina em todas as fases da vida do mosquito, tanto na formação do exoesqueleto quanto na formação da matriz peritrófica, este polissacarídeo pode tornar-se um bom alvo na tentativa de inviabilizar o desenvolvimento dos vetores. A quitina sintase é a enzima chave na produção da quitina, o bloqueio da síntese desta enzima pode inviabilizar o desenvolvimento do inseto, desta forma apresenta-se com uma estratégia para o

controle de populações de mosquitos. Uma forma de bloquear a enzima quitina sintase é o silenciamento do gene que a codifica, através da técnica de RNAi.

Para testar a viabilidade desta técnica no controle de mosquitos, poderiam ser construídos vetores bacterianos (ou em leveduras) contendo dsRNAs do gene da quitina sintase, que seriam adicionados ao alimento servido para as larvas ou inseridos de alguma forma nos mosquitos adultos. O processo de RNAi seria uma boa escolha pela sua eficiência e especificidade, pois está diretamente relacionado à sequência dos siRNAs produzidos e sua homologia em relação ao gene alvo da quitina sintase.

3. DISCUSSÃO

Muitas técnicas tradicionais de redução da população de vetores e a prevenção de arboviroses não têm tido sucesso, devido ao custo, a expansão da urbanização, ao aumento da população humana, a resistência aos inseticidas e a dispersão das espécies vetoras proveniente da globalização do comércio. Apesar da grande importância médica e dos esforços para combater patógenos e vetores, muitos estudos ainda são necessários para obter melhores resultados com os métodos rotineiramente utilizados e também para o desenvolvimento de novas técnicas de controle. A utilização de análises mais avançadas, como as moleculares e a transgênese podem representar grande avanço conhecimento do genoma e funções de genes, e em consequência, estes conhecimentos gerados podem ser aplicadas para o controle de vetores e patógenos.

A aplicação da tecnologia de RNAi sobre os adultos tem a função de reduzir a capacidade vetorial dos mosquitos e consequentemente a dispersão da doença. Provavelmente a idéia mais interessante em relação a criação de um mosquito transgênico, é que este possa gerar um fenótipo refratário, com a subsequente substituição da população selvagem (vetorialmente competente) por uma modificada, resistente a patógenos (ADELMAN *et al.*, 2002).

O maior desafio é expressar o dsRNA, efector da reação de RNAi em tecidos relevantes, para que esta tecnologia silencie a replicação viral em locais críticos do vetor, como nas glândulas salivárias e no intestino médio. Se ocorrer sucesso, essa estratégia tem a vantagem de subordinar uma resposta natural no vetor, causando o bloqueio da infecção viral e por consequência afetar a transmissão da doença (TAVANTY *et al*, 2004).

A aplicação da técnica de RNAi sobre os imaturos, serviria como controle da população de mosquitos, causando a morte destes e consequentemente controlando a dispersão da doença, assim como citado para aplicação da tecnologia de RNAi em adultos.

Devido a importância da quitina em todas as fases de vida do mosquito, o bloqueio da enzima quitina sintase constituiria-se em uma boa alternativa para o controle, pois inviabilizaria o desenvolvimento e causaria a morte dos imaturos. No futuro, as formulações obtidas, contendo os vetores bacterianos, podem constituir alternativa aos larvicidas empregados, tanto químicos quanto biológicos, para o controle de vetores.

Contudo, cabe ressaltar que o controle dos vetores e por consequência os patógenos por eles transmitidos, estão inseridos em um quadro complexo de relações. Estão envolvidos questões de educação pública, saneamento ambiental, métodos utilizados para o controle das populações e sua eficácia, o treinamento de pessoal especializado para a identificação e controle dos mosquitos. No campo da pesquisa, muitos estudos são necessários para testar a eficiência dos métodos utilizados (como por exemplo o monitoramento da resistência), testar novos métodos de controle (como os biológicos) e verificar sua eficiência e aplicabilidade. Da mesma forma devem ser incentivados os estudos a nível molecular, como a tecnologia do RNAi, pois são altamente específicos e podem ser aplicados tanto para o controle de vetores, bem como o dos patógenos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.G. & JACOBS-LORENA, M. (2004). Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 667-671.
- ADELMAN, Z.N., JASINSKIENE, N. & JAMES, A.A. (2002). Development and applications of transgenesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 121: 1-10.
- BORROR, D.J. & DeLONG, D.M. Introdução ao estudo dos insetos. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda.
- CAMPOS, J. & ANDRADE, C.F.S. (2001). Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 35: 232-236.
- CAMPOS, J. & ANDRADE, C.F.S. (2003). Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*, 37: 523-527.
- CARVALHO, M.S.L.; *et al.* (2004). Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, 38: 623-629.

- CRUICKSHANK, R.H. (2002). Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology*, 7: 3-14.
- FLORES-JASSO, C.F. *et al.* (2004). Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference. *Virus Research*, 102: 75-84.
- FINNEGAN, E.J.; MARGIS, R. & WATHERHOUSE, P.M. (2003). Posttranscriptional gene silencing in the Arabidopsis Carpel Factory (Dicer-Like1) Mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila. *Current Biology*, 13: 236-240.
- FORATTINI, O.P. (2002). *Culicidologia Médica*. São Paulo, EDUSP.
- GAGOU, M.E. *et al.* (2002). Stage-specific expression of the chitin synthase DmeChSA and DmeChSB genes during the onset of Drosophila metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 141-146.
- GUSMÃO, D.S. *et al.* (2002). Derris (Lonchocarpus) urucu (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 371-375.
- IBRAHIM, G.H. *et al.* (2000). Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito Aedes aegypti. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1213-1222.
- LACEY, L.A., *et al.* (2001). Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, 21: 230-248.
- LOXDALE, H.D. & LUSHAI, G. (1998). Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600.
- LUNA, J.E.D *et al.* 2004. Susceptibilidade de Aedes aegypti aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 38: 842-843.
- MERZENDORFER, H. & ZIMMICH, L. (2003). Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4393-4412.
- PASCOA, V. *et al.* (2002). Aedes aegypti peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 517-523.
- RUAS-NETO, A.L.; SILVEIRA, S.M & COLARES, E.R.A. (1994). Mosquito control based on larvicides in the State of Rio Grande do Sul, Brazil: Choice of the control agent. *Cadernos de Saúde Pública*, 10: 222-230.
- SANCHES-VARGAS, I. *et al.* (2004). *Virus Research*, 102: 65-74.
- SCHWARZ, D.S. *et al.* (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Molecular Cell*, 10: 537-548.

- SEVERSON, W.S.; BROWN, S.E. & KNUDSON, D.L. (2001). Genetics and physical mapping in mosquitoes: Molecular Approaches. *Annu. Ver. Entomol*, 46: 183-219.
- SIDEN-KIAMOS, I. & LOUIS, C. (2004). Interactions between malaria parasites and their mosquito hosts in the midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 676-685.
- TAN, F.L. & YIN, J.Q. (2004). RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. *Cell Research*, 14: 460-466.
- TELLAM, R.S., WIJFFELS, G. & WILLADSEN, P. (1999). Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 87-101.
- TENERIUS, O. (2004). Anti-parasit an anti-viral imune responses in insects. Doctoral thesis, Stockholm: Department of Genetics, Microbiology and Toxicology, Stockolm University.
- TRAVANTY, E.A.; *et al.* (2004). Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 607-613.
- UCHIL, P.D. & SATCHIDANANDAM, V. (2003). Architeture of the flaviviral replication complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 24388-24398.
- UHLIROVA, M.; *et al.* (2003). Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demosntrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Developmental Biology*, 100: 15607-15612.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2005). The World Health Report 2005. 30 May 2005. <http://www.who.int/whr/2005/annexes3-4_en.pdf>