

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSETICIDA ESPECÍFICO CONTRA
Aedes aegypti E *Aedes albopictus* UTILIZANDO LEVEDURAS
TRANSGÊNICAS E A TECNOLOGIA DE INTERFERÊNCIA DE RNA.

FILIPPE TRINDADE BOZONI

**Botucatu - SP
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSETICIDA ESPECÍFICO CONTRA
Aedes aegypti E *Aedes albopictus* UTILIZANDO LEVEDURAS TRANSGÊNICAS
E A TECNOLOGIA DE INTERFERÊNCIA DE RNA.

FILIPPE TRINDADE BOZONI

ORIENTADOR: PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas (Genética).

**Botucatu - SP
2025**

B793d Bozoni, Filipe Trindade
Desenvolvimento de um bioinseticida específico contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* utilizando leveduras transgênicas e a tecnologia de interferência de RNA. / Filipe Trindade Bozoni. -- , 2025
50 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu,
Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

1. Genética microbiana. 2. Inseticidas biológicos. 3. *Aedes aegypti*.
4. *Aedes albopictus*. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSETICIDA ESPECÍFICO CONTRA *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus* UTILIZANDO LEVEDURAS TRANSGÊNICAS E A TECNOLOGIA DE INTERFERÊNCIA DE RNA.

AUTOR: FILIPE TRINDADE BOZONI

ORIENTADOR: PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA (Participação Virtual)
Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Prof. Dr. ADEMIR DE JESUS MARTINS JUNIOR (Participação Virtual)
Laboratório de Biologia, Controle e Vigilância de Insetos Vetores / Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Prof. Dr. IVAN DE GODOY MAIA (Participação Virtual)
Departamento de de Genética, Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Botucatu, 28 de abril de 2025

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

AGRADECIMENTOS

À minha noiva, Alexandra, meu amor e minha parceira em todos os caminhos da vida. Obrigado por todo apoio incondicional, pela paciência nos momentos difíceis e por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava. Nada disso seria possível sem sua presença constante. Hoje, além de companheira, você é também mãe da nossa filha Sofia, que já transforma o meu mundo antes mesmo de nascer, por isso meus agradecimentos vão também à ti, Sofia. Por você, quero ser melhor todos os dias, como pessoa, como pai e como cientista. Você me deu uma nova razão para valorizar o conhecimento, a curiosidade e a busca pela verdade, sempre com senso crítico e abertura ao questionamento. Espero poder te ensinar, com o exemplo, que a ciência é um caminho de construção coletiva, sem verdades absolutas, mas com muita paixão e propósito.

Aos meus pais, Fernando e Elaine, minha eterna gratidão. Vocês investiram tudo o que podiam, e muitas vezes o que não podiam, para que eu pudesse estudar. Todo esse esforço, sacrifício e dedicação de vocês se traduzem neste momento de conquista. Se hoje defendo meu mestrado, é porque vocês me deram a base, o incentivo e o amor necessários para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, que são para mim espelhos e projeções de futuro, meu carinho e minha admiração. Obrigada por estarem sempre por perto, mesmo nos silêncios.

Ao meu tio João Marcos, que partiu recentemente, deixo aqui uma lembrança especial. Tenho certeza de que você estaria orgulhoso de mim. Carrego comigo suas palavras, seu exemplo e sua torcida silenciosa.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Ribolla, muito obrigado por acreditar no meu projeto, pelo acompanhamento cuidadoso e pelas contribuições valiosas ao longo do caminho. A todo o grupo PANGENE em especial Diego, minha gratidão pela paciência, pelo tempo investido em me auxiliar nas análises, nas dúvidas e nas discussões que tanto me fizeram crescer.

À CAPES, agradeço pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste mestrado e me permitiu dedicar-me à pesquisa.

A todas essas pessoas, que de diferentes formas contribuíram para que este trabalho

acontecesse, meu muito obrigado. Este não é apenas um marco acadêmico, é também um retrato do apoio, da confiança e do amor que recebi ao longo da caminhada.

RESUMO

Aedes aegypti e *Aedes albopictus* são espécies de mosquitos vetores de doenças graves, como dengue, zika e chikungunya. O controle desses mosquitos é um desafio para a saúde pública em todo o mundo. O uso de inseticidas químicos é a abordagem mais utilizada de controle atualmente, porém o surgimento de resistência aos inseticidas químicos convencionais, a poluição ambiental e efeitos em espécies não-alvo causados por estes, dificultam ainda mais o processo de controle. Portanto, novas estratégias para o controle desses mosquitos são necessárias. O uso de tecnologias de interferência de RNA, como os *Short-hairpin* RNAs (shRNAs) tem o potencial de interromper a expressão de genes específicos nos mosquitos, como genes envolvidos no desenvolvimento neural e no metabolismo, se mostrando promissores para o controle de vetores. O presente estudo tem como objetivo desenvolver um bioinseticida específico para *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* usando shRNAs. O vetor escolhido para a produção e entrega de shRNA foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que tem se mostrado um sistema eficiente e seguro para a produção de RNA interferente. Foram identificados 2 genes alvo: 1) Semaforina-1a (SEMA1A), importante para o desenvolvimento neural dos mosquitos; 2) Receptor 1 da serotonina (5-HTR1) que expressam receptores que regulam numerosas cascatas de sinalização intracelular; Essenciais para os mosquitos e que já tem resultados publicados, então shRNAs foram projetados para silenciá-los. As sequências específicas para expressão dos shRNAs foram inseridas em plasmídeos os quais são clonados em *E.coli* e posteriormente transformados em leveduras, que transcrevem os shRNAs específicos, antes de serem inativadas por calor. Em seguida, os shRNAs, foram testados em larvas de mosquitos vivos em ensaios laboratoriais para a avaliação de aspectos como mortalidade e sobrevivência larval. Os resultados de ensaios laboratoriais demonstraram que o consumo de levedura SEMA1A e 5-HTR1 apresenta taxas de mortalidade significativas em larvas dos mosquitos *Aedes spp.* Estudos futuros devem ser realizados para otimizar a produção e entrega de levedura que expressa shRNA inseticida e, assim, melhor avaliar esta nova e promissora intervenção de controle de mosquitos, possibilitando o desenvolvimento de abordagens ainda mais eficazes baseadas nessa tecnologia.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; RNA de interferência; shRNA; bioinseticida; levedura; controle de vetores.

ABSTRACT

Aedes aegypti and *Aedes albopictus* are mosquito species that serve as vectors for serious diseases such as dengue, Zika, and chikungunya. Controlling these mosquitoes remains a global public health challenge. Chemical insecticides are currently the most widely used method of control; however, the emergence of resistance to conventional insecticides, along with environmental pollution and harmful effects on non-target species, further complicate vector management efforts. Thus, alternative and more sustainable mosquito control strategies are urgently needed. RNA interference (RNAi) technologies, such as short-hairpin RNAs (shRNAs), have the potential to silence specific genes in mosquitoes—particularly those involved in neural development and metabolism—making them a promising tool for vector control. This study aimed to develop a species-specific bioinsecticide targeting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using shRNAs. The delivery platform chosen was the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a safe and efficient system for producing interfering RNAs. Two essential genes were selected as targets: (1) Semaphorin-1a (SEMA1A), important for neural development; and (2) 5-Hydroxytryptamine receptor 1 (5-HTR1), which encodes serotonin receptors involved in numerous intracellular signaling pathways. Specific shRNA sequences were designed to silence these genes, cloned into plasmids, propagated in *E. coli*, and subsequently transformed into yeast. The engineered yeasts were heat-inactivated prior to mosquito bioassays. Laboratory tests involving live mosquito larvae demonstrated that ingestion of SEMA1A- and 5-HTR1-expressing yeast resulted in significant larval mortality in *Aedes spp.* Future studies should focus on optimizing both production and delivery of shRNA-expressing yeast to enhance the efficacy of this innovative and species-specific mosquito control strategy.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; RNA interference; shRNA; bioinsecticide; yeast; vector control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Criação de animais	20
3.2 Design dos vetores de expressão dos shRNAs	21
3.3 Transformação de <i>E. coli</i>	21
3.4 Minipreparação de plasmídeos bacterianos	22
3.5 Transformação das leveduras	22
3.6 Produção dos shRNAs	23
3.6.1 Cultivo das leveduras transgênicas	23
3.6.2 Preparação dos comprimidos de levedura inativada	23
3.7 Alimentação de larvas de mosquito com comprimidos de levedura recombinante.....	23
3.8 Avaliação da estabilidade do dsRNA por qRT-PCR	24
3.9 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	25
4.1 Inserção das sequências de interesse nos plasmídeos	25
4.2 Transformação bacteriana	26
4.3 Transformação das leveduras	26
4.4 Avaliação da atividade larvicida da levedura expressando shRNA correspondente ao gene <i>Sema1a</i>	27
4.5 Avaliação da atividade larvicida da levedura expressando shRNA correspondente ao gene <i>5-HTR1</i>	28
4.6 Estabilidade dos bioinseticidas	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses constituem um dos principais desafios sanitários globais, impactando significativamente a saúde pública e a economia de diversos países (THOMPSON et al., 2020). Essas doenças são causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos, e incluem patologias de grande importância epidemiológica, como dengue, zika, chikungunya e febre amarela (PRINCE et al., 2023). Nos últimos anos, a incidência dessas doenças tem aumentado substancialmente, impulsionada por fatores como a rápida urbanização, o crescimento populacional desordenado, a intensificação da mobilidade humana e as mudanças climáticas, que favorecem a expansão das áreas de distribuição dos vetores (DUVIGNAUD et al., 2024). Atualmente, vacinas vivas atenuadas para febre amarela e dengue foram licenciadas para uso clínico em alguns países. No entanto, não há vacinas disponíveis para zika e chikungunya. Dada a disponibilidade limitada de vacinas ou outros profiláticos eficientes, as estratégias atuais são principalmente direcionadas ao controle dos vetores usando inseticidas ou barreiras físicas. (PRINCE et al. 2023; TRIANA; MELO, 2024).

A dengue foi decretada pela Organização Mundial da Saúde como uma das dez maiores ameaças à saúde global em 2019 (WHO, 2019). A doença é causada por quatro sorotipos do vírus da família *flaviviridae*: *DENV-1*, *DENV-2*, *DENV-3* e *DENV-4* (ILIC; ILIC et al., 2024). Anteriormente ela era restrita a partes dos trópicos, porém atualmente é a arbovirose de maior prevalência mundial, sendo endêmica em mais de 125 países, com transmissão presente em todas as regiões da Organização Mundial da Saúde (OMS). A dengue é majoritariamente prevalente nas regiões do Pacífico Ocidental, Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental, Américas e África e cerca de 40% da população mundial (3,6 bilhões de pessoas) corre o risco de contrair a doença (DUVIGNAUD et al., 2024; DEHGHANI et al., 2021). Entre 1990 e 2017, o número de casos de dengue aumentou significativamente, passando de aproximadamente 23 milhões para mais de 104 milhões (ILIC; ILIC et al., 2024). Atualmente a incidência global de infecções por dengue é estimada em cerca de 400 milhões por ano, com 96 milhões de casos sintomáticos e aproximadamente 22.000 mortes, principalmente devido à febre hemorrágica da dengue e suas complicações (ALGHSHAM; SHARIQ; RASHEED et al., 2023). O impacto socioeconômico da doença é significativo, gerando altos custos para o

sistema de saúde e prejuízos à produtividade da população afetada (THOMPSON et al., 2020).

No Brasil, a dengue também tem sido a arbovirose mais prevalente, mantendo-se endêmica, com um aumento significativo nos casos nas últimas décadas e recorrentes surtos epidêmicos, o que gera grande preocupação para a saúde pública e economia do país (Pan American Health Organization, 2021; World Health Organization, 2021). A epidemia de 2024 configurou-se como a mais severa desde o início dos registros contínuos da doença, ocasionando mais mortes do que a COVID-19 neste ano, com 6,6 milhões de casos prováveis e mais de 6 mil óbitos em quase todos os estados, tivemos 300,7% de aumento no número de casos prováveis e 429,2% de aumento de óbitos em relação à 2023. As regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul foram as mais afetadas. Em 2025 até a 7ª semana epidemiológica, já foram registrados 365.456 casos prováveis da doença e 373 óbitos em investigação no Brasil (Ministério da Saúde, 2025). Na mesma semana, o governo de São Paulo decretou situação de emergência em saúde pública no estado em razão da epidemia por dengue (Secretaria de Saúde de SP, 2025). Esse cenário ressalta as limitações dos métodos convencionais de controle vetorial.

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus transmitido por mosquitos que ressurgiu recentemente em muitas partes do mundo, causando surtos em larga escala. A infecção por CHIKV se apresenta como uma doença febril conhecida como febre chikungunya (CHIKF). A infecção é autolimitada e caracterizada principalmente por dor articular intensa e mialgia que pode durar semanas ou meses; no entanto, a apresentação grave da doença também pode ocorrer (CAVALCANTI et al., 2022). O *CHIKV*, identificado pela primeira vez na Tanzânia em 1952, emergiu nas Américas em 2013. Desde que os primeiros casos autóctones de chikungunya foram relatados na Ilha de Saint Martin em dezembro de 2013, CHIKV se espalhou rapidamente e continuou a causar epidemias nas Américas. (SOUZA et al., 2024). O CHIKV circula localmente no Brasil desde 2014, com os primeiros casos restritos principalmente ao Nordeste (SOUZA et al., 2022). Desde 2016, o Brasil é o epicentro das epidemias de chikungunya nas Américas, com 1.659.167 casos, o maior número relatado na região. Em contraste com outros países e territórios nas Américas, o Brasil tem enfrentado epidemias anuais de chikungunya (DIAS et al., 2018). No Brasil, a variação espacial e temporal na incidência de chikungunya parece ser motivada por epidemias rápidas e localizadas, caracterizadas por altas taxas de infecção, seguidas por períodos de menor

incidência, provavelmente motivadas pela imunidade de rebanho de infecções anteriores por CHIKV. A disseminação rápida do *CHIKV* ocorreu principalmente devido à sua transmissão eficiente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que apresentam ampla distribuição geográfica e alta competência vetorial (SOUZA et al., 2024).

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus transmitido por mosquitos que leva a um comprometimento neurológico notável, cujo impacto mais dramático é a Síndrome Congênita do ZIKV (CZS). Foi isolado pela primeira vez em 1947 de um macaco rhesus febril na floresta Zika em Uganda (CHEN et al., 2022). O ZIKV tem como alvo células precursoras neuronais, levando à apoptose e comprometimento adicional do desenvolvimento neuronal, causando microcefalia, lisencefalia, ventriculomegalia e calcificações (POLONIO; PERON, 2021). Além disso, o ZIKV desenvolveu mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro, permitindo assim o estabelecimento da persistência viral e aumentando a patogênese viral (GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023). O vírus ganhou notoriedade mundial após a epidemia de 2015-2016. A capacidade do vírus de atravessar a barreira placentária e infectar fetos levou a uma crise de saúde pública global, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar o surto como uma emergência de saúde pública de importância internacional. Apesar da redução no número de casos desde o pico epidêmico, o *ZIKV* continua circulando em diversas regiões, apresentando potencial para novos surtos (CHEN et al., 2022).

A febre amarela, outra arbovirose de grande relevância epidemiológica, apresenta ciclos de transmissão silvestre e urbano. É transmitida por mosquitos encontrada em áreas tropicais e subtropicais na América do Sul e África (GAYTHORPE et al., 2020; MONATH et al., 2001). A transmissão é principalmente por meio das espécies de mosquitos *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*. Pode apresentar características clínicas variadas, desde uma doença febril leve e autolimitada até hemorragia grave e doença hepática. O "amarelo" vem da icterícia que afeta alguns pacientes com doença grave (MONATH et al., 2001). A febre amarela é diagnosticada pelo histórico de viagem para uma área endêmica, exposição a mosquitos infectados, histórico de vacinação, sintomas e achados laboratoriais. A maioria dos casos é autolimitada e se assemelha a muitas outras infecções virais comuns. Daqueles que desenvolvem o estado grave da doença, a mortalidade pode se aproximar de 50%. Não há terapia antiviral específica, mas há uma vacina eficaz recomendada para viajantes de áreas endêmicas (SIMON et al., 2025; MONATH et al., 2001). No Brasil o ciclo da doença atualmente é silvestre, com transmissão

por meio dos mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Os últimos casos de febre amarela urbana foram registrados no Brasil em 1942 e todos os casos confirmados desde então decorrem do ciclo silvestre de transmissão (Ministério da Saúde, 2025).

Os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais vetores responsáveis pela transmissão dos arbovírus anteriormente mencionados. O *Aedes aegypti*, comumente conhecido como o mosquito da febre amarela, é um vetor significativo de diversos arbovírus, incluindo os vírus da dengue, chikungunya e zika (TRIANA; MELO, 2024). Essa espécie possui uma história complexa de dispersão global e diversidade genética, tornando-se um foco crítico para os esforços de saúde pública em todo o mundo (SEVERSON, et al., 2004). *Aedes aegypti* é originário de ilhas do Sudoeste Asiático, depois migrou para a África e se espalhou globalmente por meio das rotas comerciais. Foi introduzido no Novo Mundo há aproximadamente 400-550 anos, principalmente através do tráfico transatlântico de escravizados. Nos séculos seguintes, a espécie expandiu-se para o Mediterrâneo, Ásia, Austrália e Pacífico Sul (GLORIA-SORIA et al., 2016; POWEL et al., 2018). A introdução nas Américas e na Ásia foi facilitada pelo comércio marítimo transatlântico e, posteriormente, por rotas globais de comércio (WEBB, 2016). A diversidade genética do *Aedes aegypti* é notável, sendo dividida em duas subespécies geneticamente distintas: *Ae. aegypti formosus* e *Ae. aegypti aegypti*. As populações fora da África apresentam uma estrutura altamente definida devido aos efeitos do fundador e às baixas taxas de migração, enquanto as populações africanas são menos estruturadas. Essa diversidade genética tem implicações significativas para estratégias de controle, especialmente aquelas que envolvem modificação genética (GLORIA-SORIA et al., 2016; SOGHIGIAN et al., 2020). O *Aedes aegypti* é um vetor competente para diversos vírus, apresentando suscetibilidade variável entre diferentes populações de mosquitos e cepas virais. Fatores como a microbiota do mosquito e a coinfeção com vírus específicos de insetos podem influenciar sua competência vetorial (SOUZA-NETO et al., 2018). Essa espécie exibe hábitos hematofágicos diurnos, preferindo alimentar-se de sangue humano, e utiliza criadouros artificiais, como recipientes plásticos, caixas d'água, pneus e vasos de plantas, para a oviposição (POWELL; TABACHNICK, 2013). Seu ciclo de vida varia entre 7 e 10 dias, dependendo das condições ambientais, e sua elevada taxa reprodutiva e adaptativa facilita sua disseminação em áreas urbanizadas (CASTRO et al., 2013).

O *Aedes albopictus*, comumente conhecido como mosquito-tigre-asiático, é uma espécie

altamente invasiva originária do Sudeste Asiático. Atualmente, está presente em todos os continentes e é um vetor competente para pelo menos 22 arbovírus, incluindo os vírus da zika, dengue e chikungunya e dirofilariose (GRATZ, 2004; MCKENZIE; WILSON; ZOHDY et al., 2019). Sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes e sua resistência às medidas convencionais de controle facilitaram sua disseminação global (GRATZ, 2004; PAUPY et al., 2009; BENELLI; WILKE; BEIER et al., 2020). O *Aedes albopictus* foi detectado em diversas regiões do mundo, incluindo América do Norte, Europa e África. Nos Estados Unidos, sua presença foi registrada em 1.241 condados de 40 estados, evidenciando sua ampla dispersão (HAHN et al., 2016; HAHN et al., 2017). No Canadá, o mosquito foi identificado pela primeira vez em Windsor, Ontário, em 2016, marcando uma significativa expansão de sua área de ocorrência (GIORDANO et al., 2020). Já em Camarões, o *Ae. albopictus* é predominante nas regiões do sul, demonstrando sua capacidade de adaptação a diferentes climas e ambientes (TEDJOU et al., 2019). Seu papel na transmissão das arboviroses tem sido cada vez mais reconhecido, especialmente em áreas onde o *Aedes aegypti* está ausente ou menos prevalente. A capacidade desse mosquito de transmitir múltiplos vírus representa uma séria ameaça à saúde pública, tornando essencial o fortalecimento das estratégias de vigilância e controle (GRATZ, 2004; HAHN et al., 2016; HAHN et al., 2017). Além disso, *Ae. albopictus* tem expandido progressivamente sua distribuição geográfica devido à sua maior plasticidade ecológica e tolerância a variações climáticas (BONIZZONI et al., 2013). Diferentemente do *A. aegypti*, essa espécie apresenta menor especificidade quanto ao hospedeiro, alimentando-se tanto de sangue humano quanto de outros mamíferos e aves, o que favorece sua dispersão e seu potencial como vetor de arbovírus.

Os métodos tradicionais de controle dos mosquitos vetores incluem o uso de inseticidas químicos, medidas de manejo ambiental e controle biológico. No entanto, a eficácia desses métodos tem sido comprometida pela crescente resistência dos mosquitos a compostos químicos como carbamatos, piretróides e organofosforados (MAZZARRI, GEORGHIOU, et al., 1995; MOYES et al., 2017; PALOMINO et al., 2022). Estudos realizados no Brasil e em outros países endêmicos demonstram que a resistência tem se intensificado, exigindo doses cada vez maiores de inseticidas, o que eleva os impactos ambientais e representa um risco à biodiversidade (BONMATIN et al., 2014; STEHLE; SCHULZ, 2015; SCHULZ et al., 2021). A resistência a inseticidas em mosquitos *Aedes* é amplamente distribuída e varia geograficamente. Nas Américas, África e Ásia, foram detectadas resistências às quatro

principais classes de inseticidas neurotóxicos: carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretroides (MOYES et al., 2017). Na América Latina e no Caribe, níveis elevados de resistência ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), temefós e deltametrina foram relatados, sem evidências de resistência cruzada entre esses inseticidas (MAESTRE-SERRANO et al., 2014; GUEDES et al., 2020). Na Ásia, a resistência também é disseminada, com taxas elevadas de resistência ao DDT e variações na resistência a outros inseticidas, como malatião e deltametrina (ZULFA et al., 2022). Os principais mecanismos de resistência em *Aedes* incluem mutações no sítio-alvo e aumento da detoxificação. Mutações associadas à resistência ao efeito knockdown (*kdr*), como F1534C, V1016G e S989P, são prevalentes e contribuem significativamente para a resistência aos piretróides (KANDEL et al., 2019; RAHMAN et al., 2021; ZULFA et al., 2022). Além disso, a resistência metabólica, por meio da superexpressão de enzimas do citocromo P450, como CYP9M6 e CYP9J28, desempenha um papel essencial na detoxificação de inseticidas, especialmente os piretroides (SMITH et al., 2016; VONTAS et al., 2020; RAHMAN et al., 2021) porém a ausência de ferramentas diagnósticas padronizadas e a escassez de dados em determinadas regiões dificultam a estimativa precisa dos níveis de resistência (MOYES et al., 2017). Além disso, a exploração de métodos alternativos de controle de mosquitos que não dependam exclusivamente de inseticidas químicos é recomendada para mitigar o desenvolvimento da resistência (PICHLER et al., 2018; KANDEL et al., 2019). O desenvolvimento de múltiplos inseticidas de siRNA para silenciar o gene alvo seria útil para combater a resistência resultante de uma mutação pontual em qualquer sítio alvo único (MYSORE et al., 2019).

A utilização de inseticidas químicos no controle de vetores e pragas tem contribuído significativamente para a poluição ambiental, afetando o solo, os recursos hídricos e a atmosfera. Resíduos de inseticidas aplicados em áreas urbanas e agrícolas podem se acumular em corpos d'água através da lixiviação e do escoamento superficial, contaminando rios, lagos e lençóis freáticos (STEHLER; SCHULZ, 2015). A presença de piretróides e organofosforados em águas superficiais tem sido associada à mortalidade de organismos aquáticos, incluindo peixes e invertebrados, devido à sua toxicidade neuroativa (SCHULZ et al., 2021). Além disso, muitos inseticidas são persistentes no ambiente e podem sofrer bioacumulação na cadeia alimentar, expondo predadores e mamíferos a riscos crônicos de toxicidade (BONMATIN et al., 2014). O uso indiscriminado de inseticidas também contribui para a emissão de compostos orgânicos voláteis, que podem reagir com óxidos de nitrogênio na

atmosfera, formando ozônio troposférico, um poluente com efeitos negativos na saúde humana e na vegetação (ZEINALI et al., 2011; HE et al., 2022).

O uso intensivo de inseticidas químicos, tem causado impactos significativos em organismos não alvo. Os inseticidas neonicotinóides afetam negativamente o desempenho dos artrópodes não alvos, reduzindo significativamente o sucesso reprodutivo e a sobrevivência de importantes polinizadores (MAIN et al., 2018). Estudos demonstram que neonicotinóides, piretroides e organofosforados, amplamente utilizados no controle de pragas e vetores, afetam negativamente a sobrevivência, comportamento e reprodução de abelhas (TSVETKOV et al., 2017). Esses compostos podem interferir nos sistemas neuromuscular e cognitivo desses insetos, reduzindo sua capacidade de navegação, aprendizado e retorno à colmeia, comprometendo a polinização e a manutenção da biodiversidade (Wood; Goulson, 2017). A contaminação do pólen e do néctar com resíduos de inseticidas também representa um risco significativo, pois pode resultar na transferência de toxinas dentro das colmeias, afetando significativamente a habilidade de voo, a busca por alimento e o retorno ao lar, que são vitais para a função normal da colônia e os serviços ecossistêmicos (TOSI; BURGIO; NIEH et al., 2017). Ademais, a exposição a neonicotinóides afetam negativamente invertebrados aquáticos, causando toxicidade a nível comportamental, genético e fisiológico potencialmente prejudicando toda rede ecológica aquática. (MALHOTRA et al., 2021; SCHULZ et al., 2021). Dessa forma, a contaminação ambiental e mortalidade de espécies não alvo associada ao uso de inseticidas químicos reduz a produtividade agrícola e ameaça a segurança alimentar global.

O alarmante cenário exposto, que ressalta o aumento substancial das arboviroses (THOMPSON et al., 2020) com condições cada vez mais favoráveis ao desenvolvimento dos mosquitos vetores em escala global (DUVIGNAUD et al., 2024) e das limitações dos métodos convencionais, amplamente baseados no uso de inseticidas químicos (MOYES et al., 2017; SCHULZ et al., 2021), gerando impacto direto na saúde pública e consequências ecológicas e econômicas severas, evidencia a necessidade de busca por soluções inovadoras e ambientalmente responsáveis que aliem eficácia no controle de vetores à minimização de impactos ambientais para mitigar a disseminação das arboviroses e garantir a proteção da biodiversidade e da saúde humana (KANDEL et al., 2019). Métodos biotecnológicos, como a interferência por RNA e o uso de agentes microbiológicos, surgem como alternativas promissoras, possibilitando um controle mais direcionado e sustentável (MYSORE et al.,

2021).

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo endógeno de regulação gênica baseado na degradação específica de RNA mensageiro (mRNA) mediada por pequenos RNA de fita dupla (dsRNA), como os small interfering RNAs (siRNAs) e os short-hairpin RNAs (shRNAs) (FIRE et al., 1998; SONTHEIMER, et al. 2005). O RNAi é um processo de várias etapas. Quando o dsRNA é introduzido nas células, ele é primeiro reconhecido e processado em pequenos RNAs interferentes de 21–23 pares de bases (siRNA) pela Dicer, uma ribonuclease da família RNase III. Esses curtos RNAs interferentes são então incorporados e direcionam o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) para o RNA alvo. O RISC é um complexo de nucleases responsável pela degradação final do mRNA alvo e pelo silenciamento do gene (SONTHEIMER, et al., 2005). O principal componente da maquinaria RISC é a proteína Argonauta 2 (Ago2), que confere atividade catalítica à fita de mRNA complementar. Após a complementação direcionada da fita guia ao mRNA, o Ago2 regula negativamente a expressão gênica clivando moléculas de mRNA e, portanto, inibindo a tradução de um mRNA específico (MEADE; DOWDY, 2008). Os oligonucleotídeos de siRNA (21–22 pares de bases) podem ser gerados por síntese química (MICURA, 2002) ou por transcrição in vitro usando a RNA polimerase T7 (YU; DERUITER; TURNER, 2002). Alternativamente, os siRNAs podem ser expressos endogenamente na forma de RNA de grampo curto (shRNA), entregues às células por meio de plasmídeos ou vetores virais/bacterianos (BRUMMELKAMP; BERNARDS; AGAMI, 2002). Essa tecnologia tem sido explorada como uma alternativa promissora para o controle de insetos vetores, através do silenciamento de genes essenciais à sobrevivência dos mosquitos (WHYARD et al., 2015). Um bioinseticida baseado em RNAi destacar-se-ia pela alta especificidade, atuando diretamente na regulação de genes fundamentais para o desenvolvimento da espécie alvo (MYSORE et al., 2019). Alguns estudos demonstram que a entrega de shRNAs por meio da alimentação pode reduzir substancialmente a viabilidade dos mosquitos, interrompendo seu ciclo de vida de maneira eficaz (JOGA et al., 2016; MYSORE et al., 2021). A ampla aplicação da interferência de RNA para prevenção de doenças depende da produção de dsRNA de forma economicamente viável, escalável e sustentável, bem como da identificação de métodos seguros e eficazes para entrega de RNA. Pesquisas atuais despertaram interesse no uso de *Saccharomyces cerevisiae* para essas aplicações. (DUMAN-SCHEEL, 2019). A levedura é um forte atrativo odorífero para larvas de mosquitos, que consomem facilmente a

levedura larvicida. As propriedades larvicidas das linhagens de levedura são preservadas após a inativação pelo calor (MYSORE et al., 2017; HAPAIRAI et al., 2017), uma descoberta importante que permitiria o uso de microorganismos mortos, em vez de organismos vivos geneticamente modificados, para o controle de mosquitos em campo. Além disso, a propagação do RNA interferente por meio do cultivo de levedura, pode tornar essa intervenção econômica. Os processos de fermentação são facilmente dimensionados de pequenas culturas de agitação para culturas em escala de produção maior. Elas são cultivadas em todo o mundo há milhares de anos, e essa tecnologia pode ser adaptada a países com recursos limitados e infraestruturas restritas. A levedura seca também pode ser embalada e enviada, facilitando a distribuição regional de pesticidas de levedura. *S. cerevisiae*, que não é tóxico para humanos, é vendido como um suplemento dietético e usado globalmente em alimentos, bebidas alcoólicas e preparação de alimentos (DUMAN-SCHEEL, 2019).

Por outro lado, a implementação generalizada de estratégias de gerenciamento de pragas baseadas em RNAi é atualmente dificultada por resultados ineficientes e altamente variáveis quando diferentes espécies de insetos, linhagens, estágios de desenvolvimento, tecidos e genes são alvos (COOPER et al., 2019; PRATES et al., 2024) ressaltando a necessidade de mais estudos para aprimoramento e melhor desenvolvimento dessa tecnologia para controle de vetores. Assim, o presente projeto tem como objetivo identificar genes-alvo importantes para a sobrevivência dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e avaliar a eficácia do uso de bioinseticidas baseados em RNA interferente para o controle desses vetores. Espera-se que este estudo possa contribuir para o desenvolvimento de estratégias inovadoras e sustentáveis para mitigação da transmissão de arboviroses e melhor elucidação da atividade de RNAi em mosquitos.

2 OBJETIVOS

Buscar alvos eficientes para os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

Desenvolver a tecnologia necessária para a produção de shRNAs em *Saccharomyces cerevisiae* no laboratório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Criação de animais

Os mosquitos (*Ae aegypti*: cepa Rockefeller; *Ae albopictus*: ovos coletados em Manaus) usados nesta investigação foram criados seguindo protocolos estabelecidos por Anjolette A.F.F., 2016 com algumas adaptações. Os mosquitos foram mantidos no insetário do Instituto de Biotecnologia de Botucatu (IBTEC) com climatização controlada na temperatura de 28° C e umidade relativa de 70%, com fotoperíodo de 12h de luz/ 12h de escuridão. Os mosquitos adultos foram alocados em gaiolas com telas (30 cm x 30 cm x 30 cm) e alimentados com solução de sacarose 10%, e sangue de carneiro heparinizado. Os ovos foram colocados em bandejas (27 cm x 19 cm x 7cm) contendo 1L de água deionizada. Ao atingir o estágio larval, elas foram alimentadas com comida de peixe triturada (Tetramim, 100 mg/L).

3.2 Obtenção dos genes alvos

A fim de identificar genes essenciais para a sobrevivência dos mosquitos, realizamos uma triagem de alvos pela literatura. Identificamos genes relacionados com processos metabólicos, sinalização celular e desenvolvimento dos mosquitos, então, para a escolha das melhores sequências-alvo dentro dos genes escolhidos, verificamos sequências com menor probabilidade de ocorrência de polimorfismos utilizando dados de sequenciamento disponíveis publicamente para *Aedes spp.* no NCBI. Além disso, fatores como complexidade da sequência (entropia) e especificidade para a espécie usando BLASTn foram avaliados e apenas sequências específicas foram retidas. Após a filtragem, as sequências-alvo foram submetidas ao algoritmo do VectorBuilder (<https://en.vectorbuilder.com>) e escolhidas baseadas no Score. Uma vez identificados os genes alvo, utilizamos estratégias para design e expressão dos shRNAs, detalhadas nos próximos tópicos para potencialmente silenciar a expressão desses genes e avaliar o efeito na sobrevivência e desenvolvimento dos mosquitos (Baum, J.A. et al., 2007). Genomas de referência, código NCBI: *Aedes aegypti*: GCF_002204515.2; *Aedes albopictus*: GCF_035046485.1).

3.3 Design dos vetores de expressão dos shRNAs

A partir dos genes alvos identificados na etapa 3.2, foram projetados os oligonucleotídeos personalizados (Integrated DNA Technologies) que são inseridos nos plasmídeos (vetores de expressão ou Shuttle vector) por PCR de fragmento longo. Para a reação utilizamos 10 µM de um plasmídeo molde purificado, 10 µM do primer forward, 10 µM do primer reverse (ambos referentes a sequência de interesse), 7 µL de água nuclease-free e 10µL de 2X GoTaq® Long PCR master mix, para uma reação final de 20 µL. A reação foi realizada em equipamento de PCR com os seguintes passos: 98°C, 2 min para desnaturação inicial, e 18 ciclos de 98°C, 10s, 64°C, 15s e 72°C, 75s. Ao final dos ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C por 1 min. Após a termociclagem a reação é tratada com 1 µL da enzima DpnI (Promega) a 37°C por 3 horas. A enzima Dpn I cliva sequências metiladas, clivando assim o plasmídeo molde que contém metilações por ter passado pela maquinaria celular da *E.coli*, mantendo os plasmídeos recém sintetizados pela long PCR one step contendo as sequências de interesse. Utilizamos o *shuttle vector* pRS426 GPD que permite a expressão constitutiva de insertos no sítio múltiplo de clonagem a jusante de um promotor GPD e a montante de um terminador *cyc1* (Mumberg D, Muller R, Funk M, 1995). O pRS426 possui um marcador de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*, na qual são realizadas todas as experiências de clonagem. O marcador URA3 possibilita a seleção de *S. cerevisiae* que foram transformados com sucesso com o constructo (Mysore, et al., 2019). O gene URA3 codifica a enzima orotidina 5'-fosfato descarboxilase, que desempenha um papel chave na biossíntese de uracila. A cepa de levedura aqui utilizada possui uma mutação no gene URA3, portanto são incapazes de sintetizar uracila, tornando-as dependentes de fontes externas para seu crescimento. Ao introduzir um vetor de expressão contendo o gene URA3 na célula de levedura deficiente em URA3, é possível restaurar a capacidade da célula de sintetizar uracila. Isso permite que as células transformadas se desenvolvam em meio de cultura que não contém uracila (SCD-URA), enquanto as células não transformadas não sobrevivem nesse meio.

3.4 Transformação de *E.coli*

Os *Shuttle vectors* contendo as regiões para expressão dos shRNAs construídos na etapa 3.3

foram inseridos em *E.coli* por um protocolo de transformação de bactérias quimicamente competentes. Para isso, 2 µL da reação de ligação (plasmídeo + Inserto; 5 - 10 ng de DNA) são adicionados a 50 µL da cultura de células competentes DH5-α® (Invitrogen MAX Efficiency DH5α - ref 18258-012) e colocadas no gelo por 30 min, em seguida são mantidos a 42° C por 45 segundos, novamente inseridos no gelo por 2 min e então são incubadas em meio SOC a 37° C por 1 hora a 225 rpm para recuperação das células. Então, 150 µL da reação são plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (10 mg/mL) a 37° C overnight.

3.5 Minipreparação de plasmídeos bacterianos

Para extração e purificação dos plasmídeos bacterianos clonados na etapa 3.4, foi utilizado o kit E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (D6943-02) (OMEGA bio-tek) conforme manual do fabricante. Os plasmídeos eluídos foram quantificados utilizando fluorometria (Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kits) e uma reação de PCR foi realizada para confirmação da presença dos plasmídeos na região de 6.600 pb. A confirmação de que a sequência de interesse estava nos plasmídeos foi realizada por sequenciamento Sanger. Os plasmídeos são armazenados a -20°C até o momento da transformação das leveduras.

3.6 Transformação das leveduras

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nesse estudo foi a BY4742. Para transformá-las com nossos plasmídeos de interesse isolados na etapa 3.5, elas foram cultivadas em meio YPD a 30°C overnight até a densidade óptica a 600 nm (OD600) de aproximadamente 0,8, então foram centrifugadas a 1000 g por 5 min, o meio foi descartado, e as células foram ressuspensas em 25 mL de água ultrapura. As células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de acetato de lítio (LiAc) 0,1 M. A suspensão foi transferida para microtubo de 1,5 mL, centrifugada a 8000 rpm por 1 min, o sobrenadante foi removido com uma pipeta e as células foram ressuspensas em 200 µL de LiAc 0,1 M, atingindo um volume de aproximadamente 250 µL, então foram separadas em microtubos de 1,5 mL com 50 µL em cada, centrifugadas e o sobrenadante foi

removido. O DNA de esperma de salmão foi desnaturado a 100°C por 5 min e rapidamente colocado em gelo, então o preparo dos mix de transformação foi iniciado, consistindo em: 240 µL de Polietilenoglicol (PEG) 50%, 36 µL de LiAc 1 M, 50 µL de DNA de esperma de salmão desnaturado (2 mg/mL), ~3 µg de DNA plasmidial e água ultrapura até o volume final de 360 µL. Em seguida, o mix foi adicionado aos pellets celulares, homogeneizado e incubado a 42° C por 20 min. Por último, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 1 min, o sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas em 600 µL de água ultrapura e plaqueadas em meio seletivo sem uracila (SCD-ura) a 30° C por 2 - 3 dias.

3.7 Produção dos shRNAs

3.7.1 Cultivo das leveduras transgênicas

Uma colônia individual de cada levedura transformada com os plasmídeos contendo as sequências de interesse (experimental ou controle) são cultivadas em 2 mL de meio SCD-ura a 30°C e 250 rpm por 24h (em tubos de cultura de 10 mL), então essa cultura é transferida para erlenmeyers de 1L contendo 250 µL de meio SCD-ura e cultivadas até a D.O 600 estar entre 2.5 e 3.0 (~42h), também a 30°C e 250 rpm.

3.7.2 Preparação dos comprimidos de levedura inativada

As culturas de 250 mL foram separadas em 5 tubos de centrífuga de 50 mL, então foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram inativadas com um choque térmico a 70°C por 5 min em banho-maria. Após a inativação, as células foram transferidas para microtubos de 2 mL, centrifugadas a 13000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi removido com uma micropipeta. Em seguida, foram deixadas por 48h a 30°C em incubadora com boa ventilação externa para secagem dos pellets, resultando em comprimidos de shRNA com leveduras inativadas de aproximadamente 40 mg.

3.8 Alimentação de larvas de mosquito com comprimidos de levedura recombinante.

Ensaio de laboratório foram realizados nos quais larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* foram alimentadas com comprimidos controle (leveduras que expressaram shRNA sem alvo

conhecido em *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*) ou comprimidos contendo larvicida de RNA interferente. Beckers de 100 mL foram preparados com 50 mL de água destilada, cada recipiente recebeu um comprimido controle ou experimental e 20 larvas recém-eclodidas foram adicionadas. Cada grupo experimental e espécie teve ao menos 3 replicatas (3 recipientes com 20 larvas e 1 comprimido de 40 mg cada). Quando as larvas atingiram o estágio L4, comida de peixe triturada foi adicionada como suplemento nutricional. A sobrevivência das larvas foi monitorada diariamente.

3.9 Avaliação da Estabilidade do dsRNA por qRT-PCR

Para avaliar a estabilidade do dsRNA utilizado como bioinseticida, foram analisadas amostras armazenadas sob diferentes condições de temperatura e tempo. O dsRNA foi mantido em três condições de temperatura: temperatura ambiente (TA), 4 °C e -20 °C, sendo as análises realizadas após 1, 2, 3 e 4 semanas, além de um ponto adicional de 3 meses de armazenamento. A quantidade relativa de RNA foi determinada por meio de *quantitative reverse transcription PCR* (qRT-PCR). A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando o kit *YeaStar RNA Kit (Zymo Research)*, seguindo as instruções do fabricante. A integridade e concentração do RNA extraído foram verificadas por fluorometria [Qubit RNA Broad (ThermoFisher)] e eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, o RNA foi tratado com DNase I para remoção de DNA genômico e posteriormente transcrito em cDNA utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher)*. A qRT-PCR foi realizada utilizando primers específicos para os dsRNA. Cada reação foi realizada em triplicata, com controles negativos. A análise foi conduzida no equipamento *QuantStudio3 (Applied Biosystems)*. A quantificação relativa do RNA foi obtida pelo método do $\Delta\Delta C_t$, utilizando como referência uma amostra de dsRNA recém sintetizado (tempo zero). Os dados foram expressos como porcentagem da quantidade inicial de RNA (%), permitindo a comparação entre os diferentes tempos e temperaturas de armazenamento. A análise estatística foi conduzida utilizando análise de variância (ANOVA) multifatorial, considerando os fatores tempo, temperatura e sua interação. Os testes foram considerados significativos para $p < 0,05$.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste t, seguindo métodos propostos por Mysore et al., (2019). Ou ANOVA de uma via em caso de comparações de mais de 2 grupos. ANOVA de duas vias foi usada em caso de análise sobre o efeito de dois fatores independentes sobre uma variável dependente. Usando o software GraphPad Prism versão 10.0.0 para Windows, (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Caso a mortalidade no grupo controle fosse inferior a 2%, seria corrigida de acordo com a fórmula de ABBOTT (1925).

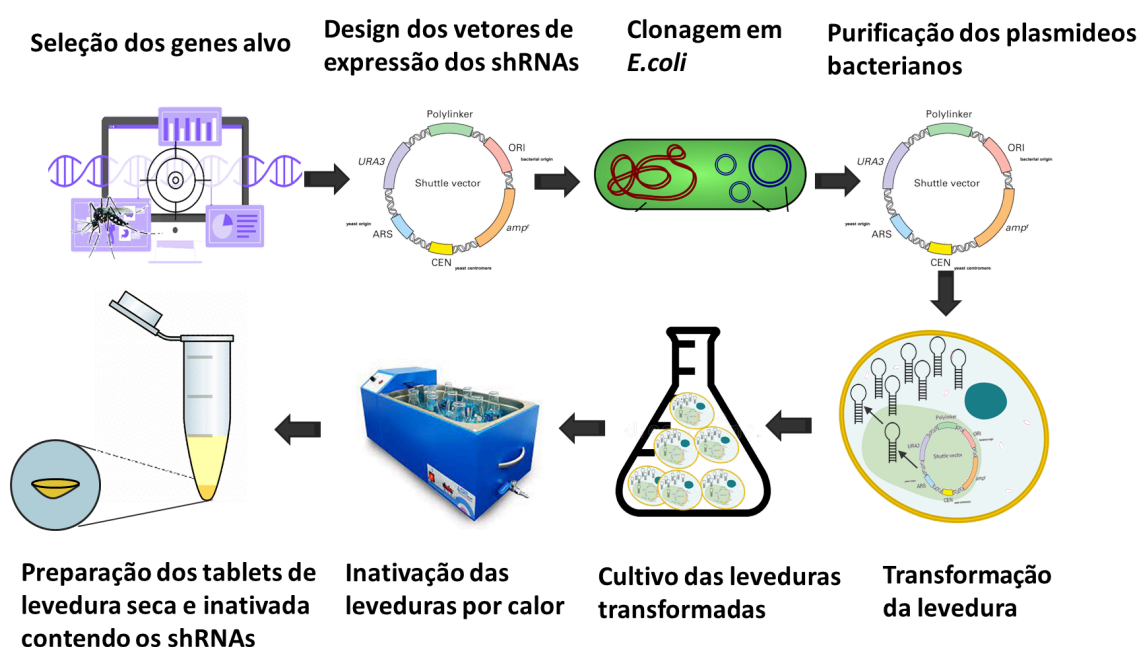


Figura1: representação das etapas do processo de produção do bioinseticida de levedura seca inativada (imagem elaborada pelo autor).

4 Resultados

4.1 Inserção das sequências de interesse nos plasmídeos

O design dos vetores de expressão ocorreu com sucesso. Após a triagem, os oligonucleotídeos personalizados (adquiridos na *Integrated DNA Technologies*) corresponderam às seguintes sequências alvo: 5'-AUU AUC GUC GCG GUG ACG GAU-3' em SEMA1A (AAEL019771

) - sequência idêntica à já publicada por Mysore et al 2019.; 5'-UUC AUC GUG UUC CUC ACA UUU-3' em 5-HTR1 - sequência inédita desenhada em nosso laboratório baseada no protocolo 3.2); E uma sequência controle que não está presente em nenhuma das espécies de mosquitos: 5'-CCG UCC AAG CUG GAG UAU UAU C -3'.

Por meio de uma PCR de fragmento longo inserimos em plasmídeos molde, as sequências correspondentes presentes nos oligonucleotídeos. A **figura 2a** representa a PCR de fragmento longo realizada para inserir as sequências codificadoras dos shRNAs para os alvos: Sema1A, 5-HTR1 e Controle, testando 2 master mix diferentes: GoTaq Long PCR (PROMEGA) e HiFi HotStart (KAPA Biosystems), doravante denominados LONG e KAPA respectivamente. Essa reação amplifica o plasmídeo inteiro que tem por volta de 6600 pb (região aproximada onde se encontram as bandas)

4.2 Transformação bacteriana

A inserção dos plasmídeo com os insertos de interesse nas bactérias (*E.coli*), para clonagem, ocorreu com sucesso. A **figura 2b** representa a corrida eletroforética realizada após a purificação dos plasmídeos inseridos nas bactérias, confirmando a presença deles nas amostras que foram posteriormente inseridas nas leveduras.

4.3 Transformação das leveduras

A transformação das leveduras com os plasmídeos clonados pelas bactérias ocorreu com êxito. A **figura 2c** mostra o gel de eletroforese após a PCR das colônias de leveduras transformadas utilizando os primers M13 forward e reverse, que permitem a amplificação de uma região de 1300 pb que contém os insertos. Fizemos diferentes diluições (1:10 e 1:100) das colônias antes da PCR pois notamos que em alguns experimentos as amplificações só aparecem se a colônia for previamente diluída (observar na figura 2C que na amostra 16 (concentração 1) não aparece as amplificações enquanto nos poços 17 e 18 (amostras diluídas 1:10 e 1:100 respectivamente) elas aparecem).

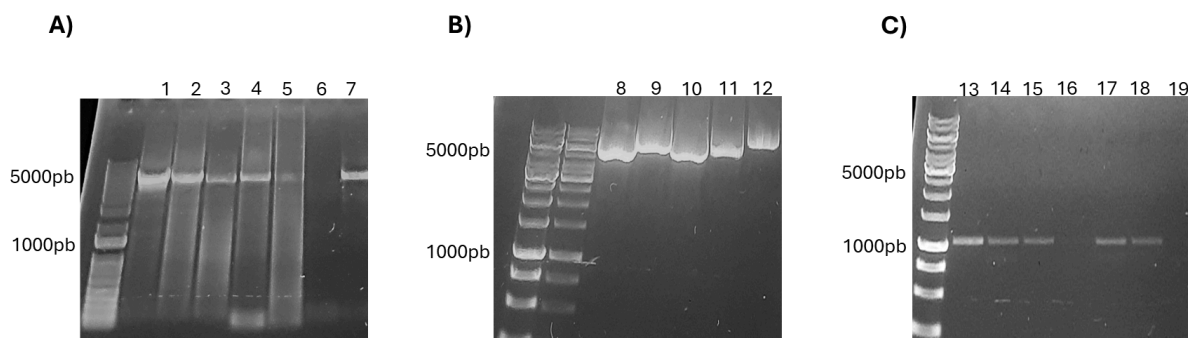


Figura 2. Géis de eletroforese confirmando que algumas etapas foram bem sucedidas. **a)** As sequências Sema1A, 5-HT1 e Controle foram inseridas nos plasmídeos (6,6 kb) por long PCR testando a eficiência de 2 master mix (LONG e KAPA). 1-Sema1A LONG; 2-5HTR1 LONG; 3-Controle LONG; 4-Sema1A KAPA; 5- 5HTR1 KAPA; 6- controle negativo; 7- Controle KAPA. **b)** Eletroforese dos plasmídeos (6,6 kb) inseridos e clonados em *E.coli*, extraídos e purificados. 8-Sema1A; 9- 5HTR1; 10- Controle; 11- amostra Sema1A mais antiga, 12- amostra do gene Rbfox (que pretendemos testar como alvo futuramente). **c)** gel de eletroforese da PCR das colônias de leveduras transformadas com os genes: 13- Sema1A; 14- Sema1A 1:10; 15- Sema1A 1:100; 16- 5HTR1; 17- 5HTR1 1:10; 18- 5HTR1 1:100; 19- controle negativo (imagem elaborada pelo autor).

4.4 Avaliação da atividade larvícida da levedura expressando shRNA correspondente ao gene Sema1a

S. cerevisiae expressando shRNA correspondente ao gene Sema1a apresentou atividade larvícida significativa contra *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. No ensaio de imersão larval observamos significativa mortalidade do grupo que ingeriu o candidato a bioiseticida em relação ao grupo controle em *Aedes aegypti* ($57 \pm 3\%$ vs $3 \pm 2\%$, respectivamente) ($p=0,0002$) (**figura 3a**) e em *Aedes albopictus* ($53 \pm 13\%$ vs $10 \pm 6\%$, respectivamente) ($p=0,04$) (**figura 3b**). As curvas de sobrevivência demonstraram que a maioria das mortes ocorreram entre os estágios L4 e pupa dos mosquitos que ingeriram shRNA larvícida (**Figura 3 c e d**) enquanto as larvas controle, que ingeriram shRNA inespecífico, sobreviveram até a idade adulta.

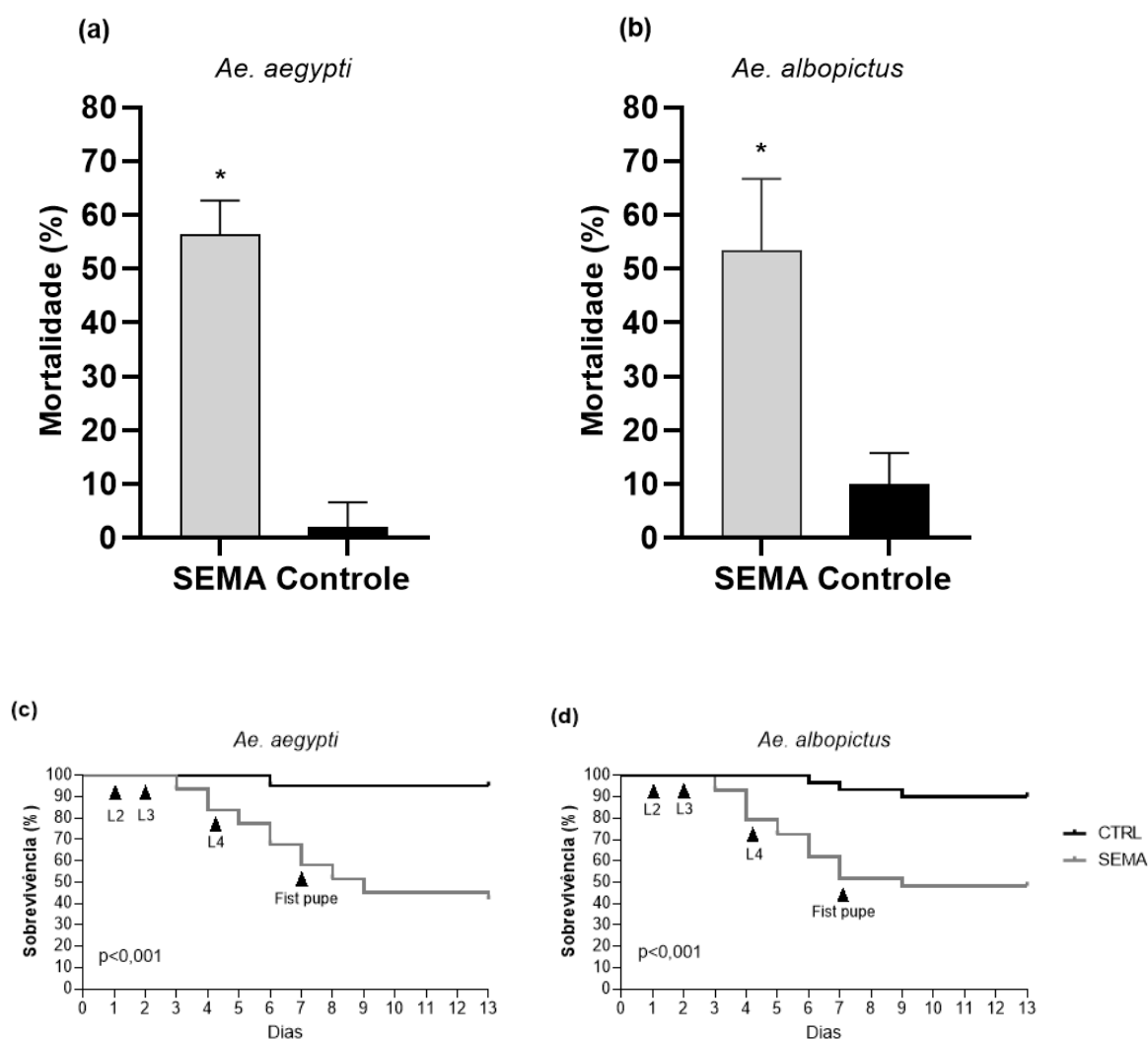


Figura 3. Silenciar o gene Sema1a induziu mortalidade significativa de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no experimento de imersão larval. A triagem foi realizada em triplicata (20 animais/tratamento) totalizando 60 animais de cada espécie por grupo tratado ou controle. **A)** percentual de mortalidade de *Ae. aegypti* **B)** percentual de mortalidade de *Ae. albopictus*; **C)** curva de sobrevivência de *Ae. aegypti*; **D)** curva de sobrevivência de *Ae. albopictus*. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.5 Avaliação da atividade larvicida da levedura expressando shRNA correspondente ao gene 5-HTR1

No ensaio de imersão larval com o produto de levedura transgênica que produz shRNA com alvo no gene 5-HTR1, utilizamos a sequência alvo que escolhemos dentro do gene com base

no protocolo descrito no tópico 3.2. No experimento observamos significativa mortalidade em relação ao grupo controle em *Aedes aegypti* ($61 \pm 14\%$ vs $6 \pm 5\%$, respectivamente) ($p=0,0118$) (**figura 4 a**). As curvas de sobrevivência demonstraram que a maioria das mortes ocorreram entre os estágios L4 e pupa dos mosquitos que ingeriram shRNA visando o gene 5-HTR1 (**Figura 4 b**) enquanto as larvas controle, que ingeriram shRNA sem nenhum alvo conhecido de *Aedes*, sobreviveram até a idade adulta.

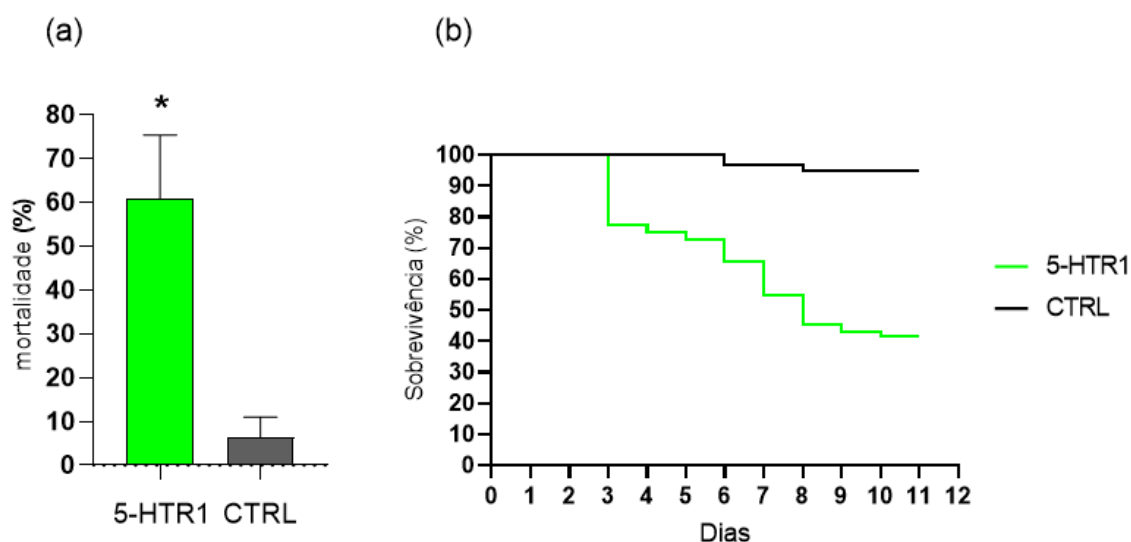


Figura 4. O consumo de levedura expressando shRNA correspondente ao gene 5HT-1 apresentou mortalidade significativa de *Ae. aegypti*. A triagem foi realizada em triplicata (20 animais/tratamento) totalizando 60 animais de cada espécie por grupo tratado ou controle. **a)** percentual de mortalidade de *Ae. aegypti*. **b)** curva de sobrevivência de *Ae. aegypti*; * $P<0,05$ em relação ao grupo controle.

4.6 Estabilidade dos bioinseticidas

Avaliamos o efeito do tempo de armazenamento (1, 2, 3, 4 semanas [Tabela 1] e 3 meses [Tabela 2]) e da temperatura (Temperatura ambiente [TA], 4 °C e -20 °C) sobre a quantidade relativa de RNA (%), obtida por qRT-PCR em relação a uma amostra recém sintetizada. A

análise revelou que tanto a temperatura ($p < 0,0001$) quanto o tempo ($p < 0,0001$) tiveram efeitos estatisticamente significativos sobre a estabilidade do RNA, assim como a interação entre ambos os fatores ($p < 0,0001$) (Tabela 3).

Tabela 1. Quantificação relativa de RNA em amostras de bioinseticida armazenadas em diferentes temperaturas ao longo de 4 semanas em relação à amostras recém produzidas.	
Amostras	Quantidade Relativa de RNA (%)
TA 1	98,90
TA 2	95,73
TA 3	95,85
TA 4	96,78
4° 1	100,34
4° 2	97,64
4° 3	97,93
4° 4	98,64
-20° 1	99,04
-20° 2	98,40
-20° 3	99,21
-20° 4	99,10

Tabela 2. Quantificação relativa de RNA em amostras de bioinseticida armazenadas em diferentes temperaturas após 3 meses em relação à amostras recém produzidas.	
Amostras	Quantidade Relativa (%)
TA M3	92,95
4° M3	95,62
-20° M3	101,95

Tabela 3. ANOVA bifatorial da estabilidade do RNA em função do tempo e da temperatura.			
Fator	F (Fisher)	p-valor	Significância
Temperatura	291,6	2.20×10^{-20}	Altamente significativa
Tempo	80,17	1.42×10^{-15}	Altamente significativa
Temperatura X Tempo	58,45	3.47×10^{-16}	Altamente significativa

5 Discussão

Neste estudo, realizamos uma análise do larvicida de levedura que se mostra uma nova abordagem promissora para o amplo controle de mosquitos. Iniciamos os tratamentos tendo

como alvo o gene *Sema1A* e 5-HTR1. A mortalidade causada com o primeiro alvo foi significativa em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, a provável causa da morte foram defeitos neurais significativos nas larvas, causados pelo silenciamento do gene, já que a semaforina-1a é essencial para o desenvolvimento do cordão nervoso ventral nos mosquitos *Aedes aegypti* (HAUGEN et al., 2011; MYSORE et al., 2019). A mortalidade causada ao silenciar o gene 5-HTR-1 também se deu possivelmente por defeitos neurais na via serotoninérgica, como explicado por Mysore (2023). A sobreposição das distribuições geográficas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (MONAGHAN et al., 2019) sugere que um larvicida único de RNA interferente pode ser eficaz para controlar ambas as espécies, já que elas frequentemente utilizam os mesmos criadouros. O fato de que o alvo é específico para mosquitos sugere que ele pode representar uma nova estratégia de controle sem impacto em outros organismos não alvo, como outros artrópodes polinizadores. Isso é corroborado pelos resultados de Mysore (2019) nos quais o silenciamento do gene *Sema1A* não apresentou toxicidade para outros insetos, como a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) e crustáceos aquáticos (*Daphnia pulex* e *Daphnia magna*). Além de sua eficácia, o bioinseticida aqui proposto também pode ajudar a combater a resistência aos inseticidas convencionais, que é um problema crescente relatado em diversos países (POLSON et al., 2010; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2014; LAU et al., 2015; VONTAS et al., 2020; WIPF et al., 2022). Estudos demonstram que mesmo as larvas que sobrevivem ao tratamento, não desenvolvem resistência ao larvicida ou à técnica de RNAi. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato de que as larvas sobreviventes podem estar se alimentando de outras larvas mortas, em vez de se alimentarem da levedura larvicida (MYSORE et al., 2019). Porém, é necessário um processo de investigação mais detalhada para determinar se a resistência aos larvicidas de levedura pode surgir em *Aedes spp.* ao longo do tempo.

Embora a ausência de maquinaria de RNAi própria em *S. cerevisiae* (DRINNENBERG et al., 2009) possa inicialmente parecer uma desvantagem, a levedura tem se mostrado um sistema ideal para expressão e acumulação de altos níveis de RNA interferente recombinante e um sistema seguro para entrega do RNA interferente, tornando-o um excelente sistema para essa finalidade (DUMAN-SCHEEL, 2019). A levedura serve não apenas como um sistema de produção de shRNA, mas também como um forte atrativo para larvas de mosquitos, servindo então, como isca para atrair e matar esses vetores (HAPARAI et al., 2017). Além disso, a levedura pode ser facilmente cultivada em grande escala em todo o mundo e é uma fonte de

nutrição comum para larvas de mosquitos. Ela também é amplamente segura para consumo humano, visto que vem sendo utilizada há muito tempo em produtos como bebidas e pães (DUMAN-SCHEEL, 2019) o que pode tornar sua utilização mais facilmente aceitável do que os pesticidas químicos tradicionais. Estudos mostraram que a levedura inativada pelo calor, na qual o RNA interferente foi expresso, pode ser tão eficaz quanto a levedura viva no controle das larvas de mosquitos (MYSORE et al., 2017), isso é importante no tocante a possibilidade de utilização desse larvicida em água tratada, garantindo que nenhum microorganismo advindo do bioinseticida voltaria a crescer naquele ambiente. No entanto, antes que os larvicidas de levedura possam ser comercializados, serão necessários testes toxicológicos e aprovações regulatórias. Embora algumas organizações já tenham aprovado pesticidas agrícolas baseada em RNAi (EPA. Pesticides, 2016), a utilização de leveduras geneticamente modificadas precisará ser aprovada em cada país onde serão utilizadas, o que pode ser um desafio em alguns lugares. Pesquisas mostraram que *Saccharomyces cerevisiae* transgênica, produtora de shRNA, induziu altos níveis de mortalidade larval em mosquitos também em experimentos de campo, sugerindo que vale a pena continuar desenvolvendo essa tecnologia (Stewart, A.T.M, et al., 2023; MYSORE et al., 2019). Áreas importantes para desenvolvimento adicional incluem a otimização da produção de RNA em *S. cerevisiae*, a produção em larga escala de larvicidas de levedura e o desenvolvimento de métodos de formulação e encapsulamento para garantir a estabilidade e eficácia do produto. A avaliação do custo relativo dessa tecnologia em comparação com outros larvicidas também será fundamental.

Larvicidas de RNA interferente baseados em levedura podem ser úteis não apenas para o controle de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, mas também para controlar outros mosquitos vetores de doenças. Sema1A é um alvo conservado em espécies de mosquitos, incluindo *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles gambiae* e *Culex quinquefasciatus*, mas suas funções de desenvolvimento variam de acordo com a espécie (HAUGEN, et al., 2011) porém todas elas foram suscetíveis ao tratamento nos ensaios de Mysore (2019). Embora os pellets de levedura seca inativada venham mostrando eficácia em testes laboratoriais, é necessário mais trabalho para determinar as formulações mais eficazes para o controle de cada espécie em diferentes habitats. Comprimidos de levedura inativada podem ser uma opção conveniente para o tratamento de recipientes próximos às residências dos consumidores, com o potencial de atrair fêmeas grávidas para depositar ovos nos recipientes tratados (HAPAIRAI et al.,

2017).

Considerando a disseminação de doenças como a filariose linfática e o vírus do Nilo Ocidental, bem como a resistência aos larvicidas existentes, há necessidade de desenvolver novos métodos de controle também para mosquitos *Culex*. A resistência a piretróides em *Culex pipiens* é frequentemente associada a mutações no gene do canal de sódio voltagem-dependente, particularmente a mutação L1014F, conhecida como kdr (knockdown resistance). Esta mutação é prevalente em várias populações de *Culex* ao redor do mundo e está associada a uma resistência significativa a piretróides (SCOTT; YOSHIMIZU; KASAI, 2015). A resistência a inseticidas em *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens* também é mediada pela superexpressão de genes da família P450, que estão envolvidos na detoxificação de inseticidas (YANG et al., 2021) destacando a necessidade de vigilância para projetar estratégias eficazes de controle. Estudos indicam que a tecnologia de larvicida de RNA interferente pode ser aplicada para controlar também esses mosquitos (MYSORE et al., 2019).

Esses achados são relevantes também no contexto do controle de mosquitos *Anopheles* para prevenção da malária. *Anopheles gambiae* na costa do Quênia apresentam resistência fenotípica a piretróides e organofosforados (MACHANI et al., 2020; MUNIWOKI et al., 2021) e a resistência aos inseticidas nessa espécie, não está associada a características ambientais, sugerindo que pode estar principalmente relacionada ao uso local de inseticidas (CORBEL et al., 2007). Os larvicidas de levedura podem representar uma nova ferramenta promissora para complementar os métodos tradicionais de controle desses mosquitos. A identificação de formulações ideais para cada espécie é essencial para garantir a eficácia desses larvicidas em diferentes ambientes.

Ademais, a estabilidade do produto foi estimada por RTqPCR em diferentes temperaturas de armazenamento por quatro semanas seguidas e após 3 meses, demonstrando que o produto pode ser considerado estável, visto que mesmo armazenado em temperatura ambiente por 3 meses a quantidade relativa de RNA não foi menor que 92% em relação à amostra recém sintetizada. Porém temperaturas mais baixas conservaram a quantidade de RNA mais próximas de 100% ao longo dos períodos analisados. Formulações de larvicidas de levedura de longa duração podem ser especialmente úteis para habitats propensos a transbordamento ou fluxo de águas pluviais. Além disso, uma maior estabilidade a diferentes temperaturas,

facilita o transporte desse produto para qualquer lugar onde ele seja necessário sem que haja risco de rápida deterioração.

Nesse estudo optamos por seguir protocolos já estabelecidos, porém apesar da significativa mortalidade obtida (57% em *Ae. aegypti* e 53% em *Ae. albopictus*), ela não se aproximou dos 92% (*Ae. aegypti*) e 93% (*Ae. albopictus*) obtidos por Mysore et al (2019), mesmo seguindo os mesmos protocolos e tendo como alvo a mesma sequência, no caso do gene SEMA1A. Já nos testes com 5-HTR1 a sequência alvo utilizada para nocautear o gene foi triada e desenhada em nosso laboratório, sendo escolhida com base no protocolo descrito em 3.2, porém a mortalidade obtida em *Ae. aegypti* (61%), apesar de significativa, também ficou abaixo dos 87% obtidos por Mysore (2023) ao silenciar o mesmo gene com outra sequência alvo.

Para que a supressão gênica por RNAi como estratégia de controle de vetores seja bem-sucedida, a resposta de RNAi precisa ser consistente e resistente a possíveis influências externas e internas, por conta disso a implementação generalizada de estratégias de gerenciamento de pragas baseadas em RNAi é atualmente dificultada por resultados altamente variáveis quando diferentes espécies de insetos, linhagens, estágios de desenvolvimento, tecidos e genes são alvos (COOPER et al., 2019). Fatores como a ação de RNases intestinais dos mosquitos, a internalização celular das moléculas de iRNA e uma possível deficiência da propagação sistêmica de iRNA podem interferir para essa variação.

Nos experimentos de RNAi, o dsRNA enfrenta inicialmente o ambiente do conteúdo intestinal, onde sua degradação e instabilidade foram documentadas em muitos insetos. A estabilidade do dsRNA varia entre ordens, sendo maior em ortópteros e coleópteros, mas menor em hemípteros, lepidópteros e dípteros (COOPER et al., 2019). Essas diferenças são atribuídas à atividade enzimática de ribonucleases de fita dupla (dsRNases) e ao pH fisiológico. O ssRNA é mais estável em pH 4,0–5,0, enquanto é suscetível à hidrólise em pH > 6,0 e <2,0, e à depurinação em <3,0 (COOPER et al., 2019). Entretanto, nenhuma evidência experimental está disponível até o momento para determinar o efeito do pH fisiológico na estabilidade do dsRNA e na atividade das nucleases (CHRISTIAENS et al., 2020). A rápida degradação de dsRNA, mediada por dsRNases, reduz a eficiência do RNAi. Insetos geralmente possuem de dois a quatro genes de dsRNases, com diferentes funções entre espécies. Supressão de dsRNases em alguns insetos, como *Leptinotarsa decemlineata* e

Locusta migratoria, melhora a eficiência do RNAi. Fatores como estágio de vida, exposição ao dsRNA e variações na estrutura de domínio das dsRNases influenciam sua expressão e atividade. Estratégias como direcionar tecidos com menor expressão de nucleases ou exposição contínua ao dsRNA podem melhorar sua estabilidade. Investigações adicionais sobre a atividade dessas enzimas são necessárias para entender melhor sua influência no RNAi.

A internalização de dsRNA nas células é um passo essencial para alcançar alta eficiência de RNAi. Quando o dsRNA é administrado por via oral, ele precisa atravessar a matriz peritrófica antes de ser internalizado pelas células epiteliais do intestino médio. Nos insetos, a captação celular ocorre principalmente por meio de endocitose mediada por receptores; no entanto, canais transmembranares podem desempenhar um papel em alguns coleópteros, himenópteros e hemípteros. Uma vez dentro das células, os dsRNAs devem alcançar o maquinário central da via de RNAi o qual forma agregados conhecidos como corpos GW, que estão presentes no citoplasma e associados a compartimentos de membrana. Caso a entrada ocorra por endocitose, o dsRNA precisa escapar do endossomo para chegar ao maquinário central no citoplasma e afetar o mRNA-alvo. A captação insuficiente de dsRNA limita a eficiência de RNAi em dípteros, bem como em certos tecidos de alguns ortópteros e himenópteros. Como alternativas que podem auxiliar a superar as dificuldades na captação de dsRNA podem ser a utilização de reagentes de transfecção lipofílicos e com carga positiva, além de nanopartículas que aumentam a penetração das membranas plasmáticas por ácidos nucleicos (COOPER et al., 2019)

O RNAi sistêmico, caracterizado pela propagação entre tecidos, da molécula interferente gerada pela Dicer é bem descrito em *C. elegans*, onde o dsRNA é importado por transportadores SID-2, e os siRNAs gerados são amplificados por RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e transportados célula a célula por canais SID-1, com apoio de vesículas e endocitose. Proteínas como Sid-3 e Sid-5 regulam a importação e exportação de dsRNA. Em insetos, embora mecanismos semelhantes tenham sido sugeridos, eles carecem de RdRPs e, em alguns casos, de homólogos de SID, o que pode limitar o transporte célula a célula do RNAi e reduzir sua eficiência (COOPER et al., 2019) (JOGA et al., 2016; CHRISTIAENS et al., 2020).

Uma abordagem para superar algumas das limitações enfrentadas no uso do dsRNA é a

utilização de nanocarreadores, que podem tanto aumentar sua estabilidade no organismo do inseto quanto melhorar sua taxa de absorção celular após a ingestão. Entre os exemplos desses sistemas estão lipossomos, polímeros e peptídeos. A encapsulação do dsRNA em nanopartículas, como as de quitosana, pode proteger o dsRNA de degradação por nucleases, aumentando sua estabilidade e eficácia no ambiente biológico (DHANDAPANI et al., 2019). Além disso, podem melhorar a entrega do dsRNA nas células-alvo, resultando em maior eficiência de knockdown dos genes (DHANDAPANI; GURUSAMY; PALLI et al., 2021).

Outra categoria promissora inclui os polímeros catiônicos, que podem ser projetados para proteger o dsRNA contra degradação por nucleases em diferentes condições de pH e, ao mesmo tempo, melhorar sua absorção celular (CHRISTIAENS et al., 2020). Um exemplo inicial foi o uso da quitosana, um polímero natural, para aumentar a eficácia do RNAi em mosquitos (ZHANG; LI; MIAO, 2013). Desde então, outros estudos confirmaram o potencial desses transportadores (LOPEZ et al., 2019; CHRISTIAENS et al., 2020). Embora o mecanismo subjacente seja desconhecido, o polímero pode contornar as vias endocíticas típicas conhecidas por estarem envolvidas na captação celular do dsRNA (GURUSAMY; MOGILICHERLA, PALLI et al., 2020).

6 Conclusão

O presente estudo contribui para o crescente corpo de evidências que sustentam o RNA interferente (RNAi) mediado por levedura como uma abordagem inovadora e promissora no controle de mosquitos vetores. Nossos resultados demonstraram que o silenciamento dos genes *Sema1A* e *5-HT1* por meio de bioinseticidas à base de *Saccharomyces cerevisiae* resultou em mortalidade significativa em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, muito provavelmente devido a disfunções neurológicas, conforme relatado em estudos prévios. A especificidade dos alvos genéticos utilizados, restritos aos mosquitos, reforça o potencial dessa estratégia como uma alternativa segura, eficaz e ambientalmente amigável, com risco mínimo para organismos não alvo. A utilização da levedura como veículo de entrega do RNAi apresenta múltiplas vantagens logísticas e econômicas, tais como a facilidade de cultivo em larga escala, segurança alimentar reconhecida e atratividade natural para larvas de mosquitos. Os resultados de estabilidade do produto, mesmo após armazenamento por semanas sob

diferentes condições de temperatura, são encorajadores e indicam viabilidade para transportes e aplicações em campo, especialmente em regiões endêmicas e de difícil acesso.

Apesar dos resultados positivos obtidos, observamos variações na mortalidade em comparação com estudos anteriores, o que evidencia a necessidade de maior compreensão sobre os fatores que influenciam a eficiência do RNAi em mosquitos. Barreiras fisiológicas, como a degradação do dsRNA por nucleases intestinais, limitação na absorção celular e a possível deficiência na propagação sistêmica do RNAi, podem comprometer a eficácia do silenciamento gênico. Tais limitações ressaltam a importância de explorar alternativas, como o uso de nanocarreadores e encapsulamento polimérico, para aumentar a estabilidade e a captação do dsRNA. Finalmente, a tecnologia de larvicidas de RNAi baseada em levedura possui potencial para ser expandida ao controle de outros gêneros de mosquitos vetores, como *Culex* e *Anopheles*. A formulação de produtos adaptados às características ecológicas de cada espécie e habitat será essencial para maximizar a eficácia dessa abordagem. Assim, os dados obtidos neste trabalho demonstram que os larvicidas de levedura representam uma ferramenta promissora no controle de vetores de doenças, sendo um potencial candidato, seguro e eficaz, para programas de manejo integrado de mosquitos.

REFERÊNCIAS:

ALGHSHAM, R., SHARIQ, A., & RASHEED, Z. Dengue: A global health concern. **International Journal of Health Sciences**, 17, 1 - 2, 2023.

ANJOLETTE, A. F. F., MACORIS, M. L. G. Techniques for the *Aedes aegypti* maintenance in the laboratory. **Superintendência de Controle de Endemias de Marília**. São Paulo, Brasil, 2016.

BAUM, J. A., et al. "Control of coleopteran insect pests through RNA interference." **Nature Biotechnology** 25(11): 1322-1326, 2007.

BENELLI, G., WILKE, A., & BEIER, J. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito). **Trends in parasitology**, 2020.

BONIZZONI, M., et al. "The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives." **Trends in Parasitology**, 29(9), 460-468, 2013.

BONMATIN, JM.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A. D.. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science And Pollution Research*, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 35-67. **Springer Science and Business Media LLC**, 7 ago. 2014.

BRUMMELKAMP, Thijn R.; BERNARDS, René; AGAMI, Reuven. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. **Science**, [S.L.], v. 296, n. 5567, p. 550-553, 19 abr. 2002.

CASTRO JUNIOR, Francisco P. de; MARTINS, Walter F. S.; LUCENA FILHO, Mauricio L. de; ALMEIDA, Raul P. de; BESERRA, Eduardo B.. Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. **Iheringia. Série Zoologia**, [S.L.], v. 103, n. 2, p. 118-123. FapUNIFESP (SciELO), 2013.

CAVALCANTI, Thaise Yasmine Vasconcelos de Lima; PEREIRA, Mylena Ribeiro; PAULA, Sergio Oliveira de; FRANCA, Rafael Freitas de Oliveira. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 969, 5 maio 2022.

Centers for Disease Control and Prevention. **Mosquito-borne diseases**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/about.html>. Acesso em: 20 jan. 2024.

CHEN, Zhi-Lu; YIN, Zuo-Jing; QIU, Tian-Yi; CHEN, Jian; LIU, Jian; ZHANG, Xiao-Yan; XU, Jian-Qing. Revealing the characteristics of ZIKV infection through tissue-specific transcriptome sequencing analysis. *Bmc Genomics*, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 697-720, 8 out. 2022. **Springer Science and Business Media LLC**, 2022.

CHRISTIAENS, O., WHYARD, S., VELEZ, A.M.; SMAGGHE, G. Double-stranded RNA technology to control insect pests: Current status and challenges. **Front. Plant Sci**, 11, 451, 2020.

CLARK, David P., PAZDERNIK, Nanette J., MCGEHEE, Michelle R.. Cloning Genes for Synthetic Biology. **Molecular Biology**, Elsevier. [S.L.], p. 199-239, 2019.

COOPER, Anastasia.; SILVER, Kristopher; ZHANG, Jianzhen; PARK, Yoonseong; ZHU, Kun Yan. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 18-28, 13 ago, Wiley, 2019.

CORBEL, V., N'GUESSAN, R., BRENGUES, C., CHANDRE, F., DJOGBÉNOU, L., MARTIN, T., MARTIN, T., AKOGBETO, M., HOUGARD, J., & ROWLAND, M.. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa.. **Acta tropica**, 101 3, 207-16, 2007.

CTNBio. Resolução Normativa nº 8, de 3 de junho de 2009. Estabelece normas de segurança para o trabalho com organismos geneticamente modificados. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2009.

DEHGHANI, R., & KASSIRI, H. A Review on Epidemiology of Dengue Viral Infection as an Emerging Disease. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, 14, 2296-2301, 2021.

DHANDAPANI, R., GURUSAMY, D., HOWELL, J., & PALLI, S. Development of CS-TPP-dsRNA nanoparticles to enhance RNAi efficiency in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 9, 2019.

DHANDAPANI, R., GURUSAMY, D., & PALLI, S.. Development of Catechin, Poly-l-lysine, and Double-Stranded RNA Nanoparticles.. **ACS applied bio materials**, 4 5, 4310-4318, 2021.

DIAS, Juarez P.; COSTA, Maria da Conceição N.; CAMPOS, Gubio Soares; PAIXÃO, Enny S.; NATIVIDADE, Marcio S.; BARRETO, Florisneide R.; ITAPARICA, Martha Suely C.; GOES, Cristina; OLIVEIRA, Francisca L.s.; SANTANA, Eloisa B.. Seroprevalence of Chikungunya Virus after Its Emergence in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 617-624, abr. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018.

DRINNENBERG, IA., WEINBERG, DE., XIE, KT., et al. RNAi in budding yeast. **Science**. 326(5952):544- 550, 2009.

DUMAN-SCHEEL, Molly. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. Current Drug Targets, [S.L.], **Bentham Science Publishers Ltd.**.v. 20, n. 9, p. 942-952, 11 jun. 2019.

DUVIGNAUD, A., STONEY, R., O, K., CHEN, L., CATTANEO, P., MOTTA, L., GOBBI, F., BOTTIEAU, E., BOURQUE, D., POPESCU, C., GLANS, H., ASGEIRSSON, H., OLIVEIRA-SOUTO, I., VAUGHAN, S., AMATYA, B., NORMAN, F., WAGGONER, J., DÍAZ-MENÉNDEZ, M., BEADSWORTH, M., ODOLINI, S., CAMPRUBÍ-FERRER, D., EPELBOIN, L., CONNOR, B., ÉPERON, G., SCHWARTZ, E., LIBMAN, M., MALVY, D., HAMER, D., & HUIITS, R. Epidemiology of Travel-Associated Dengue from 2007 to 2022: A GeoSentinel Analysis.. **Journal of travel medicine**, 2024.

EPA. Pesticides; 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides>. Accessed Abr 2024.

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, MK., KOSTAS, SA., DRIVER, SE., MELLO, CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 391 (6669):806–811, 1998.

GIRALDO, Maria I.; GONZALEZ-OROZCO, Maria; RAJSBAUM, Ricardo. Pathogenesis of Zika Virus Infection. Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 181-203, **Annual Reviews**, 24 jan. 2023.

GLORIA-SORIA, A., AYALA, D., BHEECARRY, A., CALDERÓN-ARGUEDAS, Ó., CHADEE, D., CHIAPPERO, M., COETZEE, M., ELAHEE, K., FERNÁNDEZ-SALAS, I., KAMAL, H., KAMGANG, B., KHATER, E., KRAMER, L., KRAMER, V., LÓPEZ-SOLIS, A., LUTOMIAH, J., MARTINS, A., MICIELI, M., PAUPY, C., PONLAWAT, A., RAHOLA, N., RASHEED, S., RICHARDSON, J., SALEH, A., SÁNCHEZ-CASAS, R., SEIXAS, G., SOUSA, C., TABACHNICK, W., TROYO, A., & POWELL, J. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. **Molecular Ecology**, 25, 2016.

GRATZ, N. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, 18, 2004.

GURUSAMY, D., MOGILICHERLA, K., PALLI, SR. Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Arch Insect Biochem Physiol.**;104(4):e21677, 2020.

HAHN, M., EISEN, R., EISEN, L., BOEGLER, K., MOORE, C., MCALLISTER, J., SAVAGE, H., & MUTEBI, J. Reported Distribution of *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the United States, 1995-2016 (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, 2016.

HAHN, M., EISEN, L., MCALLISTER, J., SAVAGE, H., MUTEBI, J., & EISEN, R. Updated Reported Distribution of *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United States, 1995–2016. **Journal of Medical Entomology**, 54, 1420 - 1424, 2017.

HAPAIRAI, L.K., MYSORE, K., CHEN, Y. et al. Lure-and-Kill Yeast Interfering RNA Larvicides Targeting Neural Genes in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti* . *Sci Rep* 7, 13223, 2017.

HE, De-Chun; LI, Fang-Hong; WU, Mian; LUO, Hui-Li; QIU, Li-Qing; MA, Xiao-Rui; LU, Jia-Wei; LIU, Wang-Rong; YING, Guang-Guo. Emission of volatile organic compounds (VOCs) from application of commercial pesticides in China. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 314, p. 115069, Elsevier BV, jul. 2022.

ILIC, I., & ILIC, M. Global Patterns of Trends in Incidence and Mortality of Dengue, 1990–2019: An Analysis Based on the Global Burden of Disease Study. **Medicina**, 60, 2024.

GAYTHORPE, K., HAMLET, A., JEAN, K., RAMOS, D., CIBRELUS, L., GARSKE, T., & FERGUSON, N.. The global burden of yellow fever. **eLife**, 10, 2020.

GIORDANO, B., GASPAROTTO, A., LIANG, P., NELDER, M., RUSSELL, C., & HUNTER, F. Discovery of an *Aedes (Stegomyia) albopictus* population and first records of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Canada. **Medical and Veterinary Entomology**, 34, 2020.

GUEDES, R., BEINS, K., COSTA, D., COELHO, G., & BEZERRA, H. Patterns of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*: Meta-Analyses of Surveys in Latin America and the Caribbean.. **Pest management science**, 2020.

HAUGEN, M., FLANNERY, E., TOMCHANEY, M., MORI, A., BEHURA, S., SEVERSON, D., & DUMAN SCHEEL, M. Semaphorin-1a Is Required for *Aedes aegypti* Embryonic Nerve Cord Development. **PLoS ONE**, 6, 2011.

JOGA, M. R., ZOTTI, M. J., SMAGGHE, G., AND CHRISTIAENS, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far.

Front. Physiol. 7:553, 2016.

KANDEL, Y., VULCAN, J., RODRIGUEZ, S., MOORE, E., CHUNG, H., MITRA, S., CORDOVA, J., MARTINEZ, K., MOON, A., KULKARNI, A., ETTESTAD, P., MELMAN, S., XU, J., BUENEMANN, M., HANLEY, K., & HANSEN, I. Widespread insecticide resistance in *Aedes aegypti* L. from New Mexico, U.S.A.. **PLoS ONE**, 14, 2019.

LAU, KW., CHEN, CD., LEE, HL., NORMA-RASHID, Y., SOFIAN-AZIRUN, M. Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. **J Med Entomol.** 52:199–206, 2015.

LOPEZ SBG, GUIMARÃES-RIBEIRO V, RODRIGUEZ JVG, DORAND FAPS, SALLES TS, SÁ-GUIMARÃES TE, ALVARENGA ESL, MELO ACA, ALMEIDA RV, MOREIRA MF. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. **Sci Rep.** 11;9(1):4038, Mar. 2019.

MAIN, A., WEBB, E., GOYNE, K., & MENGEL, D. Neonicotinoid insecticides negatively affect performance measures of non-target terrestrial arthropods: a meta-analysis.. **Ecological applications : a publication of the Ecological Society of America**, 28 5, 1232-1244, 2018.

MACHANI, MG., OCHOMO, E., ZHONG, D., ZHOU, G., WANG, X., GITHEKO, AK., YAN, G., AFRANE, YA. Phenotypic, genotypic and biochemical changes during pyrethroid resistance selection in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Sci Rep.** 4;10(1):19063, 2020.

MAESTRE-SERRANO, Ronald; GOMEZ-CAMARGO, Doris; PONCE-GARCIA, Gustavo; FLORES, Adriana E. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 116, p. 63-73, nov. 2014.

MCKENZIE, B., WILSON, A., & ZOHDY, S. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. **PLoS ONE**, 14, 2019.

MALHOTRA, N., CHEN, K., HUANG, J., LAI, H., UAPIPATANAKUL, B., ROLDAN, M., MACABEO, A., GER, T., & HSIAO, C. Physiological Effects of Neonicotinoid Insecticides on Non-Target Aquatic Animals—An Updated Review. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, 2021.

MAZZARRI, MB., GEORGHIOU, GP. Characterization of resistance to organophosphate,

carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* 11:315–22, 1995.

MEADE, Bryan R.; DOWDY, Steven F. Enhancing the cellular uptake of siRNA duplexes following noncovalent packaging with protein transduction domain peptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 60, n. 4-5, p. 530-536, Elsevier BV, mar. 2008.

MICURA, R. Small interfering RNAs and their chemical synthesis. **Angew Chem Int Ed Engl** 41:2265–2269, 2002.

Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (Dengue, Chikungunya e Zika). 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim-epidemiologico-vol-52-no-48.pdf/view>. Acesso em: 15 jul. 2023.

Ministério da Saúde. Painel de Monitoramento das Arboviroses, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em: 21 fev. 2025.

Ministério da Saúde. Febre Amarela. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-amarela>. Acesso em 22. fev. 2025.

MONAGHAN, AJ., EISEN, RJ., EISEN, L., et al. Consensus and uncertainty in the geographic range of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the contiguous United States: Multi-model assessment and synthesis. **PLoS Comput Biol.** 15(10):e1007369. Oct. 2019.

MONATH, T. Yellow fever: an update.. **The Lancet. Infectious diseases**, 1 1, 11-20, 2001.

MOYES, C., VONTAS, J., MARTINS, A., NG, L., KOOU, S., DUSFOUR, I., RAGHAVENDRA, K., PINTO, J., CORBEL, V., DAVID, J., & WEETMAN, D. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 11, 2017.

MUMBERG, D., MULLER, R., FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene** 156(1):119–122, 1995.

MUNYWOKI, D., KOKWARO, E., MWANGANGI, J., MUTURI, E., & MBOGO, C.,

Insecticide resistance status in *Anopheles gambiae* (s.l.) in coastal Kenya. **Parasites & Vectors**, 14, 2021.

MYSORE, Keshava *et al.* A Broad-Based Mosquito Yeast Interfering RNA Pesticide Targeting Rbfox1 Represses Notch Signaling and Kills Both Larvae and Adult Mosquitoes. **Pathogens**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1251, 28 set. 2021.

MYSORE, K., HAPAIRAI, LK., SUN, L., HARPER, EI., CHEN, Y., EGGLESON, KK., et al. Yeast interfering RNA larvicides targeting neural genes induce high rates of *Anopheles* larval mortality. **Malar J.** 16:461, 2017.

MYSORE, K., Li, P., Wang, CW. et al. Characterization of a broad-based mosquito yeast interfering RNA larvicide with a conserved target site in mosquito semaphorin 1a genes. **Parasites Vectors** 12, 256, 2019.

MYSORE, K., NJOROGI, T.M., STEWART, A.T.M. et al. Characterization of a novel RNAi yeast insecticide that silences mosquito 5-HT1 receptor genes. *Sci Rep* 13, 22511, 2023.

PALOMINO, M., PINTO, J., YAÑEZ, P. et al. First national-scale evaluation of temephos resistance in *Aedes aegypti* in Peru. **Parasites Vectors** 15, 254, 2022.

Pan American Health Organization. **Dengue in Brazil**. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/dengue>. Acesso em: 24 fev. 2023.

PARRY, R., & ASGARI, S. *Aedes Anphevirus*: an Insect-Specific Virus Distributed Worldwide in *Aedes aegypti* Mosquitoes That Has Complex Interplays with Wolbachia and Dengue Virus Infection in Cells. **Journal of Virology**, 92, 2018.

PRINCE, Brian C.; WALSH, Elizabeth; TORRES, Tran Zen B.; RÜCKERT, Claudia. Recognition of Arboviruses by the Mosquito Immune System. **Biomolecules**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1159, 21 jul. MDPI AG, 2023.

PAUPY, C., DELATTE, H., BAGNY, L., CORBEL, V., & FONTENILLE, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light.. **Microbes and infection**, 11 14-15, 1177-85, 2009.

PICHLER, V., BELLINI, R., VERONESI, R., ARNOLDI, D., RIZZOLI, A., LIA, R., OTRANTO, D., MONTARSI, F., CARLIN, S., BALLARDINI, M., ANTOGNINI, E., SALVEMINI, M., BRIANTI, E., GAGLIO, G., MANICA, M., COBRE, P., SERINI, P., VELO, E., VONTAS, J., KIOULOS, I., PINTO, J., DELLA TORRE, A., & CAPUTO, B. First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian *Aedes albopictus* populations 26 years after invasion.. **Pest management science**, 74 6, 1319-1327, 2018.

POLONIO, Carolina Manganeli; PERON, Jean Pierre Schatzmann. ZIKV Infection and miRNA Network in Pathogenesis and Immune Response. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1992, MDPI AG, 4 out. 2021.

POLSON, KA., RAWLINS, SC., BROGDON, WG., CHADEE, DD. Organophosphate resistance in Trinidad and Tobago strains of *Aedes aegypti*. **J Am Mosq Control Assoc.** 26:403–10, 2010.

POWELL, J., GLORIA-SORIA, A., & KOTSAKIOZI, P. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. **Bioscience**, 68, 854 - 860, 2018.

POWELL, JR., TABACHNICK, WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;108 Suppl 1(Suppl 1):11-7, 2013.

PRATES, Lucas Henrique Figueiredo; FIEBIG, Jakob; SCHLOSSER, Henrik; LIAPI, Eleni; REHLING, Tanja; LUTRAT, Célia; BOUYER, Jeremy; SUN, Qiang; WEN, Han; XI, Zhiyong. Challenges of Robust RNAi-Mediated Gene Silencing in *Aedes* Mosquitoes. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 5218. MDPI AG. 10. mai. 2024.

RAHMAN, R., SOUZA, B., UDDIN, I., CARRARA, L., BRITO, L., COSTA, M., MAHMOOD, M., KHAN, S., LIMA, J., & MARTINS, A. Insecticide resistance and underlying targets-site and metabolic mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. **Scientific Reports**, 11, 2021

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K., STRODE, C., FLORES, AE., GARCIA-LUNA, S., REYES-SOLIS, G., RANSON, H., et al. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. **Insect Mol Biol.** 23:199–215, 2014.

SCHULZ, Ralf; BUB, Sascha; PETSCHICK, Lara L.; STEHLE, Sebastian; WOLFRAM, Jakob. Applied pesticide toxicity shifts toward plants and invertebrates, even in GM crops. *Science*, [S.L.], v. 372, n. 6537, p. 81-84. American Association for the Advancement of Science (AAAS), 2 abr. 2021.

SCOTT, Jeffrey G.; YOSHIMIZU, Melissa Hardstone; KASAI, Shinji. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 120, p.

68-76, Elsevier BV, 2015.

Secretaria de Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças. 2025. Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/coordenadoria-de-controle-de-doencas/noticias/19022025-governo-de-sp-decreta-emergencia-para-dengue-e-anuncia-investimentos-para-assistencia-aos-pacientes>. Acesso em: 22. fev. 2025.

SEVERSON DW, KNUDSON DL, SOARES MB, LOFTUS BJ. *Aedes aegypti* genomics. **Insect Biochem Mol Biol.**; 34(7):715-21, 2004.

SIMON LV, HASHMI MF, TORP KD. Yellow Fever. 2023 Aug 7. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.

SMITH, L., KASAI, S., & SCOTT, J. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases.. **Pesticide biochemistry and physiology**, 133, 1-12, 2016.

SOGHIGIAN, J., GLORIA-SORIA, A., ROBERT, V., GOFF, L., FAILLOUX, A., & POWELL, J. Genetic evidence for the origin of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, in the southwestern Indian Ocean. **Molecular Ecology**, 29, 3593 - 3606, 2020.

SONTHEIMER, Erik J.. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 127-138, 14 jan. **Springer Science and Business Media**, 2005.

SOUZA-NETO, J., POWELL, J., & BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases** 67, 191 - 209, 2018.

SOUZA, U., SANTOS, R., GIOVANETTI, M., ALCÂNTARA, L., GALVÃO, J., CARDOSO, F., BRITO, F., FRANCO, A., ROEHE, P., RIBEIRO, B., SPILKI, F., & CAMPOS, F. Genomic Epidemiology Reveals the Circulation of the Chikungunya Virus East/Central/South African Lineage in Tocantins State, North Brazil. **Viruses**, 14, 2022.

SOUZA, William M. de; RIBEIRO, Guilherme S.; LIMA, Shirlene T.s. de; JESUS, Ronaldo de; MOREIRA, Filipe R.R.; WHITTAKER, Charles; SALLUM, Maria Anice M.; CARRINGTON, Christine V.F.; SABINO, Ester C.; KITRON, Uriel. Chikungunya: a decade of burden in the americas. **The Lancet Regional Health - Americas**, [S.L.], Elsevier BV, v. 30, p. 100673, fev. 2024.

STEHLE, Sebastian; SCHULZ, Ralf. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 112, n. 18, p. 5750-5755, **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, 13 abr. 2015.

TEDJOU, A., KAMGANG, B., YOUNG, A., NJIOKOU, F., & WONDJI, C. Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 13, 2019.

TRIANA, Merybeth F; MELO, Nadia. Dynamics of *Aedes aegypti* mating behaviour. **Current Opinion In Insect Science**, [S.L.], v. 65, p. 101237. Elsevier BV. out. 2024.

THOMPSON, R., Del Campo, J., & Constenla, D. A review of the economic evidence of *Aedes*-borne arboviruses and *Aedes*-borne arboviral disease prevention and control strategies. **Expert Review of Vaccines**, 19, 143 - 162, 2020.

TOSI, S., BURGIO, G. & NIEH, J.C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Sci Rep** 7, 1201, 2017.

TSVETKOV, N.; SAMSON-ROBERT, O.; SOOD, K.; PATEL, H. S.; MALENA, D. A.; GAJIWALA, P. H.; MACIUKIEWICZ, P.; FOURNIER, V.; ZAYED, A.. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, [S.L.], v. 356, n. 6345, p. 1395-1397. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**, 30 jun. 2017.

VONTAS, J., KATSAVOU, E., & MAVRIDIS, K. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. **Pesticide biochemistry and physiology**, 170, 104666, 2020.

WEBB, J. L. A. *Aedes aegypti* suppression in the Americas: historical perspectives. **The Lancet**, 388(10044), 556–557, 2016.

WHYARD, Steve; ERDELYAN, Cassidy; PARTRIDGE, Alison L; SINGH, Aditi D; BEEBE, Nigel W; CAPINA, Rupert. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 96, 2015.

WIPF, N., Duchemin, W., Kouadio, F., Fodjo, B., Sadia, C., Mouhamadou, C., Vavassori, L., Mäser, P., Mavridis, K., Vontas, J., & Müller, P. Multi-insecticide resistant malaria vectors in the field remain susceptible to malathion, despite the presence of Ace1 point mutations. **PLoS Genetics**, 18, 2022.

WOOD, Thomas James; GOULSON, Dave. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 21, p. 17285-17325, 7 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC, 2017.

World Health Organization. **Dengue and severe dengue in Brazil**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 24 fev. 2023.

World Health Organization. (2005). **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>. Acesso em: 15 mai. 2023.

World Health Organization. **Ten Threats to Global Health in 2019**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em 20 fev. 2025.

World Health Organization. **Vector control**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007987>. Acesso em: 24 fev. 2023.

YANG, T., Li, T., Feng, X., Li, M., Liu, S., & Liu, N. Multiple cytochrome P450 genes: conferring high levels of permethrin resistance in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*, 11, 2021.

YU, Jenn-Yah; DERUITER, Stacy L.; TURNER, David L.. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 99, n. 9, p. 6047-6052, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 23 abr. 2002.

ZEINALI, Mazyar; MCCONNELL, Laura L.; HAPEMAN, Cathleen J.; NGUYEN, Anh; SCHMIDT, Walter F.; HOWARD, Cody J.. Volatile organic compounds in pesticide formulations: methods to estimate ozone formation potential. **Atmospheric Environment**, [S.L.], v. 45, n. 14, p. 2404-2412,. Elsevier BV, mai. 2011.

ZHANG H, Li HC, Miao XX. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. **Insect Sci** 20(1):15–30, 2013.

ZULFA, R., Lo, W., Cheng, P., Martini, M., & Chuang, T. Updating the Insecticide Resistance Status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 7, 2022.