



Mosquitos TRANSGÊNICOS

Controle da transmissão de malária e dengue

Margareth de L. Capurro

Ph.D. Ciências – Professor Doutor – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo – mcapurro@icb.usp.br

Paulo E. M. Ribolla

Ph.D. Ciências – Professor Doutor – Depto Parasitologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu – pribolla@ibb.unesp.br

Antônio G. de Bianchi

Livre Docente – Professor Convidado – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo – agdbianc@icb.usp.br

Mauro T. Marrelli

Ph.D. Ciências – Pós-Doutorando – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo

Abrahim de S. Caroci

Mestrando, Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo

Marcela Magalhães

Mestrando, Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo

Fabiana M. Feitosa

Mestrando, Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo

Juliano P. Chinoca

Iniciação Científica – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo

Bianca Burini

Iniciação Científica – Depto Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo

A palavra mosquito tem sido utilizada popularmente para indicar diferentes insetos de tamanho reduzido que causam incômodo aos seres humanos. Entre esses insetos, os pertencentes à família Culicidae são importantes transmissores de uma série de patógenos. O ciclo biológico desses mosquitos compreende as seguintes fases: ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (figura 1). Durante esse ciclo, os mosquitos adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e muitos são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas.

No final do século XIX, surgiram os primeiros relatos vinculando os mosquitos com a transmissão de enfermidades ao homem. A primeira evidência foi obtida por Manson, em

1877, que confirmou o desenvolvimento de filárias (*Wuchereria bancrofti*) causadoras de elefantíase, no mosquito *Culex fatigans*. Ross, trabalhando na Índia, em 1897, demonstrou o desenvolvimento de *Plasmodium* em mosquitos. A comprovação definitiva da transmissão da malária humana por *Anopheles claviger* foi apresentada logo a seguir por Grassi, em 1898. A transmissão do vírus da febre amarela pela picada de mosquitos *Aedes aegypti* foi demonstrada em Cuba, no ano de 1900, pela equipe liderada por Reed (Christophers, 1960; Foster, 1965; Clements, 1992; Mitchell, 1996) (figura 2).

Hoje, um século após essas descobertas, sabemos que os mosquitos são vetores das quatro espécies de *Plasmodium* que causam malária huma-

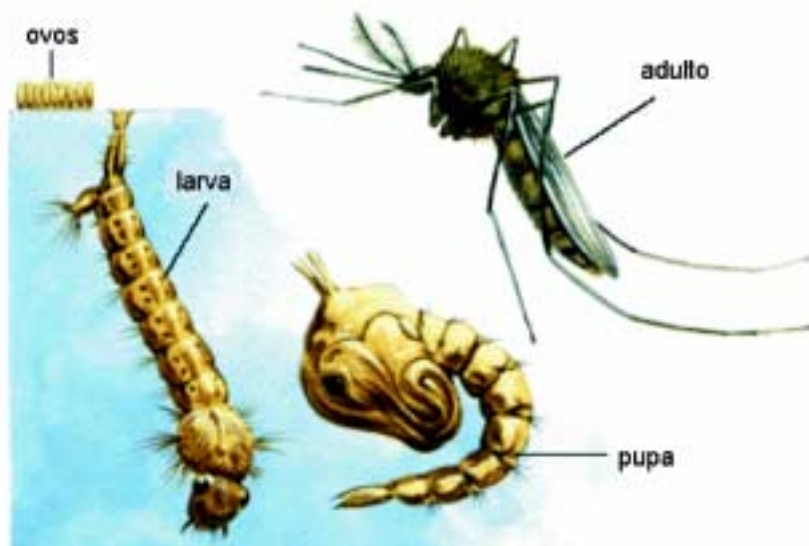


Figura 1. Formas de vida dos mosquitos.

Fotos/Ilustrações cedidas pelos autores

Subordem Nematocera
 Família Culicidae

Gênero *Anopheles*
Anopheles darlingi - vetor da malária
 (Foto cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Campos Pereira - ICB-USP)



Gênero *Aedes*
Aedes aegypti - vetor da dengue e da febre amarela

Figura 2. Principais transmissores brasileiros

na, além de transmitirem filárias (*Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*) e muitos arbovírus, contribuindo, assim, de maneira expressiva, para os atuais índices de mortalidade e morbidade humana no mundo. Todos os anos são relatados aproximadamente 250 milhões de novos casos de malária, filaríose e arboviroses relacionados diretamente, com a presença desses insetos (OMS, 2000).

Levantamentos recentes indicam que a malária é responsável por aproximadamente 2,1 milhões de mortes por ano no mundo, correspondendo a 4% da mortalidade mundial total (Guerrant & Blackwood, 1999). No Brasil, são relatados aproximadamente 500 mil novos casos clínicos de malária a cada ano. O número de casos de dengue e dengue hemorrágica tem apresentado um crescimento nos últimos anos. Menos de 30 mil casos foram reportados no mundo entre 1956 e 1980, porém esse número aumentou para 137 mil entre 1981 e 1985 e mais de 267 mil casos entre 1986 e 1990 (Guerrant & Blackwood, 1999). Somente no Brasil, foram notificados 314.225 e 227.363 casos de dengue, em 1998 e 2000, respectivamente. No Estado de São Paulo, foram notificados 3.530 casos de dengue em 2000, e, até 21 de junho de 2001 os casos reportados já atingiram mais de 33.000 (Divisão de Zoonoses/CVE – SUCEN).

Nas áreas endêmicas, programas de prevenção, combate e controle dessas enfermidades estão comprometidos devido ao desenvolvimento

de resistência múltipla às drogas pelas formas parasitas, de resistência a inseticidas dos insetos vetores, como também a interrupção dos programas de controle do vetor devido aos custos crescentes (Carlson *et al.*, 1995). Frente a esse quadro, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias e o aprimoramento dos programas atuais destinados ao controle da transmissão dessas enfermidades.

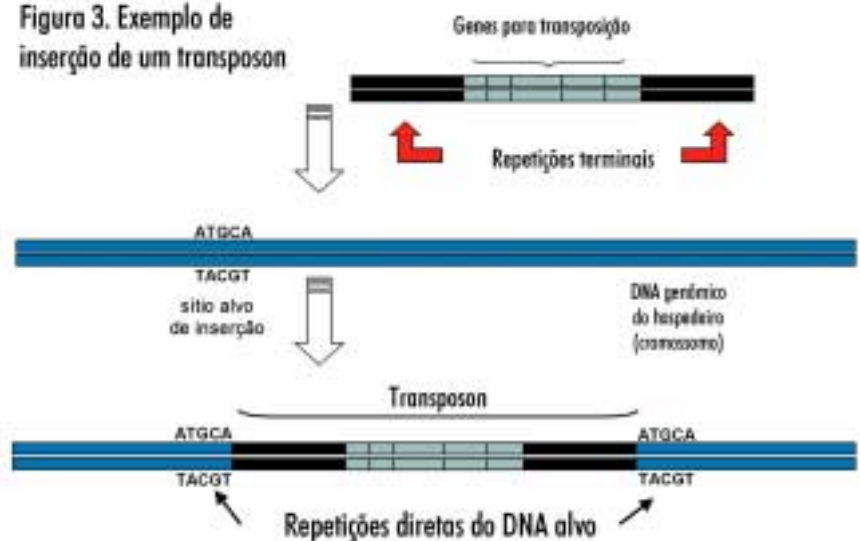
Uma hipótese que tem sido utilizada é a de que mosquitos geneticamente manipulados ou transgênicos poderiam ser utilizados no bloqueio ou na redução da transmissão de doenças. O objetivo dessa estratégia é aumentar a frequência, em uma população de mosquitos, de um gene que

interfira no desenvolvimento ou na propagação de patógenos, resultando na redução ou na eliminação de sua transmissão ao homem. Ferramentas de biologia molecular estão sendo utilizadas na síntese de genes que, quando incorporados ao genoma do mosquito resultariam em mosquitos refratários e/ou não transmissores dos patógenos. Esses genes serão acoplados a transposons, de forma tal que a introdução dos mosquitos geneticamente modificados resultará na propagação e fixação do transgene na população do vetor alvo. Como resultado da execução dessa estratégia, espera-se diminuição na transmissão e, conseqüentemente, no número de casos da doença.

Para testar essa hipótese, no entanto, algumas técnicas precisam ser desenvolvidas em laboratório para serem aplicadas na produção dos mosquitos transgênicos. Também precisamos de informações sobre como novos transgenes, introduzidos no genoma dos mosquitos, irão se fixar na população alvo. Essas informações são de vital importância, pois fornecem a base científica para uma estratégia racional de modulação genética da competência dos vetores (Collins e James, 1996).

Um mosquito modificado geneticamente resistente a um patógeno deve, necessariamente, ter em seu genoma uma informação nova que bloqueie a sua infecção pelo pató-

Figura 3. Exemplo de inserção de um transposon



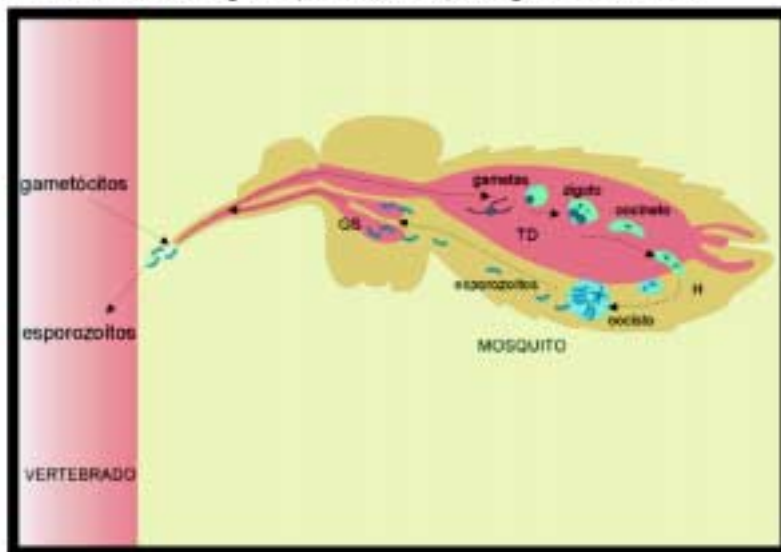
geno. A maneira mais eficiente de introduzir desse transgene no mosquito é através de elementos de transposição, os transposons (figura 3). Transposon é o conjunto de segmentos lineares de DNA capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente de homologia entre a região genômica onde se encontram inseridos e o local para o qual se movem. Os transposons possuem seqüências nucleotídicas muito similares em ambas as extremidades (repetições terminais), carregam gene(s) que codifica(m) a enzima capaz de transportá-los (transposases) e criam, ao se inserir no DNA, pequenas duplicações no sítio alvo da inserção (repetições diretas do DNA alvo), podendo existir em cópias múltiplas no genoma.

Construção dos transgenes - malária

Um dos modelos que está sendo utilizado para testes da construção do transgene é o da malária aviária, utilizando o mosquito vetor *Aedes aegypti*, o hospedeiro vertebrado *Gallus gallus* (galinhas e pintainhos) e o parasita *Plasmodium gallinaceum*. Esses resultados servirão de base antes do desafio maior, que é o sistema da malária humana, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* e o seu inseto vetor *Anopheles sp.*

O ciclo de vida dos plasmódios compreende fases sexuais e assexuais. Durante a tomada de sangue de um hospedeiro infectado, o mosquito ingere parasitas na forma de gametócitos, que permanecem no seu trato digestivo por algumas horas, onde ocorre a fertilização. Após a fertilização, os parasitas sofrem modificações estruturais, resultando numa forma móvel, o oocineto, que penetra pelo epitélio do trato digestivo, alojando-se entre as células epiteliais e a lâmina basal. O oocineto desenvolve-se atingindo a forma de oocisto, que entra em processo de esporogonia, liberando na hemocele dos insetos milhares de esporozoítos. As formas livres esporozoítas invadem as glândulas salivares, permanecendo nesse órgão até o mosquito tomar outra alimentação sanguínea, infectando assim um novo hospedeiro vertebrado (figura 4).

Figura 4. Ciclo de vida dos plasmódios nos mosquitos. TD - lúmen do trato digestivo; H - hemocele; GS - glândulas salivares



Onde bloquear os parasitas

Durante a passagem dos plasmódios pelo interior dos mosquitos, vários pontos são alvos potenciais para o bloqueio do ciclo de vida do parasita e a concomitante interrupção da transmissão. Ao ser ingerido pelos mosquitos, os gametócitos se desenvolvem em gametas. Os sinais que desencadeiam esse processo estão intimamente ligados ao mosquito. Diminuição da temperatura do sangue ingerido pelos mosquitos e alteração no pH estão envolvidos nesse processo. Além disso, uma substância presente nos mosquitos, chamada de GAF (fator ativador de gameta), também faz parte do processo de ativação dos gametócitos masculinos.

Após a formação do oocineto, este precisa atravessar o epitélio digestivo para formar o oocisto. A primeira barreira encontrada pelo oocineto é a matriz peritrófica. Nos mosquitos, essa matriz, constituída principalmente de quitina e proteínas, parece ter o papel protetor do muco presente em nosso intestino. Para atravessar essa barreira, o oocineto sintetiza uma enzima capaz de hidrolisar a quitina, uma quitinase. Essa enzima é sintetizada sob a forma de um zimógeno, ou seja, uma pró-enzima sem atividade. Para que o zimógeno se ative, é necessário que ele seja clivado pelas tripsinas presentes no trato digestivo dos mosquitos. As tripsinas são secretadas pelo

mosquito e estão envolvidas na digestão das proteínas do sangue.

Na hemolinfa, os oocistos se rompem e os esporozoítos migram em direção às glândulas salivares. Os esporozoítos são cobertos por uma proteína imunodominante, a proteína circumsporozoíta (CSP) (Krettli *et al.*, 1988). Vários autores têm demonstrado, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, que alguns anticorpos monoclonais obtidos contra a proteína CSP promovem o bloqueio da transmissão da infecção (Warburg *et al.*, 1992; Ramirez *et al.*, 1995). Em *Plasmodium gallinaceum* foi demonstrado que o soro N2H6D5 é eficiente no bloqueio da penetração das glândulas salivares pelos esporozoítos (Warburg *et al.*, 1992).

Obtenção dos promotores específicos

Um passo primordial na transgênese é a utilização de um promotor que dirija a expressão do gene de interesse no local e no tempo necessários para o bloqueio do ciclo de vida do parasita. Não adiantaria expressar uma proteína letal ao parasita em um órgão que ele não se encontra. Como visto acima, trato digestivo, hemolinfa e glândulas salivares são sítios interessantes para a expressão de proteínas anti-parasitas. A caracterização de promotores específicos para esses dife-

rentes locais vem sendo realizada por diferentes vias. No trato digestivo, os promotores das enzimas digestivas parecem ser ótimos candidatos para esse fim. Uma vez que a expressão de algumas dessas enzimas está relacionada com a tomada de sangue pelas fêmeas dos mosquitos, esses promotores seriam ótimos candidatos para a expressão de genes que matem o parasita no lúmen do trato digestivo. A cinética de expressão das enzimas presentes após a tomada de uma refeição de sangue pelas fêmeas foi verificada para os anofelinos neo-tropicais transmissores (*An.darlingi*, *An.aquasalis* e *An.albitarsis*) e foi possível observar que a tripsina é a enzima majoritária após a tomada de sangue, sendo que a atividade dessa enzima começa a aumentar logo após o repasto (Caroci *et al.*, 1999).

Na hemolinfa dos mosquitos, a lipoforina é a proteína majoritária responsável pelo transporte de lipídeos nos insetos (Capurro *et al.*, 1994; van Heusden, 1997). Encontramos também vitelogenina e hexamerinas, as quais são proteínas sintetizadas pelos corpos gordurosos dos mosquitos e secretadas para a hemolinfa. As seqüências promotoras correspondentes a essas proteínas estão sendo avaliadas em estudos utilizando-se mosquitos transgênicos quanto à sua capacidade de produção de genes anti-parasitas sem interferência no próprio metabolismo dos mosquitos. Os corpos gordurosos estão sendo alvo de muitos estudos na caracterização dos promotores que possam regular a produção de proteínas anti-parasitas que tenham como alvo os esporozoítos da hemolinfa dos mosquitos.

Obtenção de genes anti-parasita (transgenes)

Os cDNAs que codificam o fragmento Fv da IgG-N2H6D5 foram clonados (figura 5). Tipicamente o cDNA é obtido por amplificação gênica da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (V_H), o qual é acoplado à região variável da cadeia leve (V_L) por uma seqüência de nucleotídeos que codifica um peptídeo (Gly₃Ser)₄ o qual permite a junção das duas cadeias, formando um fragmento scFv (single chain Fragment variable antibody)

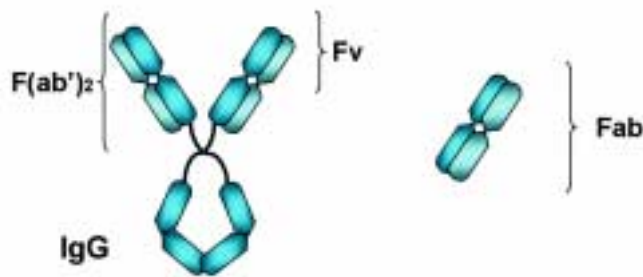


Figura 5. Estratégia de Clonagem do Fragmento variável do Fab Parte A. Esquema da molécula de IgG, e os fragmentos F(ab')₂, Fab e Fv

(Whitlow & Filpula, 1991). O resultado é um gene relativamente pequeno (750 - 800 nucleotídeos), que traduz uma proteína de, aproximadamente, 30 kDa. Se diminuirmos o peptídeo (Gly₃Ser)₄ para (Gly₃Ser)₁, o resultado é um Fv de cadeia dupla (Fv₂) (figura 5.C). O cDNA que corresponde à porção Fv da imunoglobulina N2H6D5 foi produzido na forma de scFv com sucesso (N2scFv) e é capaz de reconhecer a CSP de *P.gallinaceum* (Capurro *et al.*, 2000).

Para testarmos a capacidade bloqueadora da penetração dos esporozoítos nas glândulas salivares do mosquito, foi utilizado o sistema transiente de expressão de vírus Sindbis (Jiang *et al.*, 1995). Foi construído um gene que tem a porção promotora do vírus Sindbis (Higgs *et al.*, 1997), um peptídeo sinal, que é o descrito para a

proteína *Maltase-like I (Mal I)* de glândula salivar de *Aedes aegypti* (James *et al.*, 1989) e o cDNA N2scFv, resultando em vírus Sindbis recombinante, o qual expressa o transgene *MalI-N2scFv* (figura 6). O peptídeo sinal *MalI* é reconhecido pelas células de insetos o qual faz com que o anticorpo recombinante N2scFv seja secretado para a hemolinfa dos mosquitos. Mosquitos foram infectados pelo vírus recombinante *MalI-N2scFv*, por inoculação intratorácica e, após 48 horas, os mosquitos sobreviventes foram expostos à pintainhos infectados por *P.gallinaceum*. Após 14 dias, as glândulas salivares das fêmeas alimentadas com sangue infectado, foram recuperadas e o número de esporozoítos nas glândulas salivares determinados por contagem dos parasitas, em microscopia de fase. Os resultados mostraram

Figura 5. Estratégia de Clonagem do Fragmento variável do Fab Parte B. Esquema dos RT-PCRs e clonagem em plasmídeos

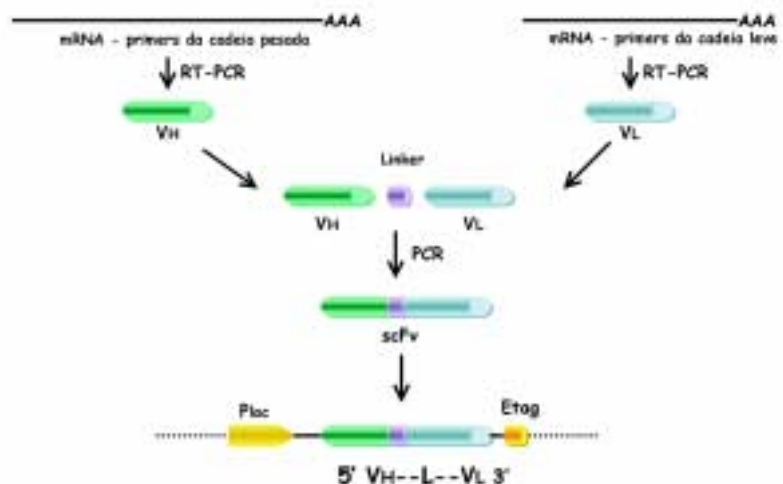
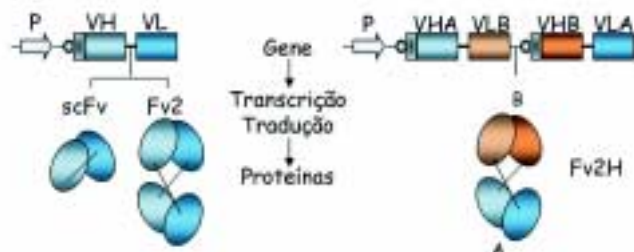


Figura 5. Estratégia de Clonagem do Fragmento variável do Fab
Parte C. Esquema das construções de anticorpos recombinantes, de cadeia simples (scFv), bivalentes mono-específicos (Fv2) e bivalente bi-específicos (Fv2H).



que os mosquitos que expressam o gene *Mali*-N2scFv reduzem em 99,8% o número de parasitas na glândula salivar quando comparado com os controles (Capurro *et al.*, 2000).

As linhagens transgênicas

O cDNA, *Mali*-N2scFv foi inserido em dois plasmídeos, os quais diferem somente no promotor. O primeiro contém o promotor da vitelogenina (**Vt**) (ativado por repasto sanguíneo) de *Ae. aegypti*, e o segundo contém o promotor de ubiquitina (**Ub**) (promotor constitutivo) de *Drosophila melanogaster*. O elemento de transposição utilizado foi o *mariner* de *D. melanogaster*, e o gene repórter foi o promotor de Actina 5 (**Act5C**) de *D. melanogaster* acoplado à proteína fluorescente EGFP (figura 7). Os primeiros resultados dessas linhagens transgênicas mostraram que os mosquitos que expressaram o gene N2-scFv não transmitem malária aos pintainhos com 10 dias de vida, sendo, portanto, linhagens refratárias (Anthony James, comunicação pessoal).

Essas linhagens foram produzidas na Universidade da Califórnia, Irvine, e estão sendo estudadas quanto a sua capacidade refratária e o quanto esse novo transgene poderá interferir na própria fisiologia dos mosquitos.

Outra metodologia empregada para a obtenção de proteínas que bloqueiem o ciclo de vida do plasmódio no mosquito foi a utilização de bibliotecas de fagos contendo peptídeos aleatórios. Uma biblioteca de fagos expressando peptídeos aleatórios (phage display random peptides library) consiste de uma mistura de vários fagos, cada um deles expressando um peptídeo em seu capsídeo. A biblioteca utilizada apresenta uma inserção de um peptídeo aleatório de 8 aminoácidos flanqueados por duas cisteínas na porção aminoterminal da proteína VIII do capsídeo do fago M13. Essa mistura de fagos foi utilizada para a seleção de peptídeos com afinidade para as glândulas salivares de *An. stephensi* e com afinidade para o epitélio luminal do trato digestivo. Essas duas regiões são invadidas por diferentes formas de plasmódio, por

esporozoítos e oocinetos, respectivamente. Apesar de apresentarem uma estrutura bem diferente, a mesma seqüência de peptídeos apresentou alta afinidade por essas duas células. Além disso, esse peptídeo foi eficiente no bloqueio da invasão por oocinetos e por esporozoítos (Gosh *et al.*, 2001).

Dengue

O principal inseto vetor da transmissão da dengue é o mosquito *Aedes aegypti*, o qual vive nas áreas urbanas juntamente com o hospedeiro humano (Gubler & Kuno, 1997). A primeira tentativa de uma molécula efetora será a construção de um anticorpo recombinante (scFv), estratégia essa que já foi obtida com sucesso no projeto malária (Capurro *et al.*, 2000).

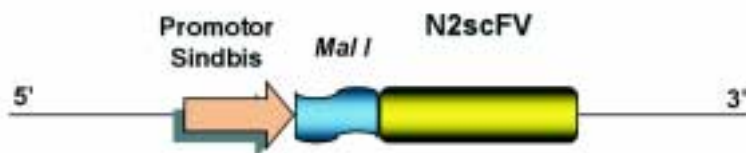
O anti-dengue recombinante scFv está sendo desenvolvido a partir de linhagens de anticorpos monoclonais que já estão descritos na literatura. O monoclonal, 3H5-1-21 (Henchal *et al.*, 1982), neutraliza fortemente o vírus dengue-2. Outro monoclonal, 4G2 (Henchal *et al.*, 1985) reconhece epitopos de envelope nos quatro sorotipos de vírus da dengue (DEN vírus). Um terceiro monoclonal, H27.37, (Cecilia & Gould, 1991) neutraliza os quatro sorotipos da dengue e também outras flaviviruses como West Nile, febre amarela, e a encefalite japonesa. Os monoclonais 9A3D-8, 1A1D-2 e 1B7 reconhecem a proteína de envelope dos vírus da dengue e 2H2 reconhece a proteína precursora M (Roehring *et al.*, 1998).

Conclusões

Existem inúmeros entraves para a execução de um projeto dessa amplitude, onde muitas informações básicas são necessárias e ainda não disponíveis, tal como dados sobre ecologia e dinâmica de populações das diferentes espécies de mosquitos.

Apesar dessas dificuldades, acreditamos que, conjuntamente com outras técnicas de controle da malária e da dengue, tais como o uso de inseticidas, práticas agrícolas que levam à diminuição das populações

Figura 6. Construção do vírus Sindbis recombinante



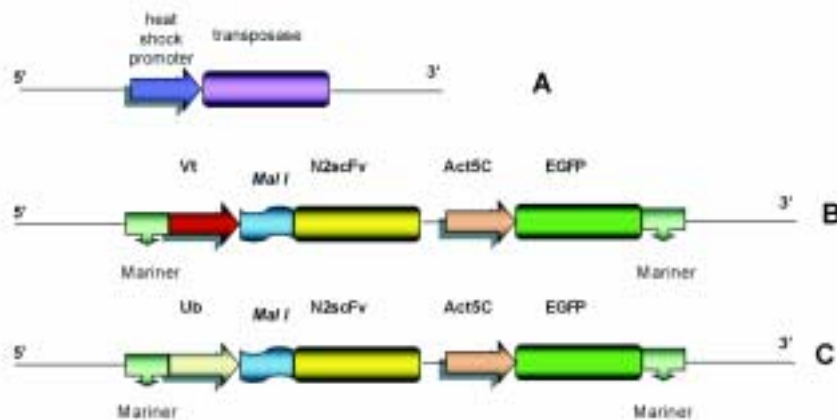


Figura 7. Esquema dos plasmídeos utilizados nas linhagens transgênicas. Uma mistura dos plasmídeos A + B ou A + C foi injetado nos embriões de *Aedes aegypti*. Os embriões foram então submetidos ao choque térmico para a síntese da transposase. As linhagens transgênicas foram selecionadas pela visualização de fluorescência nas larvas.

dos vetores e outras, levarão a um controle efetivo dessas doenças.

Referências bibliográficas

Capurro, M. de L., Bianchi, A.G. de & Marinotti, O. (1994) *Aedes aegypti* lipophorin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **108B**: 35-39.

Capurro, M. de L., Coleman, J., Olson, K., Beerntsen, B.T., Rocha, E., Krettli, A.U. & James, A.A. (2000) Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 427-433.

Carlson, J., Olson, K., Higgs, S. & Beaty, B. (1995) Molecular genetic manipulation of mosquito vectors. *Ann. Rev. Entomol.*, **40**: 359-388.

Caroci, A. de S.; Valle, D.; Marinotti, O. & Ribolla, P.E.M (1999) Bood meal induced digestive enzymes in midgut of brasilian malaria vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**: suppl.II. 260.

Cecilia, D. & Gouuld, E.A. (1991) Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization - resistant mutants. *Virology*, **181**: 70-77.

Christophers, R. (1960) The yellow fever mosquito: Life history, Bionomics & Structure, Cambridge University Press.

Clements, A.N. (1992) The biology of mosquitoes. Vol. 1. development, Nutrition and Reproduction. Chap-

man & Hall.

Collins, F.H. & James, A.A. (1996) Genetic Modification of Mosquitoes. *Science and Medicine* **3**: 52-61.

Foster, W.D. (1965) A history of parasitology. E.&S. Livingstone Ltd.

Gosh, A.K.; Ribolla, P.E.M. & Jacobs-Lorena, M. (2001) Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *PNAS* (in press).

Gubler, D.J. & Kuno, G (1997) Dengue and Dengue Hemorrhagic. Fever Eds: D.J. Gubler, G. Kuno CAB International.

Guerrant, R.L. & Blackwood, B.L. (1999) Threats to global health and survival: The growing crises of tropical infectious diseases - Our "unfinished agenda". *Clinical Infectious Diseases*, **28**: 966-986.

Henchal, E.A., Gentry, M.K., McCown, J.M. & Brandt, W.E. (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**: 830-836.

Henchal, E.A., McCown, J.M., Burke, D.S., Seguin, M.C. & Brandt, W.E. (1985) Epitope analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**: 162-169.

Higgs, S., Olson, K.E., Kamrud, K.I., Powers, A.M. & Beaty, B.J. (1997) Viral expression systems and viral infections in insects. *In The Molecular Biology of Disease Vectors: A Methods*

Manual. Crampton, J.M., Beard, C.B & Louis, C, eds. Chapman and Hall, U.K.

James, A.A. (1992) Mosquito molecular genetics. The hands that feed back. *Science*, **257**: 37-38.

James, A.A., Blackmer, K. & Racioppi, J.V. (1989) A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Gene*, **75**: 73-83.

Jiang, W., Venugopall, K. & Gould, E.A. (1995) Intracellular interference of tick-borne flavivirus infection by using a single-chain antibody fragment delivered by recombinant Sindbis virus. *J. Virol.*, **69**: 1044-1049.

Krettli, AU; Rocha, EMM, Lopes, JD, Carneiro, CR, Kamboj, KK, Cochran, AH & Nussenzweig RS (1988) Circumsporozoite protein of *Plasmodium gallinaceum* characterized by monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* **10**:523-533.

Mitchell, C.J. (1996) Environmental management for vector control. In: Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. eds. The biology of disease vectors. University Press of Colorado.

OMS, (2000) – Boletim da Organização Mundial de Saúde – www.who.int.

Ramirez, AR; Rocha, EMM & Krettli, AU (1995) Antisporozoite antibodies with protective and nonprotective activities: In vitro and in vivo correlations using *Plasmodium gallinaceum*, an avian model. *J. Euk. Microbiol.* **42**(2):705-708.

Roehring, J.T.; Bolin, R.A. & Kelly, R.G. (1998) *Virology* **246**, 317-328.

van Heusden, M.C., Erickson, B.A. & Pennington, J.E. (1997) Lipophorin levels in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, and the effect of feeding. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **34**: 301-312.

Warburg, A; Touray, M; Krettli, AU & Miller, LH (1992) *Plasmodium gallinaceum*: Antibodies to circumsporozoite protein prevent sporozoites from invading the salivary glands of *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitol.* **75**:303-307.

Whitlow, M. & Filpula, D. (1991) Single-chain Fv proteins and their fusion proteins. *Methods, a Companion to Methods in Enzymology* **2**: 97-105.