



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020010130-3 A2



(22) Data do Depósito: 19/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(54) **Título:** MÉTODOS DE DIRIGIR SEXAGEM DE MACHO EM UMA PROGÊNIE DE INSETOS GENETICAMENTE MODIFICADOS, DE PRODUZIR UMA PROGÊNIE GENETICAMENTE MODIFICADA DE OVO DE INSETO MACHO ESTÉRIL, PROGÊNIE DE OVOS DE INSETO, INSETO MACHO ESTÉRIL GENETICAMENTE MODIFICADO, E, MÉTODO DE REDUZIR UMA POPULAÇÃO DE INSETOS DE TIPO SELVAGEM

(51) **Int. Cl.:** A01K 67/033; C12N 15/09; C12N 15/63; C12N 15/85; C12N 15/90.

(30) **Prioridade Unionista:** 21/11/2017 US 62/589.405.

(71) **Depositante(es):** THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA.

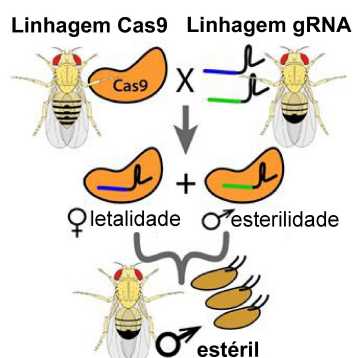
(72) **Inventor(es):** KANDUL, NIKOLAY P; AKBARI, OMAR S..

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018061886 de 19/11/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/103982 de 31/05/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 20/05/2020

(57) **Resumo:** RESUMO MÉTODOS DE DIRIGIR SEXAGEM DE MACHO EM UMA PROGÊNIE DE INSETOS GENETICAMENTE MODIFICADOS, DE PRODUZIR UMA PROGÊNIE GENETICAMENTE MODIFICADA DE OVO DE INSETO MACHO ESTÉRIL, PROGÊNIE DE OVOS DE INSETO, INSETO MACHO ESTÉRIL GENETICAMENTE MODIFICADO, E, MÉTODO DE REDUZIR UMA POPULAÇÃO DE INSETOS DE TIPO SELVAGEM Métodos da técnica de inseto estéril guiada por precisão (pgSIT) descrita incluem métodos para dirigir sexagem de macho em um inseto geneticamente modificado e métodos de produzir uma progênie de ovo de inseto macho estéril geneticamente modificado. Estes métodos incluem a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico em um genoma de um primeiro inseto, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea, introdução de uma endonuclease em um segundo inseto, e cruzamento genético do primeiro inseto e do segundo inseto produzindo, assim, progênie expressando a endonuclease e a pelo menos uma sequência de ácido nucleico. Para a esterilidade de macho, um segundo polinucleotídeo guia tem como alvo uma sequência genômica de esterilidade de macho que é requerida para esterilidade específica de macho.



“MÉTODOS DE DIRIGIR SEXAGEM DE MACHO EM UMA PROGÊNIE DE INSETOS GENETICAMENTE MODIFICADOS, DE PRODUZIR UMA PROGÊNIE GENETICAMENTE MODIFICADA DE OVO DE INSETO MACHO ESTÉRIL, PROGÊNIE DE OVOS DE INSETO, INSETO MACHO ESTÉRIL GENETICAMENTE MODIFICADO, E, MÉTODO DE REDUZIR UMA POPULAÇÃO DE INSETOS DE TIPO SELVAGEM”

#### REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

[0001] O presente pedido reivindica prioridade para e o benefício do Pedido Provisório US número de série 62/589.405, depositado em 21 de novembro de 2017, de título "NOVEL STERILE INSECT TECHNIQUE," cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência.

#### DECLARAÇÃO COM RELAÇÃO À PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO FINANCIADA PELO GOVERNO FEDERAL

[0002] Esta invenção foi realizada com o suporte governamental sob as Bolsas número(s) 5K22AI113060 e 1R21AI123937 concedidas pelo National Institutes of Health e Bolsa número HR0011-17-2-0047 concedida pela Agência Defense Advanced Research Project Agency. O Governo possui determinados direitos sobre a invenção.

#### FUNDAMENTOS

[0003] A produção em massa e a liberação de machos estéreis, conhecidas como Técnica de Insetos Estéreis (SIT), têm sido historicamente usadas para controlar, e erradicar, populações de pragas de insetos que datam de meados dos anos 30. Metodologias anteriores se basearam em agentes danificando o DNA para esterilização, reduzindo substancialmente a aptidão geral e a competitividade de acasalamento de machos liberados. Para superar estas questões, técnicas de infertilidade mediada por micróbios, como a técnica de insetos incompatíveis (IIT), baseada em Wolbachia, e sistemas genéticos modernos, como SIT, tal como a liberação de insetos carregando um letal dominante (RIDL), e outras metodologias para soltar machos férteis que matam geneticamente fêmeas como RIDL específico de fêmea (fsRIDL) e destruidores de cromossomos X ligados aos autossomais foram

desenvolvidas. Embora essas tecnologias genéticas tipo SIT de primeira geração representem avanços significativos, IIT requer estritamente que não sejam liberadas fêmeas infectadas, o que é difícil de alcançar no campo, e o uso de tetraciclina conhecida por ablatir a microbiota compromete a aptidão de machos RIDL/fsRIDL, e os destruidores de cromossomos X podem, em princípio, ser desenvolvidos apenas em espécies com cromossomos sexuais heterogaméticos, limitando assim a ampla aplicabilidade para outras espécies. Portanto, seria logisticamente vantajoso empregar tecnologias baseadas em SIT mais eficientes, que podem ser estendidas como ovos pelo que apenas os machos estéreis sobreviveriam.

### SUMÁRIO

[0004] Aspectos de modalidades da presente exposição são dirigidos a métodos incluindo técnica do inseto estéril guiada por precisão (pgSIT).

[0005] Em algumas modalidades da presente exposição, um método de dirigir a sexagem de macho em um inseto geneticamente modificado inclui: a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico em um genoma de um primeiro inseto, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea; a introdução de uma endonuclease em um segundo inseto, o segundo inseto capaz de ser geneticamente cruzado com o primeiro inseto; e cruzamento genético do primeiro inseto e do segundo inseto produzindo, assim, progênie expressando a endonuclease e a pelo menos uma sequência de ácido nucleico a partir da qual ovos de insetos machos amadurecem até a idade adulta.

[0006] Em algumas modalidades da presente exposição, um método de produção de uma progênie de ovos de inseto macho estéril geneticamente modificado inclui: a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico em um genoma de um primeiro inseto, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea; a introdução de uma endonuclease em um segundo inseto, o segundo inseto capaz de

ser geneticamente cruzado com o primeiro inseto, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico inclui adicionalmente pelo menos um segundo polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica de esterilidade de macho que é requerida para esterilidade específica de macho; e cruzamento genético do primeiro inseto e do segundo inseto para produzir uma progênie de ovos de inseto macho estéril geneticamente modificado.

[0007] Em algumas modalidades da presente exposição, a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico no genoma do primeiro inseto inclui integração homozigótica em todas as cópias de cromossomo no genoma. Em algumas modalidades, a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico inclui a introdução de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico no primeiro inseto durante um estágio embriônico.

[0008] Em algumas modalidades da presente exposição, o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia e o pelo menos um segundo polinucleotídeo guia incluem, cada, pelo menos um ácido ribonucleico guia (gRNA).

[0009] Em algumas modalidades da presente exposição, a sequência genômica essencial de fêmea inclui um gene essencial para uma viabilidade específica de fêmea ou um éxon específico de fêmea essencial para desenvolvimento específico de fêmea e/ou uma viabilidade específica de fêmea.

[0010] Em algumas modalidades da presente exposição, o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia inclui mais do que um primeiro polinucleotídeo guia cada um dos quais tem como alvo uma região diferente da mesma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea.

[0011] Em algumas modalidades da presente exposição, o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia inclui mais do que um primeiro polinucleotídeo guia cada um dos quais tem como alvo uma diferente sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea.

[0012] Em algumas modalidades da presente exposição, a sequência genômica essencial de fêmea é um gene ou uma variante de emenda de um gene, o gene selecionado dentre o grupo de sexo letal (Sxl), transformador (Tra), sexo duplo

(Dsx), homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos, parálogos dos mesmos, ou combinações dos mesmos.

[0013] Em algumas modalidades da presente exposição, o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia inclui mais do que um primeiro polinucleotídeo guia cada um dos quais tem como alvo um gene diferente selecionado dentre Sxl, Tra, ou Dsx incluindo homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos, ou parálogos dos mesmos.

[0014] Em algumas modalidades da presente exposição, o mais do que um primeiro polinucleotídeo guia inclui dois primeiros polinucleotídeos guias cada um dos quais tem como alvo um gene diferente selecionado dentre Sxl, Tra, ou Dsx incluindo homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos ou parálogos dos mesmos.

[0015] Em algumas modalidades da presente exposição, o mais do que um primeiro polinucleotídeo guia inclui dois primeiros polinucleotídeos guias cada um dos quais tem como alvo um gene diferente selecionado dentre Sxl ou Dsx incluindo homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos ou parálogos dos mesmos.

[0016] Em algumas modalidades da presente exposição, a sequência genômica de esterilidade de macho é um gene selecionado dentre  $\beta$ Tubulina 85D ( $\beta$ Tub), 'fuzzy onions' (Fzo), protamina A (ProtA), ou parada de espermatócitos (Sa) incluindo homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos ou parálogos dos mesmos.

[0017] Em algumas modalidades da presente exposição, quando o segundo inseto é um macho, a introdução da endonuclease no segundo inseto inclui integrar homozigoticamente um gene codificando a endonuclease, e quando o segundo inseto é uma fêmea, a introdução da endonuclease no segundo inseto inclui integrar homozigoticamente ou heterozigoticamente um gene codificando a endonuclease ou depositando uma proteína endonuclease no segundo inseto.

[0018] Em algumas modalidades da presente exposição, a introdução de uma endonuclease em um segundo inseto inclui a introdução da endonuclease no segundo inseto durante um estágio embriônico.

[0019] Em algumas modalidades da presente exposição, uma progênie de inseto geneticamente modificado ovos inclui até 100% ovos de insetos machos produzidos de acordo com os métodos da presente exposição.

[0020] Em algumas modalidades da presente exposição, uma progênie de ovos de insetos geneticamente modificados inclui até 100% ovos de insetos machos estéreis produzidos de acordo com os métodos da presente exposição.

[0021] Em algumas modalidades, um inseto macho estéril geneticamente modificado produzido de acordo com os métodos da presente exposição é capaz de aumentar a taxa de ovos não eclodidos por acasalamento com insetos fêmeas de tipo selvagem.

[0022] Em algumas modalidades da presente exposição, um método de reduzir uma população de insetos de tipo selvagem inclui a introdução de um macho estéril geneticamente modificado produzido de acordo com os métodos da presente exposição na população de insetos de tipo selvagem.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0023] O depósito de patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta publicação de patente ou pedido de patente com desenho(s) colorido(s) serão fornecidas pelo Instituto de Patentes mediante solicitação e pagamento da taxa necessária. Os desenhos anexos, junto com o relatório descritivo, ilustram modalidades exemplares da presente exposição e, junto com a descrição, servem para explicar os princípios da presente exposição.

[0024] Figura 1A é um esquema de pgSIT utilizando dois componentes do sistema CRISPR/Cas9 binário, a endonuclease de Cas9 e ácidos ribonucleicos guias (gRNAs) (com sequências específicas do alvo azul ou verde), mantidas como linhagens homozigóticas separadas, seu cruzamento resulta em nocautes concorrentes ou simultâneos de um gene requerido para viabilidade de fêmea e um gene requerido para esterilidade de macho resultante em sobrevivência de somente machos estéreis F<sub>1</sub>, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0025] Figura 1B é um esquema de emenda alternativa específica de sexo nos genes *sxl*, *tra* e *dsx* regulados por expressão de fêmea de proteínas Sxl (verde) e Tra (amarelo) (linhas cinza); disrupção de éxon específico de fêmea de genes de determinação de sexo chave, *sxl*, *tra* e *dsx*, rompe o desenvolvimento de fêmea; e os alvos de éxons pgSIT são indicados por cruzamentos amarelos, de acordo com

modalidades da presente exposição.

[0026] Figura 1C apresenta esquema de todos construtos engenheirados de acordo com modalidades da presente exposição, com construtos funcionais e moscas depositadas em centros Addgene.org e Bloomington Drosophila Stock Center, respectivamente. Os nomes de genes e sequências de sítio alvo de gRNA são apresentados na caixa. A sequência de codificação de uma SpCas9 foi flanqueada por dois sinais de localização nuclear (NLS) em ambas as extremidades e um peptídeo T2A de auto-clivagem com sequência de codificação de eGFP na extremidade C, servindo como um indicador visual da expressão de Cas9.

[0027] Figura 1D são imagens de microscópio estéreo fluorescente de três novas linhagens homozigóticas expressando Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) engenheiradas de acordo com modalidades da presente exposição. Três linhagens de *Drosophila* suportando a expressão de SpCas9 em linhagem estritamente germinativa ou linhagem germinativa junto com células somáticas foram desenvolvidas. *Nanos-Cas9* (*nos-Cas9*), *vasa-Cas9* (*vas-Cas9*), e *Ubiquitin-63E* (*Ubi-Cas9*) foram inseridas no mesmo sítio no terceiro cromossomo usando integração mediada por  $\phi$ C31-. O transgene *Opie2-dsRed* serviu como um marcador de transgenese e uma sequência T2A-eGFP de auto-clivagem, que foi fixada na extremidade 3' da sequência de codificação de SpCas9, proveu um indicador de expressão de Cas9 como mostrado em Figura 1C. Os níveis de expressão de dsRed e eGFP em cada linhagem de Cas9 foram comparados a moscas de *tipo selvagem* (*wt*). A expressão de Cas9-T2A-eGFP foi principalmente limitada a linhagem germinativa de fêmea em *nos-Cas9* e *vas-Cas9* com uma forte expressão em *nos-Cas9*. *Ubi-Cas9* suportou a expressão mais forte de Cas9, medida por eGFP, em ambas as linhagens germinativas de fêmea e macho, e em somática.

[0028] Figura 1E mostra gráficos de barra de frequências médias de gênero em progênie F<sub>1</sub> de cruzamentos com os insetos parentais engenheirados de acordo com modalidades da presente exposição. Dois painéis de topo mostram frequências de gênero de cruzamentos de controle bidirecional de linhagens homozigóticas de sgRNA de tipo selvagem (*wt*) indicando que ambos as fêmeas e os machos férteis (♀

e ♂) estão presentes em razões similares, mas não foram identificados intersexos estéreis (♀). As fêmeas férteis são mostradas em rosa, os machos férteis são mostrados em azul, as fêmeas estéreis em laranja, e os machos estéreis em cinza. Os dois painéis de fundo mostram frequências de gênero de cruzamentos de *nanos-Cas9* homozigótica (*nos-Cas9*) para *wt* (controle) e quatro linhagens sgRNA homozigóticas (experimento). Independente de herança maternal ou paternal de Cas9, 100% de *sgRNA<sup>Sxl</sup>* ♀ trans-heterozigóticos eram letais, 100% de *sgRNA<sup>Tra</sup>* e *sgRNA<sup>Dsx<sup>F</sup></sup>* ♀ trans-heterozigóticos eram masculinizados em intersexos ♀ estéreis, e 100% de *sgRNA<sup>βTu</sup>* ♂ trans-heterozigóticos eram estéreis. As frequências de gênero e fertilidade em trans-heterozigotos foram comparadas com as em progênie correspondente de cruzamentos de controle com moscas *nos-Cas9* (linhas sólidas) ou *sgRNAs* (linhas pontilhadas) e *wt*. Cada barra mostra uma frequência média de gênero e um desvio padrão. Significância estatística foi calculada com testes *t* assumindo variância desigual, e para esterilização de macho, valores *P* foram calculados usando teste de Chi-quadrado de Pearson para tabelas de contingência (vermelho \*). (*P* > 0,001\*\*\*).

[0029] Figura 1F é uma tabela da progênie F<sub>1</sub> a partir dos cruzamentos entre gRNA único homozigótico (sgRNA/sgRNA) e *nos-Cas9* homozigótica (*nos-Cas9/nos-Cas9*), de acordo com modalidades da presente exposição.

[0030] Figura 1G é uma tabela de *loci* genômicos de genotipagem alvo-dirigidos por gRNAs usando métodos de acordo com modalidades da presente exposição, onde indels (inserções/deleções) (texto vermelho) foram encontrados em moscas trans-heterozigóticas.

[0031] Figura 2A mostra gráficos de barra de frequências de Gênero (♀ (fêmea), ♂ (macho), e ♀ intersexo) de progênie F<sub>1</sub> trans-heterozigótica resultante de cruzamentos entre gRNAs duplos (*dsRNA*) e linhagens homozigóticas de *Cas9* de acordo com modalidades da presente exposição. Três RNAs guias duplos (dgRNAs), cada tendo como alvo *sxl*, *tra* ou *dsx* combinados com *βTub*, foram bidirecionalmente cruzados com três linhagens *Cas9* dirigidas por promotores *nanos* (*nos*), *vasa* (*vas*), e *Ubiquitin-63E* (*Ubi*) e foram suficientes para assegurar uma completa penetração de



ambas letalidade de fêmeas / masculinização e esterilidade de macho em cada cruzamento recíproco, como indicado em Figuras 1C-1D. As frequências de gênero e fertilidade em trans-heterozigotos foram comparadas com as em progênie correspondente de cruzamentos de controle com moscas *Cas9* (grupos de barras à esquerda, linhas sólidas) ou *dgRNAs* (painéis de topo, linhas pontilhadas) e *wt*. Cada barra mostra uma frequência média de gênero e um desvio padrão. Significância estatística foi calculada com testes *t* assumindo variância desigual, e para esterilização de macho, valores *P* foram calculados usando teste de Chi-quadrado de Pearson para tabelas de contingência (vermelho \*). ( $P > 0,01^{**}$ ,  $P > 0,001^{***}$ ).

[0032] Figura 2B é uma tabela da progênie  $F_1$  a partir dos cruzamentos entre linhagens gRNA duplo homozigóticas (sgRNA/dgRNA) e *Cas9* homozigóticas (*Cas9/Cas9*), de acordo com modalidades da presente exposição.

[0033] Figura 2C é uma tabela de dados mostrando a ordem de gene alvo-dirigido em via de determinação de sexo (topo) e fenótipo de nocaute correspondente (com imagens) em progênie de acordo com modalidades da presente exposição. Fenótipos de nocautes dirigidos para *dgRNAs* e morfologia intersexo em comparação com nocautes *wt* ♀ e ♂. *βTub, Sxl* ♀ perecem durante estágios pupais, como indicado em Figuras 2D-2E. Como mostrado, *dgRNA<sup>βTub, Tra/+</sup>; nos-Cas9/+* intersexos (♀), mas não *dgRNA<sup>βTub, DsxF/+</sup>; nos-Cas9/+* ♀, tinham ‘pentas de sexo’ --ver insertos internos ampliados.

[0034] Figura 2D mostra gráficos de barra mostrando que a taxa de eclosão (porcentagem) estimada para ovos *dgRNA<sup>βTub, Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* gerados por cruzamento homozigótico *nos-Cas9/nos-Cas9* ♀ e *dgRNA<sup>βTub, Sxl/dgRNA<sup>βTub, Sxl</sup></sup>* ♂ não foi estatisticamente diferente da dos ovos de tipo selvagem (*wt*), como indicado em tabela 2 (Exemplo 6), de acordo com modalidades da presente exposição. Significância estatística foi calculada com um teste *t* assumindo variância desigual. ( $P < 0.05^{NS}$ ,  $P > 0,001^{***}$ ).

[0035] Figura 2E mostra gráficos de barra mostrando as taxas de diferentes resultados para larvas eclodidas *dgRNA<sup>βTub, Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+*, de acordo com modalidades da presente exposição, em que bateladas de 50 larvas eclodidas foram

criadas até adultas, seu gênero ou tempo de desenvolvimento até a morte foi registrado, como indicado em tabela 3 (Exemplo 6). A maior parte das mortes larvais adicionais ocorreu durante uma transição pupal, e a porcentagem de morte pupal não foi estatisticamente diferente da porcentagem de *wt* ♀. Significância estatística foi calculada com um teste *t* assumindo variância desigual. ( $P < 0,05^{\text{NS}}$ ,  $P > 0,001^{\text{***}}$ ).

[0036] Figura 2F é uma tabela das características fenotípicas de moscas trans-heterozigóticas carregando Cas9 e gRNAs duplos (dsRNA), de acordo com modalidades da presente exposição.

[0037] Figura 2G mostra imagens microscópicas de expressividade variável do número de cerdas de 'pente sexual' em nocautes ♂ *βTub*, *Tra*, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0038] Figura 2H mostra imagens microscópicas de órgãos reprodutivos internos em fêmeas *wt* (imagem superior): dois ovários (*ov*), receptáculo seminal (*sr*), espermateca dupla (*sp*), duas glândulas acessórias (*ag*), e útero (*ut*), e a mosca intersexo ♂ *dgRNA<sup>βTub,Tra/+</sup>; nos-Cas9/+* (imagem inferior) tinha um ovário rudimentar, e órgãos que pareciam com as glândulas acessórias do macho, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0039] Figura 2I é uma imagem de gel agarose de transcritos amplificados indicando que ambas as variantes de emenda macho e fêmea do gene *Dsx* são expressadas em intersexos de nocaute *βTub*, *Tra*, de acordo com modalidades da presente exposição. RT-PCR foi usado para avaliar variantes de emenda alternativas, específicas de fêmeas e específicas de machos, de *dsx* comparando fêmeas tipo selvagem (*wt*) (♀), machos *wt* (♂) e *dgRNA<sup>βTub,Tra/+</sup>; nos-Cas9/+* (*βTub\**, *Tra\** ♂). Ambos os transcritos *dsx* específicos de fêmeas e machos foram identificados em *βTub\**, *Tra\** ♂. Escada molecular (ML) de DNA fita dupla e controle de gabarito No (NTC) são indicados.

[0040] Figura 2J mostra imagens microscópicas de moscas ♂ intersexo *dgRNA<sup>βTub,DsxF/+</sup>; nos-Cas9/+* que desenvolveram somente um único ovário (*ov*) várias vezes não conectado com um oviduto e órgãos que pareciam glândulas

acessórias específicas de macho (ag) como indicado, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0041] Figura 2K mostra imagens microscópicas do sistema reprodutivo interno de macho em moscas ♂ *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* com testículo (ts) e glândulas adrenais (ag) como indicado, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0042] Figura 2L mostra imagens microscópicas do sistema reprodutivo interno de macho em moscas ♂ *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* com testículo (ts) e glândulas adrenais (ag) como indicado, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0043] Figura 2M mostra imagens microscópicas de testículo de tipo selvagem *wt* (imagem à esquerda) tendo, cistos alongados com espermátides amadurecendo que foram não encontrados nos testículos (ts) *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* como indicado aqui e em Figuras 2K-2L, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0044] Figura 2N é um esquema da informação de sequência com relação ao alvo  $\beta$ Tubulin85D ( $\beta$ Tub) nos machos estéreis (♂) trans-heterozigóticos *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* (nocaute duplo) mostrando inserções / deleções em mosaico (indels) precisamente no sítio alvo  $\beta$ Tub, de acordo com modalidades da presente exposição. Diagramas nas posições presentes de topo de sítios de gRNA alvo e iniciadores usados para PCR relativos às estruturas genéticas de genes alvo-dirigidos. As leituras de sequências de ambas as extremidades deduziram diversidade de gabaritos que especificamente localizaram os sítios alvo-dirigidos com gRNAs no ♂ estéril, enquanto o ♂ tipo selvagem tinha alelos únicos sem qualquer ambiguidade de sequência.

[0045] Figura 2O é um esquema da informação de sequência com relação ao alvo sexo letal (*Sxl*) nos machos estéreis (♂) trans-heterozigóticos *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* (nocaute duplo) mostrando indels em mosaico identificados no sítio alvo *Sxl* nos mesmos machos estéreis (♂) *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+* e podem estar relacionados com a letalidade pupal de fêmeas trans-heterozigóticas observada nas

Figuras 2D-2E, de acordo com modalidades da presente exposição. Diagramas nas presentes posições de topo de sítios de gRNA alvo e iniciadores usados para PCR relativos às estruturas genéticas de genes alvo-dirigidos. Leituras de sequências de ambas as extremidades deduziram diversidade de gabaritos que especificamente localizaram nos sítios alvo-dirigidos com gRNAs no ♂ estéril, enquanto o tipo selvagem ♂ tinha alelos únicos sem qualquer ambiguidade de sequência.

[0046] Figura 2P é um esquema da informação de sequência com relação ao alvo Transformador (*Tra*) nos intersexos (♀) e machos estéreis (♂) trans-heterozigóticos *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Tra*</sup>/+; *nos-Cas9*/+ nocaute duplo, mostrando inserções / deleções em mosaico (indels) localizadas no sítio *Tra* alvo-dirigido por RNAs guias duplos (dgRNA) *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Tra*</sup>, de acordo com modalidades da presente exposição. Diagramas no topo mostram posições de alvos de gRNA e iniciadores usados para PCR relativo a estruturas genéticas de genes alvo-dirigidos. Leituras de sequências de ambas as extremidades deduziram diversidade de gabaritos que especificamente localizaram os sítios alvo-dirigidos com gRNAs em ♂ e ♀ estéreis, embora o ♂ tipo selvagem tivesse alelos únicos sem qualquer ambiguidade de sequência em ambos os sítios.

[0047] Figura 2Q é um esquema da informação de sequência com relação ao alvo sexo duplo (*DsxF*) nos gRNAs duplos trans-heterozigóticos *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*DsxF*</sup> em ♂ e ♀ estéreis *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*DsxF*</sup>/+; *nos-Cas9*/+, mostrando indels em mosaico, que foram identificados no sítio alvo *DsxF*, de acordo com modalidades da presente exposição. Diagramas no topo mostram posições de alvos de gRNA e iniciadores usados para PCR relativo a estruturas genéticas de genes alvo-dirigidos. Leituras de sequências de ambas as extremidades deduziram diversidade de gabaritos que especificamente localizaram nos sítios alvo-dirigidos com gRNAs em ♂ e ♀ estéreis, embora o ♂ tipo selvagem tivesse alelos únicos sem qualquer ambiguidade de sequência em ambos os sítios.

[0048] Figura 3A mostra gráficos de barra representando quantificação genética do efeito dominante por carga maternal de Cas9, em que genótipos, frequências de gênero, e fertilidade de moscas geradas por cruzamentos recíprocos

entre moscas homozigóticas *dgRNAs* e heterozigóticas *Cas9* são indicados pelas barras sólidas ou em riscas, de cor rosa, azul, laranja, ou cinza, como mostrado em nas legendas das figuras. A progênie de cruzamentos com *Cas9* heterozigótica paternal é mostrada nos painéis à esquerda e com *Cas9* heterozigótica maternal é mostrada nos painéis à direita. Cada barra mostra uma frequência média de gênero e um desvio padrão. Significância estatística foi calculada com testes *t* assumindo variância desigual. ( $P > 0,01^{**}$ ,  $P > 0,001^{***}$ ). Barras em tiras indicam herança de *Cas9* como um gene, enquanto barras sólidas indicam herança de alelo +.

[0049] Figura 3B é uma tabela esquemática mostrando combinações de genótipos e contribuições maternal/zigótica em embriões, e sua penetração, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0050] Figura 3C é uma tabela da progênie  $F_1$  a partir dos cruzamentos entre gRNAs duplos homozigóticos (*dgRNAs/dgRNAs*) e *Cas9* heterozigótica (*Cas9/TM3, Sb*), de acordo com modalidades da presente exposição.

[0051] Figura 3D é uma tabela esquemática mostrando acúmulo de níveis elevados de mosaicismo bialélico (BM) através do desenvolvimento do inseto leva à perda da função do gene no nível organísmico e assegura uma completa penetração de fenótipos induzidos: letalidade (mosaicismo bialélico letal (LBM)) (caixas rosa), masculinização de fêmea, ou esterilidade de macho, como indicado. Complementação da função de gene nas mesmas células por alelos *wt* não clivados (caixas verde-claras), e alelos de resistência (caixas amarelas) gerados por NHEJ, não são suficientes para resgatar o fenótipo induzido em nível organísmico e, assim, 100% de progênie trans-heterozigótica tem os fenótipos induzidos as caixas se tornam menores e mais abundantes à medida que as células dividem.

[0052] Figura 4A é um esquema de uma configuração experimental para estimar a competitividade de acasalamento de machos estéreis *dgRNA<sup>βTub,Sxl/+; nos-Cas9/+</sup>* (marcados com vermelho) competindo contra machos *wt* para manter os acasalamentos com fêmeas *wt*, de acordo com modalidades da presente exposição. Uma fêmea acasalada é resistente ao próximo acasalamento durante em torno de 24 horas, e o sucesso do acasalamento de machos estéreis foi avaliado por diminuição

da fertilidade (por exemplo, pelo aumento da taxa de ovos não eclodidos).

[0053] Figura 4B mostra gráficos de barra mostrando porcentagens de ovos postos e eclodidos onde o número de ovos postos foram normalizados contra o número de ovos maior ( $n=199$ ) para converter os mesmos para o percentil como indicado na tabela de Figura 4C. a presença de um macho estéril resultou em uma diminuição significativa em fertilidade de fêmea (#3 versus #2) que não poderia ser contada para remoção de um macho *wt* (#2 versus #1). Significância estatística foi calculada com um teste *t* assumindo variância desigual comparando grupo #3 para #2 e #1 ( $P > 0,003^{**}$ ,  $P > 0,0001^{***}$ ).

[0054] Figura 4C é uma tabela de competitividade de acasalamento com base em ovos postos, não eclodidos e eclodidos para machos  $dgRNA^{bTub,Sxl/+}; nos-Cas9/+$  comparados com machos de tipo selvagem com os cruzamentos indicados, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0055] Figura 4D é um gráfico de curvas de sobrevivência de machos *wt* (linha azul) e dois tipos de machos estéreis  $dgRNA^{bTub,Sxl/+}; nos-Cas9/+$ , com herança de Cas9 paternal (linha vermelha) ou maternal (linha verde), de acordo com modalidades da presente exposição. Curvas de sobrevivência mostram estimativas não paramétricas de máxima verossimilhança (NPMLE) para três grupos de machos, junto com inicializações “bootstrap” estimadas em intervalos com 95% de confiança mostrados com sombra clara, e não exclusividade representativa mostrada com sombra escura. O raio  $y$  mostra a porcentagem de sobrevivência estimada. Ambos os tipos de machos pgSIT viveram de modo significativamente mais longo do que machos *wt* ( $P < 2.2^{-16}$ ), enquanto nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre dois tipos de machos pgSIT. A generalização de Sun do teste de classificação logarítmica (*logrank*) foi usada para testar as diferenças em curvas de sobrevivência.

[0056] Figura 4E é uma tabela de dados de longevidade (duração de vida em dias) para machos  $dgRNA^{bTub,Sxl/+}; nos-Cas9/+$  comparados com machos *w-* de controle, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0057] Figura 4F é uma tabela dos parâmetros de entrada usados em modelo

de supressão de população de *Aedes aegypti*, como descrito aqui, de acordo com modalidades da presente exposição. O conteúdo completo de todas as referências citadas, como indicado na tabela, é incorporado aqui por referência.

[0058] Figura 4G é um gráfico do impacto previsto pelo modelo de liberações de ovos de pgSIT (azul escuro) em densidade da população de mosquitos *Aedes aegypti* com comparação a liberações de acordo com a técnica de inseto incompatível com base em *Wolbachia* (IIT) (púrpura), liberação de insetos carregando um gene letal dominante (RIDL) (azul claro), e RIDL específico de fêmea (fsRIDL) (vermelho) usando um modelo de supressão como descrito aqui, de acordo com modalidades da presente exposição. Liberações são realizadas semanalmente durante um período de seis meses com razões de liberação (relativo a adultos selvagens) como indicado na legenda de insetos. Previsões de modelo foram computadas usando 2000 realizações da implementação estocástica da estrutura de simulação MGDriVE para uma população de *Ae. aegypti* aleatoriamente misturada de 10.000 fêmeas adultas e parâmetros de modelo, descritos na tabela de Figura 4F. Como mostrado, liberações de pgSIT superam as liberações de todas as outras tecnologias de supressão ou redução, mostrando o maior potencial para eliminar a população local.

[0059] Figura 4H mostra gráficos medindo a sensibilidade de previsões de modelo de pgSIT para a competitividade do acasalamento de macho, redução da duração de vida com uma razão de liberação de 200 ovos por adulto selvagem, mantendo todos os outros parâmetros constantes, como especificado na tabela de Figura 4F. Previsões de modelo foram computadas usando 250 realizações de implementação estocástica da estrutura de simulação MGDriVE para uma população aleatoriamente misturada de 10.000 fêmeas adultas de *Ae. aegypti*. Como mostrado no gráfico à esquerda, com uma razão de liberação semanal de 200 ovos por adulto selvagem e mantendo a redução da duração de vida devido ao construto pgSIT constante em 18%, a eliminação pode ser alcançada com segurança para uma competitividade do acasalamento de macho de 25%; mas não para 5%, como é o caso para machos adultos RIDL, de acordo com modalidades da presente exposição. Como mostrado no gráfico à direita, com uma razão de liberação semanal de 200 ovos

por adulto selvagem e mantendo competitividade do acasalamento de macho constante em 78%, a eliminação pode ser alcançada com segurança para reduções de duração de vida menores do que ou iguais a 75%, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0060] Figura 4I é um gráfico mostrando uma ampla faixa de valores de parâmetro (redução da variação da duração de vida e competitividade do acasalamento de macho concorrentemente como indicado) para o qual a eliminação local de *Ae. aegypti* pode ser alcançada com segurança (blocos marrom) dada uma razão de liberação semanal de 200 ovos por adulto selvagem, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0061] Figura 4J mostra gráficos medindo a sensibilidade de previsões de modelo de pgSIT para competitividade do acasalamento de macho, redução da duração de vida com um razão de liberação de 100 ovos por adulto selvagem, mantendo todos os outros parâmetros constantes, como especificado na tabela de Figura 4F. Como mostrado no gráfico à esquerda, com uma razão de liberação semanal de 100 ovos por adulto selvagem e mantendo redução da duração de vida devido ao construto de pgSIT constante em 18%, eliminação pode ser alcançada com segurança para uma competitividade do acasalamento de macho de 50%; mas não para 25%, de acordo com modalidades da presente exposição. Como mostrado no gráfico à direita, com uma razão de liberação semanal de 100 ovos por adulto selvagem e mantendo competitividade do acasalamento de macho constante em 78%, eliminação pode ser alcançada com segurança para reduções de duração de vida menores do que ou iguais a 50%, de acordo com modalidades da presente exposição.

[0062] Figura 4K é um gráfico mostrando uma ampla faixa de valores de parâmetro (redução da variação da duração de vida e competitividade do acasalamento de macho concorrentemente, como indicado) para que a eliminação local de *Ae. aegypti* possa ser alcançada com segurança (blocos marrom) dada uma razão de liberação semanal de 100 ovos por adulto selvagem, de acordo com modalidades da presente exposição.



[0063] Figura 5 é um esquema mostrando uma fábrica localizada nos Estados Unidos (ponto azul) para a produção de ovos de pgSIT para distribuição (por exemplo, por drone) e liberação em locais removidos no mundo todo (por exemplo, na América do Sul, África e Ásia (pontos rosas)), de acordo com modalidades da presente exposição.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[0064] A técnica de insetos estéreis (SIT) é uma tecnologia ambientalmente segura e comprovada para suprimir e reduzir populações selvagens. Modalidades da presente exposição incluem métodos para modificar geneticamente insetos usando uma tecnologia baseada em CRISPR, aqui referida como métodos de "SITs guiados por precisão" (pgSIT). Como divulgado em maiores detalhes ao longo de toda a presente exposição, métodos de pgSIT dependem mecanicamente de uma tecnologia genética dominante que permite sexagem, bem como sexagem concorrente ou simultânea e a esterilização em insetos. A sexagem concorrente ou simultânea e a esterilização de ovos de insetos permite a capacidade de liberar ovos no meio ambiente, garantindo o surgimento de machos adultos estéreis. Para aplicações em campo, a liberação de óvulos elimina a carga de sexagem e esterilização manuais de machos, reduzindo assim o esforço geral e aumentando a escalabilidade.

[0065] A fim de demonstrar a eficácia da tecnologia pgSIT, de acordo com modalidades da presente exposição, vários sistemas pgSIT foram engenheirados e demonstrados em *Drosophila* como um inseto de exemplo. As técnicas e métodos genéticos descritos e referenciados aqui são entendidos como aplicáveis a uma ampla faixa de insetos.

[0066] Os métodos pgSIT atualmente divulgados de sexagem de machos e métodos de sexagem e esterilidade de machos usam a precisão e a exatidão da tecnologia baseada em CRISPR para romper genes essenciais para a viabilidade de fêmea (para sexagem de macho) ou concorrentemente ou simultaneamente para romper genes essenciais para a viabilidade de fêmea e fertilidade de macho. Os métodos pgSIT da presente exposição utilizam um esquema simples de reprodução requerendo duas cepas de insetos (uma primeira cepa parental e uma segunda cepa

parental), uma expressando uma endonuclease (por exemplo, Cas9) e a outra expressando um construto de sequência de ácido nucleico tendo, pelo menos, um polinucleotídeo guia dirigido ao gene ou genes a serem rompidos. Um único acasalamento entre essas duas cepas parentais mecanisticamente resulta em nocautes alélicos dominantes ou bialélicos dominantes guiados por polinucleotídeos síncronos (por exemplo, guiados por RNA) do gene alvo ou genes através de desenvolvimento.

[0067] A tecnologia CRISPR refere-se a repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas agrupadas (em inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) e foi extensivamente estudada e modificada para edição de genoma na maioria dos organismos estudados, como descrito em Sternberg e Doudna, *Mol. Cell* 58, 568–574 (2015), o conteúdo completo sendo aqui incorporado por referência.

[0068] Como usado aqui, com relação à base baseada em CRISPR, o termo “polinucleotídeo guia” refere-se a um polinucleotídeo tendo uma “sequência sintética” capaz de se ligar à proteína de enzima endonuclease correspondente (por exemplo, Cas9) e uma sequência alvo variável capaz de se ligar ao alvo genômico (por exemplo, uma sequência de nucleotídeo encontrada em um éxon de um gene alvo). Em algumas modalidades da presente exposição, um polinucleotídeo guia é um ácido ribonucleico guia (gRNA). Em algumas modalidades, a sequência alvo variável do polinucleotídeo guia é qualquer sequência dentro de um alvo que é único com relação ao resto do genoma e é imediatamente adjacente a um motivo adjacente de protoespaçador (PAM). A sequência exata da sequência PAM como variar como diferentes endonucleases requerem diferentes sequências PAM. Como usado aqui, a expressão “construto heterólogo único tendo dois diferentes RNAs guias únicos (sgRNAs)” refere-se a um RNA guia duplo (dgRNA).

[0069] Com relação à proteína de enzima endonuclease da tecnologia baseada em CRISPR, o termo “endonuclease” refere-se a qualquer proteína de enzima endonuclease apropriada ou uma variante da mesma que será especificamente dirigida pelo polinucleotídeo guia selecionado para nocautear

enzimaticamente a sequência alvo do polinucleotídeo guia. Como usado aqui, o termo “variante da mesma,” como usado com relação a uma endonuclease, refere-se à endonuclease mencionada em sua forma enzimaticamente funcional expressada em qualquer organismo hospedeiro apropriado ou sistema de expressão e/ou incluindo quaisquer modificações para intensificar a atividade enzimática da endonuclease.

[0070] Os exemplos descritos em toda a presente exposição representam métodos para produzir uma progênie de inseto macho estéril em que tanto um gene de viabilidade de fêmea como um gene de fertilidade de macho são rompidos usando pelo menos dois polinucleotídeos guias. No entanto, como seria entendido por um uma pessoa versada na técnica, métodos para dirigir sexagem de macho incluem o método atualmente descrito em que um gene essencial para viabilidade de fêmea é alvo-dirigido e genes para esterilidade de macho são não alvo-dirigidos. Por exemplo, com referência à Figura 1A, o genitor de inseto endonuclease (rotulada linhagem de Cas9) é cruzado com o genitor de inseto RNA guia (linhagem de gRNA) tendo dois gRNAs (um azul, um verde) tendo como alvo um gene essencial de fêmea e um gene de esterilidade de macho. No entanto, para métodos de dirigir sexagem de macho, a linhagem de gRNA não precisaria ser geneticamente modificada para expressar o gene de esterilidade de macho.

[0071] Como usado aqui, os termos “integrando,” “integração,” e termos similares referem-se à introdução de uma sequência recombinante heteróloga de ácido nucleico no inseto alvo. Como seria entendido por um uma pessoa versada na técnica, técnicas para a modificação genética de insetos são conhecidas e descritas, por exemplo, em Cockburn et al., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2: 68-99, (1984), o conteúdo completo sendo incorporado aqui por referência. Integração, como usado aqui, pode mencionar a integração de sequência recombinante de ácido nucleico no genoma do inseto alvo. O genoma do inseto alvo inclui pelo menos um cromossomo do inseto alvo, mas pode incluir todas as cópias de cromossomos relevantes. Como tal, integração no genoma pode ser heterozigótica ou homozigótica.

[0072] Como usado aqui, o termo “introdução de uma endonuclease” em um

inseto alvo refere-se à introdução recombinante de uma endonuclease no inseto de modo tal que a endonuclease está presente no inseto. Introdução de uma endonuclease em um inseto não requer integração genômica, mas pode incluir integração genômica. Por exemplo, introdução de uma endonuclease inclui “depositar” a endonuclease no inseto como descrito, por exemplo, em Lin e Potter, G3, (2016), doi:10.1534/g3.116.034884, cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência.

[0073] Adicionalmente, embora os exemplos da presente exposição incluam métodos para obter até 100% progênie estéril de macho, métodos para produzir menos do que 100% progênie estéril de macho são também incluídos dentro do escopo da presente exposição. Por exemplo, em algumas modalidades da presente exposição, a cepa de inseto parental expressando um polinucleotídeo guia pode ser heterozigótica ou homozigótica para o polinucleotídeo guia (único, duplo, ou mais polinucleotídeos guias). Em algumas modalidades, a cepa de inseto parental expressando um polinucleotídeo guia é homozigótica para o polinucleotídeo guia, assim assegurando que toda a progênie receba o polinucleotídeo guia.

[0074] Com referência às Figuras 2A e 3A, em modalidades adicionais da presente exposição, se a cepa de inseto parental expressando a endonuclease é macho, o genitor macho pode ser heterozigótico ou homozigótico para a endonuclease, enquanto que, se a cepa de inseto parental expressando a endonuclease é fêmea, a endonuclease pode ser depositada na fêmea, expressada heterozigoticamente, ou homozigoticamente.

[0075] Com referência à Figura 2F, se ambas as cepas parentais são homozigóticas para sua respectiva endonuclease ou polinucleotídeo guia, toda ou quase toda a progênie recebe a endonuclease e o(s) polinucleotídeo(s) de guia, como um resultado de penetração completa não mendeliana. Consequentemente, os desejados fenótipos (por exemplo, todos os insetos machos ou todos os insetos machos e estéreis) em toda a progênie podem ser produzidos em uma única geração. Como usado aqui, o termo “quase toda a progênie” refere-se a pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% da progênie.

Com referência à tabela 3, em algumas modalidades da presente exposição, viabilidade da progênie é determinada no estágio adulto.

[0076] Em algumas modalidades da presente exposição, métodos para dirigir sexagem de macho incluem a introdução de uma endonuclease em um genitor do primeiro inseto e a integração de, pelo menos, um construto de sequência de ácido nucleico no genoma do genitor do segundo inseto (por exemplo, um vetor plasmídeo) a sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia (por exemplo, um sgRNA ou um dgRNA) tendo como alvo uma sequência de nucleotídeo em uma sequência genômica essencial de fêmea) e acasalando o genitor do primeiro inseto e o genitor do segundo inseto para produzir uma progênie toda de machos ou quase toda. Como usado aqui, o termo “sequência genômica essencial de fêmea” engloba qualquer sequência genômica ou gene específica para o inseto fêmea. Exemplos de uma sequência genômica essencial de fêmea incluem um gene de determinação de sexo ou uma variante de emenda específica de fêmea da mesma, um gene ou variante de emenda de um gene não encontrado no macho, um gene ou variante de emenda de um gene essencial para desenvolvimento gonadal da fêmea, e/ou um gene ou variante de emenda de um gene não essencial para viabilidade de macho. Com referência à Figura 1B, exemplos não limitativos de sequência genômica essencial de fêmea incluem o éxons específicos de fêmea nos genes de determinação de sexo de *Drosophila* *Sxl*, *Tra*, e *Dsx* incluindo homólogos, ortólogos, e parálogos dos mesmos. Como usado aqui, o termo “homólogo” refere-se ao gene comparável de um organismo encontrado em outro organismo conferindo a mesma função. Como usado aqui, os termos “ortólogos” e “parálogos” referem-se a tipos de homólogos. Ortólogos são genes correspondentes em diferentes linhagens e são um resultado de especialização, e parálogos resultam de uma duplicação de genes.

[0077] A regulação e a emenda alternativa específica de sexo mediadas pela proteína TRA ou o complexo TRA/TRA-2 em insetos são conhecidas e discutidas em Pane et al., *Development* 129: 3715-3725 (2002), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Os produtos de emenda específicos de macho e fêmea do gene *Dsx* são conhecidos e discutidos em Suzuki et al., *Insect Biochem Mol*

Biol 31: 1201-1211 (2001), Salvemini et al., BMC Evol. Biol. 11, 41 (2011), e Scali et al., J. Exp. Biol. 208, 3701–3709 (2005), conteúdos completos de todos sendo aqui incorporados por referência.

[0078] Em algumas modalidades da presente exposição, um método para dirigir sexagem de macho inclui a introdução de uma endonuclease em um genitor do primeiro inseto e a integração de, pelo menos, um construto de sequência de ácido nucleico no genoma do genitor do segundo inseto, a sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência de nucleotídeo em uma sequência genômica essencial de fêmea selecionada dentre éxons específicos de fêmea nos genes *Tra* e/ou *Dsx*, incluindo homólogos, ortólogos, ou parálogos dos mesmos, onde o genitor do primeiro inseto e o genitor do segundo inseto são acasalados para produzir uma progênie toda, ou quase toda, de macho.

[0079] Em algumas modalidades da presente exposição, um método para produzir ovos de insetos estéreis machos inclui a introdução de uma endonuclease em um genitor do primeiro inseto e a integração de, pelo menos, um construto de sequência de ácido nucleico em um genoma de um genitor do segundo inseto, o pelo menos um construto de sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica essencial de fêmea requerida para uma viabilidade específica de fêmea ou desenvolvimento e pelo menos um segundo polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica de esterilidade de macho que é requerida para fertilidade de macho, e o acasalamento do genitor do primeiro inseto e do genitor do segundo inseto para produzir progênie toda, ou quase toda, de macho estéril. Como usado aqui, o termo “sequência genômica de esterilidade de macho” refere-se a qualquer sequência genômica específica de macho requerida para fertilidade de macho em um inseto que não afeta o desenvolvimento do inseto macho ou a viabilidade do inseto macho. Exemplos não limitativos de uma sequência genômica específica de macho requerida para fertilidade de macho em um inseto incluem os genes  $\beta$ Tubulina 85D ( $\beta$ Tub), ‘fuzzy onions’ (Fzo), protamina A (ProtA), e parada de espermátócitos (Sa) e homólogos, ortólogos, e parálogos dos mesmos. Em algumas modalidades, o construto de sequência de ácido

nucleico inclui um ou mais segundos polinucleotídeos guias tendo como alvo uma ou mais sequências genômicas específicas de macho requeridas para fertilidade de macho. A conservação funcional de  $\beta$ Tubulina 85D incluindo *Anopheles* e *Aedes aegypti* é descrita em Catteruccia et al., *Nat. Biotechnol.* 23, 1414–1417 (2005) e Smith et al., *Insect Mol. Biol.* 16, 61–71 (2007), o conteúdo completo de ambos sendo incorporado aqui por referência.

[0080] Como seria entendido por uma pessoa versada na técnica, muitos genes importantes para viabilidade de fêmea e fertilidade de macho podem ser alvo-dirigidos. Os genes de insetos específico de fêmea/macho para interrupção são discutidos em Akbari et al., *G3* 3, 1493–1509 (2013) e Papa et al., (2016) doi:10.1101/081620, o conteúdo completo de ambos sendo incorporado aqui por referência.

[0081] Em algumas modalidades da presente exposição, os insetos geneticamente modificados e métodos para gerar os insetos geneticamente modificados incluem insetos da Ordem Diptera, Lepidoptera, ou Coleoptera.

[0082] Em algumas modalidades da presente exposição, os insetos geneticamente modificados e métodos para gerar os insetos geneticamente modificados incluem um inseto selecionado dentre um mosquito dos gêneros *Stegomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, ou *Culex*. Dentre estes gêneros, espécies de mosquitos de exemplo incluem *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus triseriatus* (*Aedes triseriatus*), *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles freeborni*, espécie *Culex*, ou *Culiseta melanura*.

[0083] Adicionalmente, cepas expressando Cas9 foram desenvolvidas em vetores das doenças principais dengue e malária incluindo *Ae. aegypti*, *Anopheles gambiae*, e *Anopheles stephensi*, como respectivamente descrito em Li et al., (2017) doi:10.1101/156778, Hammond et al., *Nat. Biotechnol.* 34, 78–83 (2016), e Gantz et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6736–43 (2015), conteúdos completos de todos sendo aqui incorporados por referência.

[0084] Em algumas modalidades, os insetos geneticamente modificados e

métodos para gerar os insetos geneticamente modificados incluem qualquer inseto selecionado dentre um dos seguintes: mosca da fruta tefritida selecionada dentre Medfly (*Ceratitis capitata*), Mexfly (*Anastrepha ludens*), mosca da fruta oriental (*Bactrocera dorsalis*), mosca da azeitona (*Bactrocera oleae*), mosca do melão (*Bactrocera cucurbitae*), mosca da fruta Natal (*Ceratitis rosa*), mosca da cereja (*Rhagoletis cerasi*), mosca da fruta Queensland (*Bactrocera tyroni*), mosca do pêssego (*Bactrocera zonata*), mosca da fruta do caribe (*Anastrepha suspensa*), mosca da fruta oriental (*Bactrocera dorsalis*), mosca da fruta-das-índias ocidentais (*Anastrepha obliqua*), a larva da mosca-varejeira do Novo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*), a larva da mosca-varejeira do Velho Mundo (*Chrysomya bezziana*), mosca de carne da ovelha australiana/mosca da garrafa verde (*Lucilia cuprina*), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), a traça-cigana europeia (*Lymantria dispar*), o bicho-da-laranja Navel (*Amyelois transitella*), a broca do galho do pessegueiro (*Anarsia lineatella*), a broca da haste do arroz (*Tryporyza incertulas*), as traças noctuídes, Heliiothinae, o besouro japonês (*Papilla japonica*), besouro de franja branca (*Graphognathus* spp.), gorgulho (*Anthonomus grandis*), o besouro da batata-do-colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), a cochililha do vinho (*Planococcus ficus*), psílideo do cítrico asiático (*Diaphorina citri*), drosófila de asa manchada (*Drosophila suzukii*), cigarrinha verde-azul (*Graphocephala atropunctata*), cigarrinha de asa de vidro (*Homalodisca vitripennis*), traça da maçã marrom claro (*Epiphyas postvittana*), percevejo *Bagrada* (*Bagrada hilaris*), percevejo marmoreado marrom (*Halyomorpha halys*), traça cigana asiática selecionada dentre o grupo de *Lymantria dispar* asiática, *Lymantria dispar japonica*, *Lymantria albescens*, *Lymantria umbrosa*, e *Lymantria postalba*, besouro de chifre longo asiático (*Anoplophora glabripennis*), besouro Rhinoceros do coco (*Oryctes rhinoceros*), broca cinza esmeralda (*Agrilus planipennis*), traça europeia da videira (*Lobesia botrana*), traça-cigana europeia (*Lymantria dispar*), mariposa falsa (*Thaumatotibia leucotreta*), formigas de fogo selecionadas dentre *Solenopsis invicta* Buren, e *S. richteri* Forel, lagarta do Velho Mundo (*Helicoverpa armigera*), mosca-lanterna manchada (*Lycorma delicatula*), abelha africanizada (*Apis mellifera scutellata*), broca da fruta e broto (*Leucinodes orbonalis*), larva da raiz do



milho (*Diabrotica* spp.), larva da raiz do milho ocidental (*diabrotica virgifera*), mosca branca (*bemisia tabaci*), mosca doméstica (*Musca Domestica*), mosca da garrafa verde (*Lucilia cuprina*), mosca da seda (*Bombyx mori*), aonidiela vermelha (*Aonidiella aurantia*), verme do coração do cachorro (*Dirofilaria immitis*), besouro do pinheiro do sul (*Dendroctonus frontalis*), tripes do abacate (*Thysanoptera* Spp.), larva de mosca selecionada dentre *Oestridae* spp. e *Dermatobia hominis*), mosca do cavalo (*Tabanus sulcifrons*), mosca do chifre (*Haematobia irritans*), larva da mosca varejeira selecionada dentre *Cochliomyia macellaria* (*C. macellaria*), *C. hominivorax*, *C. aldrichi*, ou *C. minima*, mosca Tsetse (*Glossina* spp.), mosca do berne selecionada dentre *Hypoderma bovis* ou *Hypoderma lineatum*, mosca-da-lanterna com manchas (*Lycorma delicatula*), besouro Khapra (*Trogoderma granarium*), ácaro da abelha de mel (*Varroa destructor*), Térmitas (*Coptotermes formosanus*), aldelgid lanoso da cicuta (*Adelges tsugae*), besouro do galho da noqueira (*Pityophthorus juglandis*), vespa de madeira europeia (*Sirex noctilio*), lagarta de mancha rosada (*pectinophora scutigera*), ácaro de duas manchas (*Tertanychus urticae*), traça de dorso diamante (*plutella xylostella*), lagarta Taro (*spodoptera litura*), besouro da farinha vermelha (*tribolium castaneum*), afídeo do pêssigo verde (*Myzus persicae*), afídeo do algodão (*aphis gossypii*), gafanhoto marrom (*nilaparvata lugens*), minhoca da beterraba (*spodotera exigua*), tripes da flor ocidental (*frankliniella occidentalis*), traça cidia (*cydia pomonella*), gorgulho do feijão-de-corda (*callosobruchus maculatus*), afídeo da ervilha (*acyrthosiphon pisum*), traça do tomateiro (*tuta absoluta*), tripes da cebola (*thrips tabaci*), e lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera*).

[0085] Em algumas modalidades da presente exposição, uma endonuclease apropriada inclui uma sequência associada a endonuclease de CRISPR 9 (Cas9) ou uma variante da mesma, uma sequência associada a endonuclease de CRISPR 13 (Cas13) ou uma variante da mesma, sequência associada a CRISPR- 6 (Cas6) endonuclease ou uma variante da mesma, uma endonuclease de CRISPR de *Prevotella* e *Francisella* 1 (Cpf1) ou uma variante da mesma, ou uma endonuclease de CRISPR de *Microgenomates* e *Smithella* 1 (Cms1) ou uma variante da mesma.

[0086] Em algumas modalidades da presente exposição, uma endonuclease

apropriada inclui uma Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), uma Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), uma Cas9 de *Francisella novicida* (FnCas9), ou uma variante das mesmas. Variantes podem incluir um motivo adjacente de protoespaçador (PAM) SpCas9 (xCas9), SpCas9 de alta fidelidade (SpCas9-HF1), uma SaCas9 de alta fidelidade, ou uma FnCas9 de alta fidelidade.

[0087] Em outras modalidades da presente exposição, a endonuclease compreende uma nuclease de fusão de Cas compreendendo uma proteína Cas9 ou uma variante da mesma fusionada com uma FokI nuclease ou variante da mesma. Variantes da proteína Cas9 desta nuclease de fusão incluem uma Cas9 cataliticamente inativa (por exemplo, Cas9 morta).

[0088] Em algumas modalidades da presente exposição, a endonuclease pode ser uma proteína Cas9, Cas13, Cas6, Cpf1, CMS1, ou qualquer variante das mesmas que é derivada ou expressada a partir de *Methanococcus maripaludis* C7, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium efficiens* YS-314, *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium kroppenstedtii* (DSM 44385), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Nocardia farcinica* IFM10152, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Rhodococcus opacus* B4 (uid36573), *Acidothermus cellulolyticus* 11B, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Kribbella flavida* (DSM 17836, uid43465), *Thermomonospora curvata* (DSM43183), *Bifidobacterium dentium* Bd1, *Bifidobacterium longum* DJO10A, *Slackia heliotrinireducens* (DSM 20476), *Persephonella marina* EX H1, *Bacteroides fragilis* NCTC 9434, *Capnocytophaga ochracea* (DSM 7271), *Flavobacterium psychrophilum* JIP02 86, *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA 835), *Roseiflexus castenholzii* (DSM 13941), *Roseiflexus* RS1, *Synechocystis* PCC6803, *Elusimicrobium minutum* Pei191, filotipo RsD17 de bactéria de grupo 1 de Térmitas não cultivadas, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Listeria innocua*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Streptococcus agalactiae*-5-A909, *Streptococcus agalactiae* NEM316, *Streptococcus agalactiae* 2603, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* GGS 124, *Streptococcus equi*

zooepidemicus MGCS10565, Streptococcus gallolyticus UCN34 (uid46061), Streptococcus gordonii Challis subst CH1, Streptococcus mutans NN2025 (uid46353), Streptococcus mutans, Streptococcus pyogenes M1 GAS, Streptococcus pyogenes MGAS5005, Streptococcus pyogenes MGAS2096, Streptococcus pyogenes MGAS9429, Streptococcus pyogenes MGAS10270, Streptococcus pyogenes MGAS6180, Streptococcus pyogenes MGAS315, Streptococcus pyogenes SSI-1, Streptococcus pyogenes MGAS10750, Streptococcus pyogenes NZ131, Streptococcus thermophiles CNRZ1066, Streptococcus thermophiles LMD-9, Streptococcus thermophiles LMG 18311, Clostridium botulinum A3 Loch Maree, Clostridium botulinum B Eklund 17B, Clostridium botulinum Ba4 657, Clostridium botulinum F Langeland, Clostridium cellulolyticum H10, Finegoldia magna (ATCC 29328), Eubacterium rectale (ATCC 33656), Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma mobile 163K, Mycoplasma penetrans, Mycoplasma synoviae 53, Streptobacillus moniliformis (DSM 12112), Bradyrhizobium BTai1, Nitrobacter hamburgensis X14, Rhodopseudomonas palustris BisB18, Rhodopseudomonas palustris BisB5, Parvibaculum lavamentivorans DS-1, Dinoroseobacter shibae. DFL 12, Gluconacetobacter diazotrophicus Pal 5 FAPERJ, Gluconacetobacter diazotrophicus Pal 5 JGI, Azospirillum B510 (uid46085), Rhodospirillum rubrum (ATCC 11170), Diaphorobacter TPSY (uid29975), Verminephrobacter eiseniae EF01-2, Neisseria meningitides 053442, Neisseria meningitides alpha14, Neisseria meningitides Z2491, Desulfovibrio salexigens DSM 2638, Campylobacter jejuni doylei 269 97, Campylobacter jejuni 81116, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari RM2100, Helicobacter hepaticus, Wolinella succinogenes, Tolumonas auensis DSM 9187, Pseudoalteromonas atlantica T6c, Shewanella pealeana (ATCC 700345), Legionella pneumophila Paris, Actinobacillus succinogenes 130Z, Pasteurella multocida, Francisella tularensis novicida U112, Francisella tularensis holarctica, Francisella tularensis FSC 198, Francisella tularensis, Francisella tularensis WY96-3418, ou Treponema denticola (ATCC 35405).

[0089] Com referência às Figuras 4A-4C, a competitividade de acasalamento dos machos estéreis produzidos usando os métodos pgSIT de acordo com

modalidades da presente exposição, indicam que estes machos estéreis são capazes de acasalar com sucesso e são capazes de competir com sucesso para acasalamentos com fêmeas de tipo selvagem. Além disso, com referência às Figuras 4D-4E, a duração de vida dos machos estéreis produzidos usando os métodos pgSIT de acordo com modalidades da presente exposição indica que estes machos estéreis têm uma duração de vida (em número total de dias) que é pelo menos tão longa e se não mais longa do que a dos machos de tipo selvagem correspondentes. Competitividade de acasalamento e longevidade são fatores dominantes para alcançar a eliminação local, como, uma vez que a supressão ou redução inicial foi obtida, os recursos larvais são abundantes e assim maior consumo por formas imaturas liberadas é menos impactante. A liberação de ovos resulta em rápida supressão da população ou redução desde o início, como a eclosão de larvas consomem recursos que poderiam, de outra forma, estar disponíveis para larvas férteis. Além disso, os ovos de machos estéreis pgSIT, de acordo com modalidades da presente exposição, quando da liberação na vida selvagem, podem resultar em eclosão de larvas, como a letalidade de fêmeas ocorre durante estágios embrião/larval, resultando em máximo consumo de recursos larvais por formas imaturas soltas.

[0090] Adicionalmente, os métodos pgSIT como descritos aqui não se baseiam em translocações de cromossomos, esterilizantes químicos, irradiação, antibióticos ou infecções bacterianas, que podem severamente comprometer a aptidão e a competitividade de acasalamento dos machos estéreis liberados.

[0091] Com referência às Figuras 4F-4K, usando a estrutura de simulação MGDrivE, como descrito em Exemplo 5 aqui, liberações semanais simuladas de 200 ovos estéreis machos pgSIT por adulto selvagem, indicam uma ampla faixa de valores de parâmetro para os quais a eliminação local de *Ae. aegypti* é alcançada de modo confiável.

[0092] Com referência às Figura 5, métodos para suprimir ou reduzir populações de insetos de espécies de insetos, incluindo vetores de doença e pragas agrícolas, incluem a introdução de ovos estéreis machos produzidos usando métodos

pgSIT da presente exposição em uma área em necessidade de supressão ou redução de insetos alvo-dirigida.

[0093] Algumas modalidades da presente exposição incluem o desenvolvimento de uma instalação de criação para propagar endonuclease homozigótica (por exemplo, Cas9) e cepas que expressam dgRNA separadamente. Em algumas modalidades, um fluxo de trabalho automatizado é implementado para estágios imaturos de classificação por sexo (por exemplo, fêmeas Cas9 com machos dgRNA) e combinando em caixas para maturação, acasalamento e propagação de ovos. A classificação por sexo pode ser alcançada de várias maneiras adequadas, incluindo separação mecânica de tamanho, plataforma de classificação por sexo de cepas automatizada (Union Biometrica) combinada com uma cepa de sexagem genética ou classificação óptica robótica automatizada. Métodos apropriados de classificação por sexo são discutidos em Papathanos et al., *Transgenic insects: techniques and applications* 83–100, (outubro, 2014) e Gilles et al., *Acta Trop.* 132, S178–S187 (2014), o conteúdo completo de ambos sendo incorporado aqui por referência.

[0094] Em algumas modalidades, os métodos pgSIT de produzir ovos machos estéreis são particularmente eficazes para as espécies de insetos com uma diapausa durante o estágio de ovo. Insetos tendo uma diapausa durante o estágio de ovo, incluem, por exemplo, *Ae. aegypti* e *Ae. Albopictus*, como descrito em Diniz et al., *Parasit. Vectors* 10, 310 (2017), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Essa diapausa permitiria o acúmulo escalonável de ovos para liberações inundativas. Por conseguinte, como representado em geral na Figura 5, uma única instalação eficiente de produção de ovos pgSIT pode distribuir ovos pgSIT para muitos locais remotos em todo o mundo, onde eles podem simplesmente ser eclodidos, criados e liberados, eliminando ou reduzindo a carga logística da triagem manual do sexo, esterilização e liberação de machos adultos frágeis em cada local de campo, aumentando assim escalabilidade e eficiência, permitindo uma maior capacidade de supressão ou redução de população em larga escala.

[0095] Os seguintes exemplos são apresentados para fins ilustrativos apenas,

e não limitam o escopo ou conteúdo do presente pedido.

### EXEMPLOS

[0096] **Exemplo 1.** Masculinização/letalidade de fêmeas induzidas por CRISPR binária, ou Infertilidade de macho. Para engenheirar pgSIT, linhagens expressando RNA guia único (sgRNA) e spCas9 (Cas9 daqui em diante) foram geradas em *Drosophila*. No total nove linhagens sgRNAs homozigóticas foram desenvolvidas para alvo-dirigir genes essenciais para viabilidade de fêmea, ou genes importantes para a fertilidade de macho. Para viabilidade de fêmea, estes genes incluíram genes específicos de sexo, alternativamente genes de determinação de sexo emendados incluindo *sexo letal* (*Sxl*, duas linhagens transgênicas separadas - *sgRNA<sup>Sxl</sup>*, *sgRNA<sup>Sxl-B</sup>*), *transformador* (*tra*, duas linhagens separadas - *sgRNA<sup>Tra</sup>*, *sgRNA<sup>Tra-B</sup>*), ou *duplosexo* (*dsxF*, *sgRNA<sup>DsxF</sup>*) como mostrado em Figuras 1B-1C e descrito em Slee e Bownes, Q. Rev. Biol. 65, 175–204 (1990); Bell et al., Cell 65, 229–239 (1991); Boggs et al., Cell 50, 739–747 (1987), e Burtis e Baker, Cell 56, 997–1010 (1989), conteúdos completos de todos sendo aqui incorporados por referência. Para romper a fertilidade de macho, genes ativos durante espermatogênese foram alvo-dirigidos, tal como *βTubulina 85D* (*βTub*, *sgRNA<sup>βTub</sup>*), ‘fuzzy onions’ (*fzo*, *sgRNA<sup>Fzo</sup>*), *protamina A* (*ProtA*, *sgRNA<sup>ProtA</sup>*), ou *parada de espermátocitos* (*sa*, *sgRNA<sup>Sa</sup>*) como mostrado em Figura 1C e descrito em Kempthues et al., Cell 21, 445–451 (1980), Hales e Fuller, Cell 90, 121–129 (1997), Kanippayoor et al., Spermatogenesis 3, e24376 (2013), e Lim et al., Spermatogenesis 2, 158–166 (2012), conteúdos completos de todos sendo aqui incorporados por referência. Para promover uma expressão de Cas9 robusta, três linhagens expressando Cas9 homozigóticas sob o controle de dois promotores específicos de linhagem germinativa predominantemente fortes foram estabelecidas incluindo *nanos* (*nos-Cas9*) ou *vasa* (*vas-Cas9*) como descrito em Sano et al., Mech. Dev. 112, 129–139 (2002) e Doren et al., Curr. Biol. 8, 243–246 (1998), o conteúdo completo de ambos sendo incorporados aqui por referência. Além disso, o promotor ubíquo *Ubiquitin 63E* (*Ubi-Cas9*) <https://paperpile.com/c/cKXxhc/zEwAO> como descrito em Akbari et al., BMC Cell Biol. 10, 8 (2009) e mostrado em Figura 1D foi estabelecido para permitir a expressão robusta em tecidos tanto somáticos como na

linhagem germinativa durante quase todos os estágios de vida desenvolvimental. Um peptídeo T2A de auto-clivagem e sequência de codificação de eGFP foram inseridos a jusante (3') para o Cas9 dirigido pelo promotor junto servindo como um indicador visual da atividade do promotor como mostrado em Figuras 1C-1D e descrito em Li et al., (2017). doi:10.1101/156778, cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência.

[0097] Para avaliar a atividade genética das linhagens de sgRNA, cada cepa foi cruzada para *nos-Cas9*, e a resultante progênie F<sub>1</sub> trans-heterozigótica foi analisada. A partir destes cruzamentos, 4/9 dos sgRNAs, incluindo *sgRNA<sup>Sxl</sup>*, *sgRNA<sup>Tra</sup>*, *sgRNA<sup>DsxF</sup>*, *sgRNA<sup>βTub</sup>*, exibiram fenótipos esperados e foram submetidos a adicional caracterização. Para ainda avaliar quatro sgRNAs, cada uma destas quatro cepas selecionadas foi bidirecionalmente cruzada para tipo selvagem *wt* (número de réplica de cruzamentos entre 10♀ e 10♂, N = 24; número de progênie, n =3519), ou para *nos-Cas9* homozigótica (N=28, n=3628) como mostrado em Figura 1F. Com referência às Figuras 1E-1F, os cruzamentos *wt* não produziram desvios de razão de gênero significantes ou comprometeram a fertilidade (N=30, n=4371). Com referência contínua às Figuras 1E-1F, sem levar em conta se o *nos-Cas9* foi maternalmente ou paternalmente herdado, todos os trans-heterozigotos F<sub>1</sub> herdando *sgRNA<sup>Sxl</sup>* eram 100% machos (N=7, n=540), e 100% fêmeas trans-heterozigóticas herdando *sgRNA<sup>Tra</sup>* ou *sgRNA<sup>DsxF</sup>* foram convertidas em intersexos masculinizados estéreis incapazes de pôr ovos (N=14, n=942), e 100% de machos trans-heterozigóticos *sgRNA<sup>βTub</sup>* machos eram estéreis (N=7, n=517). Estes fenótipos foram molecularmente explorados nos *loci* genéticos alvo-dirigidos, e todos todas as moscas sequenciadas (n =16) tinham inserções/deleções mosaicos (indels) nos *loci* alvo-dirigidos, como mostrado em Figura 1G.

[0098] **Exemplo 2.** Criação de populações de até 100% machos estéreis. Em algumas modalidades da presente exposição, a metodologia pgSIT divulgada pode ser usada para romper genes essenciais para viabilidade de fêmea e/ou esterilidade de macho. Em algumas modalidades, a metodologia pgSIT divulgada pode ser usada para romper concorrentemente ou simultaneamente genes essenciais para viabilidade

de fêmea e esterilidade de macho para dirigir geneticamente a maior parte ou todos (até 100%) de prole F<sub>1</sub> sobrevivente para serem machos estéreis. Para alcançar esta sexagem e esterilidade dirigidas, três cepas homocigóticas adicionais expressando combinações de gRNA duplo multiplexadas (*dgRNA*), incluindo *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Sxl*</sup>, *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Tra*</sup>, e *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*DsxF*</sup> foram geradas como mostrado em Figura 1C. Para avaliar geneticamente a atividade destas cepas pgSIT, cada cepa foi bidirecionalmente cruzada para *wt* ou Cas9 homocigótica (ou *nos-Cas9*, *vas-Cas9*, ou *Ubi-Cas9*). Com referência às Figuras 2A-2B, cruzamentos *wt* não produziram desvios de gênero significantes ou comprometeram a fertilidade (N=36, n=5747). Com referência contínua à Figura 2B, cruzamentos entre *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Sxl*</sup> com cada cepa de Cas9 resultou em 100% letalidade de fêmeas devido à disrupção de *sxl*, além de 100% esterilidade de macho devido à disrupção concorrente ou simultânea de  $\beta$ Tub (N=24, n= 2521). Também, 100% das fêmeas a partir dos cruzamentos entre cada cepa de Cas9 e *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Tra*</sup> (N=24, n=1697) ou *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*DsxF*</sup> (N=24, n=1791) foram masculinizadas em intersexos estéreis devido a disrupção de ou *tra* ou *dsx*, e prole 100% de machos eram estéreis devido à disrupção concorrente ou simultânea de  $\beta$ Tub (N=48, n=4231). Consequentemente, com referência às Figuras 2A-2C, a metodologia pgSIT da presente exposição torna os complexos Cas9-gRNA altamente ativos, que não são saturados por dgRNAs e produzem uma prole adulta de até 100% de machos estéreis de modo reprodutível e com uma eficiência sem precedentes.

[0099] Com relação às análises fenotípicas da progênie F<sub>1</sub> dos cruzamentos de Figuras 2A-2C, 100% das fêmeas nocaute *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Sxl*</sup> pereceram durante estágios pré-adultos com a maior parte morrendo durante transição pupal como mostrado em Figuras 2D-2E. Para fenótipos intersexo, fertilidade foi sempre comprometida, no entanto, como mostrado em Figuras 2C e 2F, expressividade variável foi observada como a extensão da masculinização anatômica variou entre indivíduos e foi mais pronunciada nos nocautes *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Tra*</sup>, como comparado com o *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*DsxF*</sup>. Por exemplo, com referência às Figuras 2F e 2H, intersexos nocaute *dgRNA* <sup>$\beta$ Tub,*Tra*</sup> tinham ‘pentes sexuais’ com números de cerdas variáveis e raramente desenvolveram mais do que um ovário rudimentar. Além disso, com referência às



Figura 2I, molecularmente os intersexos nocaute  $dgRNA^{\beta Tub, Tra}$  expressaram ambas as variantes de emenda alternativa específicas de fêmea e macho de gene *dsx*, provavelmente devido à ausência de *Tra* que é importante para inibir a emenda alternativa específica de macho e promover a emenda alternativa específico de fêmea de *dsx* como descrito em Nagoshi et al., Cell 53, 229–236 (1988), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Em contraste, com referência às Figuras 2C, 2F, e 2J, os intersexos nocautes  $dgRNA^{\beta Tub, Dsx^F}$  não foram observados como desenvolvendo ‘pentas sexuais’, e alguns intersexos tinham ovários normais permitindo engravidar, embora incapazes de colocar ovos.

[00100] A fim de analisar os fenótipos de infertilidade de macho, a anatomia dos testículos e desenvolvimento de espermátides nos machos estéreis F<sub>1</sub> foi visualizada usando uma linhagem transgênica gerada expressando eGFP sob o controle do  $\beta Tub85D$ -promotor ( $\beta Tub-GFP$ ) para marcar fluorescentemente os testículos e esperma como mostrado em Figura 1C foi introgressado com as cepas  $dgRNA$ . Com referência às Figura 2K, quando introgressada com *nos-Cas9* homozigótica, os machos F<sub>1</sub> estéreis trans-heterozigóticos  $dgRNA^{\beta Tub, Sxl/+}; \beta Tub-GFP/nos-Cas9$  mostraram testículos enrolados completamente desenvolvidos (ts) e glândulas acessórias (ag). No entanto, o desenvolvimento de espermátides nestes machos estéreis F<sub>1</sub> foi completamente interrompido com fenótipos consistentes com os prévios relatos de ruptura de  $\beta Tub$ , como descrito em Kempfues et al., Cell 21, 445–451 (1980), cujo conteúdo completo é aqui incorporado por referência. Por exemplo, com referência à Figura 2L, somente cistos redondos e espermátócitos iniciais foram identificados nos testículos (ts) de machos estéreis marcados com GFP, enquanto com referência à Figura 2M, testículos *wt* (ts) tinham cistos rotulados GFP robustos, espermátides tardios alongados. Com referência à Figura 2F, embora não tenham sido identificados testículos positivos para GFP em intersexos nocaute ou  $dgRNA^{\beta Tub, Tra}$  ou  $gRNA^{\beta Tub, Dsx^F}$  (n>20), órgãos semelhantes a glândula acessória de macho putativo pareado estavam presentes em ambos os tipos de intersexo, como mostrado em Figuras 2H, 2J, e 2K. Para confirmar as mudanças moleculares que resultaram em fenótipos de nocaute, ambos *loci* alvo-dirigidos de moscas F<sub>1</sub>

individuais foram sequenciados. Com referência às Figuras 1G e 2N-2Q, comparadas com moscas de controle (n=32), cada mosca de nocaute duplo examinada (n=20) tinha indels em mosaico precisamente nos sítios de clivagem que impediram o sequenciamento através de ambas as extremidades dos amplicons de PCR.

[00101] **Exemplo 3.** Penetração completa resultante de expressão zigótica.

Deposição maternal de complexos Cas9/gRNA em embriões em desenvolvimento é suficiente para assegurar herança não mendeliana de mutações na progênie receptora, mesmo se esta progênie não herdar geneticamente os genes codificando os componentes de edição. Este fenômeno é conhecido como efeito maternal dominante, como descrito em Lin e Potter, G3 (2016) doi:10.1534/g3.116.034884, cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. A este respeito, herança paternal de um dos componentes de núcleo (por exemplo, *Cas9* ou *dgRNA*), combinada com a deposição maternal do componente compatível foi investigada para determinar se qualquer uma destas seria suficiente para gerar mutações herdáveis. Com referência às Figuras 1G e 3B, acasalamentos entre pais Cas9 homozigóticos e mães expressando dgRNA heterozigóticas não foram suficientes para induzir mutações (n=12), ou fenótipos de nocaute (N=6, n=252), em progênie F<sub>1</sub> que não herdou os dgRNAs como um gene. Sem ser limitado por qualquer mecanismo ou teoria em particular, este resultado pode ser causado por um resultado de uma meia-vida curta de dgRNA na ausência de Cas9 durante a deposição maternal. Com referência às Figuras 3A e 3C, acasalamentos entre pais heterozigóticos Cas9 e mães expressando dgRNA heterozigóticas resultaram em fenótipos de esterilidade de macho e letalidade de fêmeas/masculinização em toda a progênie F<sub>1</sub> trans-heterozigótica que herdou o gene de *Cas9* (N=27, n=2191), enquanto toda a progênie F<sub>1</sub> que herdou somente os genes codificando dgRNA manteve as características normais (N=27, n=2640). Com referência contínua às Figuras 3A e 3C, cruzamentos entre mães Cas9 heterozigóticas e pais expressando dgRNA homozigóticos resultaram em fenótipos de esterilidade de macho e letalidade de fêmeas/masculinização em toda a progênie F<sub>1</sub> trans-heterozigótica (N=36, n=3019). Adicionalmente, com referência às Figura 3A, contribuição maternal de proteína Cas9

foi suficiente para induzir fenótipos de intersexo em progênie que não recebeu o gene de *Cas9* quando tendo como alvo *tra* ou *dsx* (N=24, n=782), demonstrando um efeito maternal dominante. No entanto, com referência às Figuras 3A-3B, a contribuição maternal de *Cas9* somente por *Ubi-Cas9* (N=4; n=0, número de fêmeas sobreviventes), mas não *nos-Cas9* nem *vas-Cas9* (N=8, n=556), induziu letalidade de fêmeas *dgRNA <sup>$\beta$ Tub,Sxl/+</sup>; +/-* indicando que a potência do promotor pode afetar a eficiência da mutação. Com referência às Figuras 1G e 3B, apesar da falta de fenótipos de letalidade em fêmeas recebendo proteína *Cas9* maternalmente carregada a partir de *nos-Cas9* e recebendo o gene *dgRNA <sup>$\beta$ Tub,Sxl</sup>*, estas fêmeas sobreviventes tinham indels em mosaico no *locus Sxl* (n=2). Similarmente, com referência às Figuras 1G e 3A-3B, toda a progênie macho que herdou somente os genes *dgRNA* (N=36, n=1490), e tinha proteína *Cas9* carregada maternalmente, era fértil para todas as cepas *Cas9* indicadas, embora cada macho genotipado (n=6) tivesse indels em mosaico no *locus  $\beta$ Tub*. De acordo com algumas modalidades da presente exposição, como mostrado em Figura 3D, herança paternal de um polinucleotídeo guia (por exemplo, um gRNA) junto com deposição maternal da endonuclease (por exemplo, *Cas9*) em embriões em desenvolvimento, na ausência de *Cas9* herdada como um gene, é suficiente para induzir mosaicismos bialélicos detectáveis.

[00102] **Exemplo 4.** Machos pgSIT sexualmente competem para acasalamentos e sua sobrevivência não é reduzida. Com referência à Figura 4A, a fim de avaliar a aptidão global e ao acasalamento de machos pgSIT tendo nocautes precisos dos únicos genes requeridos para uma viabilidade específica de fêmea e amadurecimento de espermátides, um teste de competição ao acasalamento foi implementado e as curvas de sobrevivência estimadas foram calculadas. Com referência às Figuras 4B-4C, pgSIT- machos gerados foram capazes de cortejar, acasalar e competir com sucesso com os machos *wt*. Com referência contínua às Figuras 4B-4C, a taxa de eclosão de ovos observada e reduzida de 47,9%±13,8% para um macho *wt* junto com um pgSIT versus 85,1%±13,5% para dois machos *wt* (N=5,  $P>0,003$ ) ou 87,6%±7,2% para um macho *wt* (N=5,  $P>0,001$ ) foi consistente

com uma competitividade de acasalamento de 78% para machos pgSIT relativos aos machos *wt*. Com referência à Figura 4D, longevidade (por exemplo, duração de vida) não foi comprometida em machos pgSIT como comparado com machos *wt*. Além disso, Lin e Potter, G3 (2016) doi:10.1534/g3.116.034884, relataram que Cas9 matematicamente depositada é conhecida como afetando o fenótipo de progênie, dois tipos de machos pgSIT --um com Cas9 paternal e o outro com Cas9 matematicamente herdadas --foram considerados separadamente. Com referência às Figuras 4D-4E, o tempo de sobrevivência mediano para machos *wt* foi estimado como  $32,3 \pm 1,3$  dias ( $N=5$ ,  $n=275$ ) enquanto que os tempos de sobrevivência mediados de machos pgSIT foram  $52,7 \pm 1,6$  ( $N=5$ ,  $n=220$ ) e  $53,7 \pm 0,9$  dias ( $N=5$ ,  $n=275$ ) para machos carregando Cas9 paternal e Cas9 matematicamente, respectivamente. Com referência à Figura 4D, ambos estes machos pgSIT Cas9 sobreviveram de um modo mais longo significativo do que os machos *wt* ( $P < 2,2^{-16}$ ), enquanto nenhuma diferença significativa foi identificada entre a duração de vida (tempo de sobrevivências medido em dias) para estes dois tipos de machos pgSIT. Considerando de modo diferente, tempos de sobrevivência medianos foram relatados para machos *Drosophila* tipo selvagem, por exemplo, 35,5 dias (relatado em Tatar et al., Science 292, 107–110 (2001) e 57 dias (relatado em Clancy et al., Science 292, 104–106 (2001) e Lin et al., Science 282, 943–946 (1998)), condições de criação, tal como composição do alimento, temperatura, etc., são conhecidas como afetando o tempo de sobrevivência. Como o tempo de sobrevivência mediano de machos pgSIT é comparável ao tempo de sobrevivência mais longo relatado para machos *wt* e que os machos pgSIT mostram uma competitividade de acasalamento de 78%, nem a sobrevivência (por exemplo, duração de vida) nem a competitividade de acasalamento é comprometida nos insetos machos pgSIT geneticamente engenheirados produzidos de acordo com métodos da presente exposição.

**Exemplo 5.** Potencial de pgSIT para suprimir ou reduzir as populações de mosquito ultrapassa o dos métodos correntes.

[00103] Para avaliar como as metodologias de pgSIT da presente exposição se comparam com tecnologias de supressão ou redução de auto-limitação atualmente

disponíveis (por exemplo, RIDL, fsRIDL e IIT), esquemas de liberação foram simulados para cada uma destas tecnologias usando a estrutura de simulação MGDrivE como descrito em Sanchez et al., (2018), doi:10.1101/350488, cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Esta estrutura de simulação modela os estágios de vida de ovo, larval, pupal, e adulto do mosquito com sobreposição de gerações, mortalidade larval aumentando com densidade larval, e uma estrutura de acasalamento em que fêmeas retêm o material genético do macho adulto com os quais elas se acasalam durante a duração de sua vida adulta. Com referência à tabela em Figura 4F, a estrutura de simulação foi programada para liberações em uma população aleatoriamente misturada consistindo de 10.000 mosquitos fêmeas adultas, com parâmetros de intervenção e modelo como indicado.

[00104] Com referência às Figuras 4F-4G, liberações semanais de machos adultos foram simuladas para RIDL e IIT e ovos foram simulados ou fsRIDL e pgSIT durante um período de 6 meses. As razões de liberação de adultos foram 10 machos adultos RIDL/IIT por adulto selvagem, seguindo o precedente de uma experiência no campo de mosquitos RIDL de *Ae. aegypti* no Brasil, como descrito em Carvalho et al., (2015) (*supra*), e razões de liberação de ovos foram 200 ovos por adulto selvagem, dado que as fêmeas de *Aedes (Ae) aegypti* produzem aproximadamente 20 ovos por dia em climas temperados, como descrito em Otero et al., 2006 (*supra*). Resultados a partir destas simulações sugerem que sistemas para os quais ovos são liberados (por exemplo, pgSIT e fsRIDL) resultaram em uma supressão ou redução da população a mais rápida nas primeiras três semanas, como os ovos liberados rapidamente eclodem como larvas e reduzem a sobrevivência de larvas férteis, como uma consequência de competição larval dependente da densidade. A abordagem pgSIT mostra a maior supressão ou redução a partir do final do primeiro mês, e o maior potencial para eliminar a população durante o período de liberação. Isto é devido à maior competitividade de acasalamento de machos pgSIT (78% da dos machos *wt*) machos c.f. fsRIDL (aproximadamente 5% da dos machos *wt*, com base em experiência no campo RIDL nas Ilhas Cayman e Brasil) (Harris et al., 2011 e Carvalho et al., 2015, respectivamente) (*supra*), que se torna um fator dominante em baixas

densidades de população quando maior consumo de recursos larvais por formas imaturas liberadas tem um menor impacto na supressão ou redução. A supressão ou redução da população resultante de liberações 10:1 de machos RIDL adultos aponta, como caminho, liberações de ovos fsRIDL por 2 a 3 semanas devido ao retardo em impacto sobre a competição larval dependente de densidade; mas é similar em grandeza. Liberações equivalentes de machos IIT adultos são menos impactantes para a estratégia simulada porque a incompatibilidade do macho é induzida através de infecção *Wolbachia* e a possibilidade de uma liberação não pretendida de fêmeas infectadas por *Wolbachia* interferindo com supressão ou redução é reduzida por meio de irradiação de baixo nível, como relatado em Zhang et al., 2015<sup>1</sup> e Zhang et al., 2015<sup>2</sup> (*supra*), resultando na longevidade de machos IIT liberados sendo, grosseiramente, dividida ao meio, como relatado em Yamada et al., 2014 (*supra*).

#### **Exemplo 6. Materiais e métodos.**

[00105] **Projeto de sítio alvo CRISPR.** Para conferir letalidade de fêmeas e esterilidade de macho, sítios alvo para RNA guias (gRNAs) foram escolhidos dentro de éxons específicos de fêmea de genes de determinação de sexo, Sexo letal (Sxl), Transformador (tra), e Sexo duplo (dsx), e genes específicos de macho,  $\beta$ Tubulina 85D ( $\beta$ Tub), 'fuzzy onions' (fzo), Protamina A (ProA), e parada de espermátocitos (sa), respectivamente. CHOPCHOP v2 (como descrito em Labun et al., Nucleic Acids Res. 44, W272–6 (2016), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência) foi usado para escolher sítios de gRNA alvo a partir de sequência especificada no genoma de *Drosophila* (dm6) para minimizar a clivagem fora do alvo. Devido à emenda alternativa, proteínas funcionais Sxl e Tra são produzidas somente em *Drosophila* fêmeas, enquanto duas versões de proteínas Dsx – fêmea (Dsx<sup>F</sup>) ou macho (Dsx<sup>M</sup>) – são feitas, cada, no gênero correspondente, como mostrado em Figura 1B. O gRNA alvo para  $\beta$ Tub foi escolhido na proximidade do alelo mutante  $\beta$ Tub85D<sup>D</sup> (B2t<sup>D</sup>), como relatado em Kempthues et al., Cell 21, 445–451 (1980) (*supra*). Sequências de sítios alvo de gRNA são apresentados em Figura 1C.

[00106] **Projeto e montagem de construtos.** O método de montagem enzimática de Gibson foi usado para construir todos os construtos, como descrito em

Gibson et al., Nat. Methods 6, 343–345 (2009), cujo conteúdo completo é incorporado por referência. O plasmídeo previamente descrito abrigando o SpCas9-T2A-GFP com sinais de localização nuclear (NLS) flanqueando sequência de codificação de SpCas9 e o marcador de transformação Opie2-dsRed foi usado para construir os construtos Cas9 de *Drosophila* usados aqui. Este plasmídeo foi usado para transgenese de *Ae. aegypti* e tinha ambos os sítios piggyBac e uma ancoragem attB (Addgene #100608), como descrito em Li et al., (2017) doi:10.1101/156778. O promotor de *Ae. aegypti* foi removido do plasmídeo por corte nos sítios NotI & XhoI e sua substituição com promotor Nanos (nos), ou Ubiquitina-63E (Ubi), ou Vasa (vas), como mostrado esquematicamente em Figura 1C. Os fragmentos de promotor foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *Drosophila* usando os seguintes iniciadores: nos-F, nos-R, Ubi-F, Ubi-R, vas-F, e vas-F, como listados em tabela 1. Para gerar construtos com um único gRNA, promotor de *Drosophila* U6-3 e RNA guia com um alvo, andaime, e sinal de terminador, (gRNA) foi clonado no sítio de clonagem múltiplo (MCS) entre o gene branco e um sítio de ancoragem de attB dentro de um plasmídeo usado para transformação de *D. melanogaster*, como descrito em Akbari et al., Curr. Biol. 23, 671–677 (2013), cujo conteúdo completo é incorporado por referência. Para o primeiro plasmídeo nesta série, U6-3-gRNA<sup>βTub</sup>, promotor de *Drosophila* U6-3 foi amplificado a partir de DNA genômico de *Drosophila* com iniciadores U6-1F e U6-2R enquanto o gRNA completo foi montado por PCR a partir de dois oligos ultramer® gRNA-3F e gRNA-4R sintetizados por Integrated DNA Technology (IDT). Para melhorar a eficiência de terminação de transcrição de gRNA, um sinal de terminação com 11 timinas foi usado no projeto dos requerentes. Nos plasmídeos sucessivos, o promotor U6-3 e andaime de gRNA's foram amplificados a partir de plasmídeo U6-3-gRNA<sup>βTub</sup> usando os oligos do meio de sobreposição projetados para substituir 20 bases que constituem um gRNA alvo (U6-1AF, U6-2A/B/CR, gRNA-3A/B/CF, e gRNA-4AR), e substituídos por digestão do mesmo plasmídeo nos sítios AscI e NotI. Para montar o conjunto de plasmídeos com gRNAs duplos (dsRNAs), o promotor U6-3 e gRNA foram amplificados como um fragmento a partir dos plasmídeos gRNA único (sgRNA) tendo como alvo genes de determinação de sexo de fêmea com iniciadores

2XgRNA-5F e 2XgRNA-6R, e clonados dentro do plasmídeo U6-3-gRNA <sup>$\beta$ Tub</sup> que foi linearizado em um sítio BamHI entre o gene branco e o promotor U6-3. Cada plasmídeo dgRNA tinha o mesmo gRNA <sup>$\beta$ Tub</sup> tendo como alvo  $\beta$ Tub85D e um gRNA diferente tendo como alvo Sxl, tra, ou dsxF expressados independentemente na mesma direção, como mostrado em Figura 1C. Com referência à Figura 1C, plasmídeos Cas9 de *Drosophila* e plasmídeos gRNA gerados para este estudo foram depositados em Addgene. Para construir o construto  $\beta$ Tub85D-GFP, um fragmento de 481bp diretamente a montante de sequência de codificação de  $\beta$ Tub foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *Drosophila* com iniciadores  $\beta$ Tub-F e  $\beta$ Tub-R e clonado a montante de GFP no plasmídeo de sítio de ancoragem de attB branco descrito acima.

Tabela 1. Sequências de iniciador (*primer*)

[00107] **Genética e imagem de moscas.** Moscas foram mantidas sob condições padrões a 25°C. As injeções de embriões foram realizadas em Rainbow



Transgenic Flies, Inc. (<http://www.rainbowgene.com>). Com referência às Figura 1C, os construtos Cas9 e gRNA foram inseridos em PBac{y+-attP-3B}KV00033 no terceiro cromossomo (Bloomington #9750) e o P{CaryP}attP1 no segundo cromossomo (Bloomington #9750), respectivamente; enquanto construto  $\beta$ Tub-GFP foi inserido em M{3XP3-RFP.attP'}ZH-86Fa no terceiro cromossomo (Bloomington #24486). As moscas transgênicas foram balanceadas com w<sup>1118</sup>; CyO/snaSco e w<sup>1118</sup>; TM3, Sb<sup>1</sup>/TM6B, Tb<sup>1</sup>; e balanceadas de modo duplo com w<sup>1118</sup>; CyO/Sp; Dr<sup>1</sup>/TM6C,Sb,Tb<sup>1</sup>. O  $\beta$ Tub-GFP (no terceiro cromossomo) foi balanceado de modo e introgressado com gRNA <sup>$\beta$ Tub,Sxl</sup>, gRNA <sup>$\beta$ Tub,Tra</sup>, e gRNA <sup>$\beta$ Tub,Dsx<sup>F</sup></sup>, cada um no segundo cromossomo, para gerar estoques balanceados trans-heterozigóticos (dgRNA/CyO;  $\beta$ Tub-GFP/TM6C,Sb,Tb).

[00108] Para testar a eficácia de nocautes e fenótipos correspondentes causados por sgRNAs, sete moscas de cada gênero foram cruzadas para gerar moscas F1 trans-heterozigóticas sgRNA/+; nos-Cas9/+ para cada combinação de sgRNA; e sua morfologia e fertilidade externas foram examinadas. Ambos os transgenes foram identificados em um microscópio estereo fluorescente com lentes w<sup>+</sup> (sgRNA, dgRNA) e dsRed (Cas9). As linhagens sgRNA que causaram fenótipos de nocaute foram testadas adicionalmente como estoques homozigóticos com moscas nos-Cas9 em ambas as direções usando 10 moscas ♂ e 10 ♀ para cada cruzamento de réplica. As linhagens de DgRNAs foram testadas bidirecionalmente com linhagens homozigóticas nos-Cas9, vas-Cas9, e Ubi-Cas9s. Além disso, as linhagens sgRNA, dgRNA e Cas9 homozigóticas foram cruzadas para moscas w<sup>-</sup> em ambas as direções para fornecer o controle de comparação. Para testar o efeito maternal dominante não mendeliano de Cas9 carregado como proteína em embriões, como descrito em Lin e Potter, G3 (2016) doi:10.1534/g3.116.034884, moscas homozigóticas dgRNA foram cruzadas com moscas heterozigóticas Cas9; e fenótipos de progênie dgRNA/+; +/TM3, Sb com ou Cas9 maternal ou Cas9 paternal foram comparados. A progênie F1 de cruzamentos com a Cas9 paternal serviu como um grupo de controle para examinar o efeito maternal dominante de Cas9. Para testar a fertilidade de moscas nocautes geradas com e sem o gene de Cas9, lotes de 10-20

machos e fêmeas F1, ou intersexos, foram cruzados com 15-20 moscas fêmeas virgens e machos, correspondentemente, de estoques w- e/ou Cantos S. Três ou quatro dias após o cruzamento, as moscas foram passadas para frasquinhos novos e, em uma semana, ambos os frasquinhos foram examinados para a presença de qualquer progênie viável. A fertilidade de um lote completo foi pontuada como 100% quando larvas viáveis foram identificadas em um frasquinho, ou 0% quando nenhuma progênie eclodiu em ambos os frasquinhos. Os frasquinhos contendo intersexos e machos wt foram também examinados para a presença de ovos postos. Todos os cruzamentos foram repetidos no mínimo três vezes para gerar médias e desvios padrões para comparações estatísticas e, assim, medição da consistência e robustez dos resultados.

[00109] Moscas foram pontuadas, examinadas, e fotografadas em um microscópio estereo fluorescente Leica M165FC equipado com a câmera Leica DMC2900. Para gerar imagens de moscas adultas, pilhas de imagens coletadas em diferentes placas focais foram compiladas em imagens únicas no Helios Focus 6 e editadas no Adobe Photoshop CS6. Para estudar as características anatômicas internas de moscas intersexuais e machos estéreis, seus órgãos reprodutivos foram dissecados em tampão PBS, examinados e fotografados. Para estimar a variação dos fenótipos de nocaute, em torno de 10 a 20 moscas foram dissecadas para cada genótipo testado.

[00110] **Estágio desenvolvimental de letalidade Sxl.** Para identificar o estágio desenvolvimental em que as fêmeas nocautes Sxl morrem, taxas de eclosão de ovos e mortes larvais foram quantificadas para as moscas trans-heterozigóticas  $dgRNA^{\beta Tub, Sxl}/+$ ; nos-Cas9/+. Para quantificar a taxa de eclosão de ovos, três cruzamentos de réplica, cada com 20-30 fêmeas virgens homozigóticas nos-Cas9 e 10-20 machos  $dgRNA^{\beta Tub, Sxl}$ , foram alojados em caixas de coleta de embriões (Genesee Scientific 59-100) com placas de agar de suco de uva. Três caixas de coleta de embriões com moscas w- serviram como um controle de comparação. Lotes de em torno de 200 ovos postos foram contados de cada caixa de coleta e seguidos por mais 36 horas para contar o número de ovos não eclodidos. Para quantificar a taxa de morte

larval, dois lotes de 50 larvas emergidas foram transferidos de cada placa de agar para separar frasquinhos com moscas com alimentos e criadas até ficarem adultas, então um número e sexo dos adultos emergidos foram registrados. Para quantificar a letalidade em um estágio pupal, um número de pupas mortas foi também registrado para cada frasquinho. Dados para a taxa de eclosão e letalidade pupal de fêmeas de embriões  $gRNA^{(\beta Tub.Sxl)/+}; nos-Cas9/+$  são apresentados em tabela 2 e tabela 3, respectivamente.

Tabela 2. Taxa de eclosão de  $gRNA^{(\beta Tub.Sxl)/+};$  embriões  $nos-Cas9/+$ .

Tabela 3. Letalidade pupal de fêmeas em embriões  $gRNA^{(\beta Tub.Sxl)/+}; nos-Cas9/+$ .

[00111] **RT-PCR de transcritos de emenda específicos de fêmea e macho de Dsx.** Para avaliar o efeito do nocaute *tra* em emenda *dsx*, os requerentes triaram mRNA específico de fêmea e macho de *dsx* em intersexos de nocaute *tra*. RNA total foi extraído de moscas intersexo adultas macho w<sup>-</sup>, fêmea w<sup>-</sup>, e nocaute *tra* ( $dgRNA^{\beta Tub, Tra}/+; nos-Cas9/+$ ) seguindo o protocolo padrão do kit de isolamento de miRNA MirVana (Ambion). Para remover a contaminação de DNA, 2 µg foram tratados com TURBO™ DNase usando o kit TURBO DNA-free™ (Ambion). As variantes de emenda fêmea e macho *Dsx* foram amplificadas com o kit SuperScript® III One-Step RT-PCR (Invitrogen) seguindo o protocolo. O mesmo iniciador dianteiro, Dsx-RT-1F, e dois diferentes iniciadores reversos, DsxF-RT-2R e DsxM-RT-3R (Tabela 1) foram

usados para amplificar os transcritos ou de fêmea ou macho, respectivamente. 10 µL de produtos PCR foram ciclados em um gel agarose a 1% para testar a especificidade de PCR, e os restantes 40 µL foram purificados usando um kit de purificação PCR QIAquick (QIAGEN) ou, quando bandas duplas foram identificadas em um gel, purificados com gel com um kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research), então os amplicons limpos foram sequenciados em ambas as direções usando o método de Sanger em Source BioScience (<https://www.sourcebioscience.com>).

[00112] **Locí de genotipagem alvo-dirigidos com gRNAs.** Para examinar as mudanças moleculares que causaram letalidade de fêmeas ou masculinização e esterilidade de macho nas moscas carregando *Cas9* e *gRNAs*, quatro *loci* genômicos que incluem sítios alvos para quatro *gRNAs* funcionais (Figura 1C) foram amplificados e sequenciados. Preparações de DNA genômico de mosca única foram preparadas por homogeneização de uma mosca em 30 µl de um tampão de aspersão por jato recentemente preparado (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/mL Proteinase K), incubando a 37°C durante 35 minutos, e aquecendo a 95°C durante 2 minutos. 2 µl de DNA genômico foram usados como gabarito em uma reação de PCR de 40 µL com LongAmp® Taq DNA Polymerase (NEB). Os seguintes iniciadores (Tabela 1) foram usados para amplificar o *loci* com os alvos de gRNA correspondentes: βTub-1AF e βTub-2AR para *βTubulina 85D*; Sxl-3BF e Sxl-4AR para *Sexo letal*; Tra-5F e Tra-6R para *Transformador*; Dsx-7F e Dsx-8R para *Duplo sexo*. Produtos PCR foram purificados usando um kit de purificação PCR QIAquick (QIAGEN), e sequenciados em ambas as direções com método Sanger em Source BioScience. Para caracterizar as mudanças moleculares nos sítios alvo-dirigidos, os arquivos de sequência AB1 foram alinhados contra as sequências de referência correspondentes em SnapGene® 4 e / ou Sequencher™ 5.

[00113] **Teste de competição de machos estéreis.** Para avaliar a competitividade dos machos nocaute *βTub* (*gRNA<sup>βTub,Sxl/+</sup>; nos-Cas9/+*), sua capacidade para manter os acasalamentos com fêmeas na presença de machos *wt* foi avaliada. Os machos *w-* compartilham o mesmo fundo genético com os machos nocaute *βTub*, e forneceram uma comparação ideal. Dois nocautes *wt*, um *wt*, um *wt*

mais um  $\beta Tub$ , ou dois machos nocautes  $\beta Tub$  foram colocados em um frasquinho de moscas com dez virgens *w*- isoladas em pasta de levedura durante dois dias e deixadas cortejar e acasalar com as fêmeas durante a noite (12 horas) no escuro. Para aumentar o desejo ao namoro do macho, machos  $dgRNA^{\beta Tub, Sxl/+}$ ;  $nos-Cas9/+$  e *wt* recentemente emergidos foram isolados das fêmeas e envelhecidos durante quatro dias antes do ensaio de competição. As fêmeas *Drosophila* acasalam com machos múltiplos durante uma duração de vida; e na ausência de esperma transferido para espermoteca após a copulação, a abstinência da fêmea dura por um dia após a copulação, como descrito em Peng et al., Curr. Biol. 15, 207–213 (2005), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Assim, após 12 horas de acasalamento, todos os machos foram removidos dos frasquinhos enquanto as fêmeas foram transferidas para caixas de coleta de embriões pequenos (Genesee Scientific 59-100) com placas de agar de suco de uva. Três lotes de ovos foram coletados em 36 horas e ovos não eclodidos foram contados. A diminuição em fertilidade, estimada por um número de ovos não eclodidos, indicou a capacidade de um macho  $gRNA^{\beta Tub, Sxl/+}$ ;  $nos-Cas9/+$  de pontuar acasalamentos com sucesso com fêmeas na presença de um macho *wt*, e assim forneceu uma leitura da competitividade de machos nocautes  $\beta Tub$ . Um único macho *wt* foi usado para testar sua capacidade de inseminar cada uma de dez fêmeas em 12 horas e, assim, discriminar entre uma competição verdadeira ou um efeito de diluição de dois machos *wt*.

[00114] **Curvas de sobrevivência para estimar longevidade de machos pgSIT.** Para comparar diferenças em sobrevivência entre machos pgSIT ( $gRNA^{\beta Tub, Sxl/+}$ ;  $nos-Cas9/+$ ) e *wt*, longevidades médias para três grupos experimentais de machos foram estimadas. Dois tipos de moscas pgSIT foram tratados como grupos experimentais separados-- um carregando Cas9 paternal e o ou Cas9 maternal. Cinco réplicas por cada de três grupos foram aplicadas para estimar curvas de sobrevivência. Machos de cada tipo foram coletados diariamente e envelhecidos em lotes de 20 machos por frasquinho. Cada réplica tinha de 40 a 75 machos mantidos em 2 ou 4 frasquinhos, respectivamente. Números de moscas mortas foram registrados a cada terceiro dia durante a transferência de moscas em

um novo frasquinho com alimento fresco. Os dados do tempo examinado do intervalo até o evento (por exemplo, morte) foram analisados para os três grupos experimentais para computação das estimativas de possibilidade máxima não paramétricas (NPMLE) das curvas de sobrevivência para cada grupo, implementadas no “intervalo” do pacote R, como descrito em Fay et al., J. Stat. Softw. 36, (2010), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. O procedimento de estimativa leva em conta a incerteza introduzida no período de observação de três dias. Uma inicialização “bootstrap” com 10.000 repetições foi aplicada para quantificar o tempo de sobrevivência mediano e o desvio padrão.

[00115] **Modelagem matemática.** Para modelar o desempenho esperado de pgSIT para suprimir ou reduzir as populações locais de *Ae. aegypti* em comparação com as tecnologias de supressão ou redução de auto-limitação atualmente disponíveis - RIDL, fsRIDL e IIT - \ esquemas de liberação foram simulados para cada usando a estrutura de simulação MGDriVE como descrito aqui e em Sanchez et al., 2018, doi:10.1101/350488 (<https://marshalllab.github.io/MGDriVE/>), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Os modelos de estrutura de estágios de vida do mosquito ovo, larval, pupal e adulto (ambos adultos macho e fêmea são modelados) implementando uma etapa de tempo diário, sobrepondo gerações e uma estrutura de acasalamento em que machos adultos acasalam durante todo seu tempo de vida, enquanto fêmeas adultas acasalam uma vez por emergência, retendo o material genético do macho adulto com quem elas se acasalam durante a duração de sua vida adulta. Taxas de mortalidade independentes de densidade para os estágios de vida juvenil são assumidas como sendo idênticas e são escolhidas por consistência com a taxa de crescimento da população na ausência de mortalidade dependente de densidade. A mortalidade dependente de densidade adicional ocorre no estágio larval, cuja forma é retirada de Deredec *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, E874–80 (2011), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Os padrões de herança para os sistemas pgSIT, RIDL, fsRIDL e IIT são modelados dentro do módulo de herança da estrutura MGDriVE <https://paperpile.com/c/cKXxhc/fx0P6> como descrito em Sanchez et al., 2018, doi:10.1101/350488, junto com seus impactos na duração

de vida adulta, competitividade do acasalamento de macho e sucesso pupatório. A versão estocástica da estrutura MGD<sub>DrivE</sub> foi implementada para capturar os efeitos aleatórios em tamanhos de população pequena e o potencial para a eliminação da população. Liberações semanais foram simulados durante um período de 6 meses em uma população aleatoriamente misturada consistindo de 10.000 fêmeas adultas em equilíbrio, com o histórico de vida de *Ae. aegypti* e os valores de parâmetro de intervenção listados na tabela em Figura 4F.

[00116] **Análise estatística.** Análise estatística foi realizada em JMP 8.0.2 por SAS Institute Inc. Três a cinco réplicas biológicas foram usadas para gerar meios estatísticos para comparações. Os valores *P* foram calculados para um teste *t* de Student de duas amostras, com variância desigual. Para testar significância de esterilização de macho, teste de Chi-quadrado de Pearsones para tabelas de contingência foram usados para calcular valores *P*. Para testar diferenças entre as curvas deduzidas de sobrevivência, os requerentes usaram a generalização de Sun do teste de classificação logarítmica como descrito em Sun, Stat. Med. 15, 1387–1395 (1996), cujo conteúdo completo é incorporado aqui por referência. Além disso, os requerentes realizaram testes de diferenças *post-hoc* à feição de pares entre os dois grupos de pgSIT com correção conservativa de Bonferroni.

[00117] **Dados depositados.** Sequências de plasmídeo e DNA plasmídeo anotadas completas se encontram disponíveis para o público por solicitação em Addgene. Moscas transgênicas podem se tornar disponível por solicitação ao centro Bloomington de estoque de *Drosophila*.

[00118] Embora a presente exposição tenha sido ilustrada e descrita com referência a algumas modalidades exemplares, a pessoa versada na técnica irá entender que várias modificações e mudanças podem ser feitas nas modalidades descritas sem sair do espírito e escopo da presente exposição, como definida nas seguintes reivindicações.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de dirigir sexagem de macho em uma progênie de insetos geneticamente modificados, o método caracterizado pelo fato de que compreende:

a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico em um genoma de um primeiro inseto, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico compreendendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea;

a introdução de uma endonuclease em um segundo inseto, o segundo inseto sendo capaz de ser geneticamente cruzado com o primeiro inseto; e

o cruzamento genético do primeiro inseto e do segundo inseto produzindo, assim, progênie compreendendo a endonuclease e a pelo menos uma sequência de ácido nucleico a partir da qual ovos de insetos machos amadurecem até a idade adulta.

2. Método de produzir uma progênie geneticamente modificada de ovo de inseto macho estéril, caracterizado pelo fato de que compreende o método, conforme definido com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma sequência de ácido nucleico compreende adicionalmente pelo menos um segundo polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica de esterilidade de macho que é requerida para fertilidade específica de macho, em que o cruzamento genético do primeiro inseto e do segundo inseto produz uma progênie de ovos de insetos machos estéreis.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico no genoma do primeiro inseto compreende integração homozigótica em todas as cópias de cromossomo no genoma.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico compreende a introdução de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico no primeiro inseto durante um estágio embriônico.



5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia e o pelo menos um segundo polinucleotídeo guia compreendem, cada, pelo menos, um ácido ribonucleico guia (gRNA).

6. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência genômica essencial de fêmea compreende um gene essencial para uma viabilidade específica de fêmea ou um éxon específico de fêmea essencial para desenvolvimento específico de fêmea e/ou viabilidade específica de fêmea.

7. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia compreende mais do que um primeiro polinucleotídeo guia cada um dos quais tem como alvo uma região diferente da mesma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea.

8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia compreende mais do que um primeiro polinucleotídeo guia cada um dos quais tem como alvo uma diferente sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea.

9. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência genômica essencial de fêmea é um gene ou uma variante de emenda de um gene, o gene selecionado dentre o grupo consistindo em sexo letal (Sxl), transformador (Tra), sexo duplo (Dsx), homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos, parálogos dos mesmos, e combinações dos mesmos.

10. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia compreende mais do que um primeiro polinucleotídeo guia cada um dos quais tem como alvo um gene diferente selecionado dentre o grupo consistindo em Sxl, Tra, Dsx, homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos, e parálogos dos mesmos.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o mais do que um primeiro polinucleotídeo guia compreende dois primeiros

polinucleotídeos guias cada um dos quais tem como alvo um gene diferente selecionado dentre o grupo consistindo em Sxl, Tra, Dsx, homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos, e parálogos dos mesmos.

12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o mais do que um primeiro polinucleotídeo guia compreende dois primeiros polinucleotídeos guias cada um dos quais tem como alvo um gene diferente selecionado dentre o grupo consistindo em Sxl, Dsx, homólogos dos mesmos, ortólogos dos mesmos, e parálogos dos mesmos.

13. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a sequência genômica de esterilidade de macho é um gene selecionado dentre o grupo consistindo em  $\beta$ Tubulina 85D ( $\beta$ Tub), 'fuzzy onions' (Fzo), protamina A (ProtA), e parada de espermátocitos (Sa).

14. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que : quando o segundo inseto é um macho, a introdução da endonuclease no segundo inseto compreende integrar homozigoticamente um gene codificando a endonuclease e, quando o segundo inseto é uma fêmea, a introdução da endonuclease no segundo inseto compreende integrar homozigoticamente ou heterozigoticamente um gene codificando a endonuclease ou depositando uma proteína endonuclease no segundo inseto.

15. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a introdução de uma endonuclease em um segundo inseto compreende introduzir a endonuclease no segundo inseto durante um estágio embriônico.

16. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a endonuclease compreende uma endonuclease de sequência associada a CRISPR 9 (Cas9) ou uma variante da mesma, uma endonuclease de sequência associada a CRISPR 13 (Cas13) ou uma variante da mesma, uma endonuclease de sequência associada a CRISPR 6 (Cas6) ou uma variante da mesma, uma endonuclease de CRISPR de *Prevotella* e *Francisella* 1 (Cpf1) ou uma variante da mesma, ou uma endonuclease de CRISPR de *Microgenomates* e *Smithella* 1 (Cms1) ou uma variante da mesma.

17. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a endonuclease compreende uma Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), uma Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), uma Cas9 de *Francisella novicida* (FnCas9), ou uma variante das mesmas.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a variante da mesma compreende uma SpCas9 de motivo adjacente de protoespaçador (PAM) (xCas9), SpCas9 de alta fidelidade (SpCas9-HF1), uma SaCas9 de alta fidelidade, ou uma FnCas9 de alta fidelidade.

19. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a endonuclease compreende uma nuclease de fusão de Cas compreendendo uma proteína Cas9 ou uma variante da mesma fusionada com uma FokI nuclease ou variante da mesma.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a variante da mesma compreende uma Cas9 cataliticamente inativa (Cas9 morta).

21. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a endonuclease é uma Cas9, Cas13, Cas6, Cpf1, proteína CMS1 ou qualquer variante da mesma deriva de *Methanococcus maripaludis* C7, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium efficiens* YS-314, *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium kroppenstedtii* (DSM 44385), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Nocardia farcinica* IFM10152, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Rhodococcus opacus* B4 (uid36573), *Acidothermus cellulolyticus* 11B, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Kribbella flavida* (DSM 17836, uid43465), *Thermomonospora curvata* (DSM43183), *Bifidobacterium dentium* Bd1, *Bifidobacterium longum* DJO10A, *Slackia heliotrinireducens* (DSM 20476), *Persephonella marina* EX H1, *Bacteroides fragilis* NCTC 9434, *Capnocytophaga ochracea* (DSM 7271), *Flavobacterium psychrophilum* JIP02 86, *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA 835), *Roseiflexus castenholzii* (DSM 13941), *Roseiflexus* RS1, *Synechocystis* PCC6803, *Elusimicrobium minutum* Pei191, filotipo RsD17 de bactéria de grupo 1 de Térmitas não cultivadas, *Fibrobacter succinogenes* S85,

*Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Listeria innocua*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Streptococcus agalactiae*-5-A909, *Streptococcus agalactiae* NEM316, *Streptococcus agalactiae* 2603, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* GGS 124, *Streptococcus equi zooepidemicus* MGCS10565, *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (uid46061), *Streptococcus gordonii* Challis subst CH1, *Streptococcus mutans* NN2025 (uid46353), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, *Streptococcus pyogenes* MGAS5005, *Streptococcus pyogenes* MGAS2096, *Streptococcus pyogenes* MGAS9429, *Streptococcus pyogenes* MGAS10270, *Streptococcus pyogenes* MGAS6180, *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus pyogenes* SSI-1, *Streptococcus pyogenes* MGAS10750, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Streptococcus thermophiles* CNRZ1066, *Streptococcus thermophiles* LMD-9, *Streptococcus thermophiles* LMG 18311, *Clostridium botulinum* A3 Loch Maree, *Clostridium botulinum* B Eklund 17B, *Clostridium botulinum* Ba4 657, *Clostridium botulinum* F Langeland, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Fingoldia magna* (ATCC 29328), *Eubacterium rectale* (ATCC 33656), *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma mobile* 163K, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma synoviae* 53, *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112), *Bradyrhizobium* BTAi1, *Nitrobacter hamburgensis* X14, *Rhodopseudomonas palustris* BisB18, *Rhodopseudomonas palustris* BisB5, *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1, *Dinoroseobacter shibae*. DFL 12, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 FAPERJ, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 JGI, *Azospirillum* B510 (uid46085), *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170), *Diaphorobacter* TPSY (uid29975), *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2, *Neisseria meningitidis* 053442, *Neisseria meningitidis* alpha14, *Neisseria meningitidis* Z2491, *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638, *Campylobacter jejuni doylei* 269 97, *Campylobacter jejuni* 81116, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* RM2100, *Helicobacter hepaticus*, *Wolinella succinogenes*, *Tolomonas auensis* DSM 9187, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c, *Shewanella pealeana* (ATCC 700345), *Legionella pneumophila* Paris, *Actinobacillus succinogenes* 130Z, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis novicida* U112, *Francisella tularensis holarctica*, *Francisella*

tularensis FSC 198, Francisella tularensis tularensis, Francisella tularensis WY96-3418, ou Treponema denticola (ATCC 35405).

22. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o primeiro inseto e o segundo inseto são o mesmo inseto ou dois insetos diferentes capazes de acasalar e são de uma Ordem selecionada dentre o grupo consistindo em Diptera, Lepidoptera, ou Coleoptera.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o inseto é um mosquito dos gêneros Stegomyia, Aedes, Anopheles ou Culex.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que mosquito é selecionado dentre o grupo consistindo em Aedes aegypti, Aedes albopictus, Ochlerotatus triseriatus (Aedes triseriatus), Anopheles stephensi, Anopheles albimanus, Anopheles gambiae, Anopheles quadrimaculatus, Anopheles freeborni, espécie Culex, e Culiseta melanura.

25. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o inseto é selecionado dentre o grupo consistindo em: uma mosca da fruta tefritida selecionada dentre Medfly (Ceratitis capitata), Mexfly (Anastrepha ludens), mosca da fruta oriental (Bactrocera dorsalis), mosca da azeitona (Bactrocera oleae), mosca do melão (Bactrocera cucurbitae), mosca da fruta Natal (Ceratitis rosa), mosca da cereja (Rhagoletis cerasi), mosca da fruta Queensland (Bactrocera tyroni), mosca do pêssigo (Bactrocera zonata), mosca da fruta do caribe (Anastrepha suspensa), mosca da fruta oriental (Bactrocera dorsalis), mosca da fruta-das-índias ocidentais (Anastrepha obliqua), a larva da mosca-varejeira do Novo Mundo (Cochliomyia hominivorax), a larva da mosca-varejeira do Velho Mundo (Chrysomya bezziana), mosca de carne da ovelha australiana/mosca da garrafa verde (Lucilia cuprina), a lagarta rosa (Pectinophora gossypiella), a traça-cigana europeia (Lymantria dispar), o bicho-da-laranja Navel (Amyelois transitella), a broca do galho do pessegueiro (Anarsia lineatella), a broca da haste do arroz (Tryporyza incertulas), as traças noctuídes, Heliethinae, o besouro japonês (Papilla japonica), besouro de franja branca (Graphognathus spp.), gorgulho (Anthonomus grandis), o besouro da batata-do-colorado (Leptinotarsa decemlineata), a cochilha do vinho (Planococcus ficus),

psilídeo do cítrico asiático (*Diaphorina citri*), drosófila de asa manchada (*Drosophila suzukii*), cigarrinha verde-azul (*Graphocephala atropunctata*), cigarrinha de asa de vidro (*Homalodisca vitripennis*), traça da maçã marrom claro (*Epiphyas postvittana*), percevejo Bagrada (*Bagrada hilaris*), percevejo marmoreado marrom (*Halyomorpha halys*), traça-cigana asiática selecionada dentre o grupo de *Lymantria dispar* asiática, *Lymantria dispar japonica*, *Lymantria albescens*, *Lymantria umbrosa*, e *Lymantria postalba*, besouro de chifre longo asiático (*Anoplophora glabripennis*), besouro Rhinoceros do coco (*Oryctes rhinoceros*), broca cinza esmeralda (*Agrilus planipennis*), traça europeia da videira (*Lobesia botrana*), traça-cigana europeia (*Lymantria dispar*), mariposa falsa (*Thaumatotibia leucotreta*), formigas de fogo selecionadas dentre *Solenopsis invicta* Buren, e *S. richteri* Forel, lagarta do Velho Mundo (*Helicoverpa armigera*), mosca-lanterna manchada (*Lycorma delicatula*), Abelha africanizada (*Apis mellifera scutellata*), broca da fruta e broto (*Leucinodes orbonalis*), larva da raiz do milho (*Diabrotica* spp.), larva da raiz do milho ocidental (*Diabrotica virgifera*), mosca branca (*Bemisia tabaci*), mosca doméstica (*Musca Domestica*), mosca da garrafa verde (*Lucilia cuprina*), mosca da seda (*Bombyx mori*), aonidiela vermelha (*Aonidiella aurantia*), verme do coração do cachorro (*Dirofilaria immitis*), besouro do pinheiro do sul (*Dendroctonus frontalis*), tripses do abacate (*Thysanoptera* Spp.), larva de mosca selecionada dentre *Oestridae* spp. e *Dermatobia hominis*), mosca do cavalo (*Tabanus sulcifrons*), mosca do chifre (*Haematobia irritans*), larva da mosca varejeira selecionada dentre *Cochliomyia macellaria* (*C. macellaria*), *C. hominivorax*, *C. aldrichi*, ou *C. minima*, mosca Tsetse (*Glossina* spp.), mosca do berne selecionada dentre *Hypoderma bovis* ou *Hypoderma lineatum*, mosca-da-lanterna com manchas (*Lycorma delicatula*), besouro Khapra (*Trogoderma granarium*), ácaro da abelha de mel (*Varroa destructor*), Térmitas (*Coptotermes formosanus*), adelgíd lanoso da cicuta (*Adelges tsugae*), besouro do galho da noqueira (*Pityophthorus juglandis*), vespa de madeira europeia (*Sirex noctilio*), lagarta de mancha rosada (*Pectinophora scutigera*), ácaro de duas manchas (*Tertanychus urticae*), traça de dorso diamante (*Plutella xylostella*), lagarta Taro (*Spodoptera litura*), besouro da farinha vermelha (*Tribolium castaneum*),

afídeo do pêssego verde (*Myzus persicae*), afídeo do algodão (*aphis gossypii*), gafanhoto marrom (*nilaparvata lugens*), minhoca da beterraba (*spodoptera exigua*), tripes da flor ocidental (*frankliniella occidentalis*), traça cidia (*cydia pomonella*), gorgulho do feijão-de-corda (*callosobruchus maculatus*), afídeo da ervilha (*acyrthosiphon pisum*), traça do tomateiro (*tuta absoluta*), tripes da cebola (*thrips tabaci*), e lagarta do algodão (*Helicoverpa armigera*).

26. Progênie de ovos de inseto, caracterizada pelo fato de que compreende até 100% de ovos de insetos machos produzidos pelo método, conforme definido com qualquer uma das reivindicações 1-25.

27. Progênie de ovos de inseto, caracterizada pelo fato de que compreende até 100% de ovos de insetos machos estéreis produzidos pelo método, conforme definido com qualquer uma das reivindicações 2-25.

28. Inseto macho estéril geneticamente modificado, caracterizado pelo fato de ser produzido pelo método, conforme definido com qualquer uma das reivindicações 2-25, o inseto macho estéril geneticamente modificado sendo capaz de aumentar a taxa de ovos não eclodidos por acasalamento com insetos fêmeas de tipo selvagem.

29. Inseto macho estéril geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o inseto macho estéril geneticamente modificado tem uma duração de vida que é igual a ou mais longa do que a do inseto macho de tipo selvagem correspondente.

30. Método de reduzir uma população de insetos de tipo selvagem caracterizado pelo fato de que compreende a introdução de um macho estéril geneticamente modificado na população de insetos de tipo selvagem, o macho estéril geneticamente modificado produzido pelo método, conforme definido com qualquer uma das reivindicações 2-25.

FIG. 1A

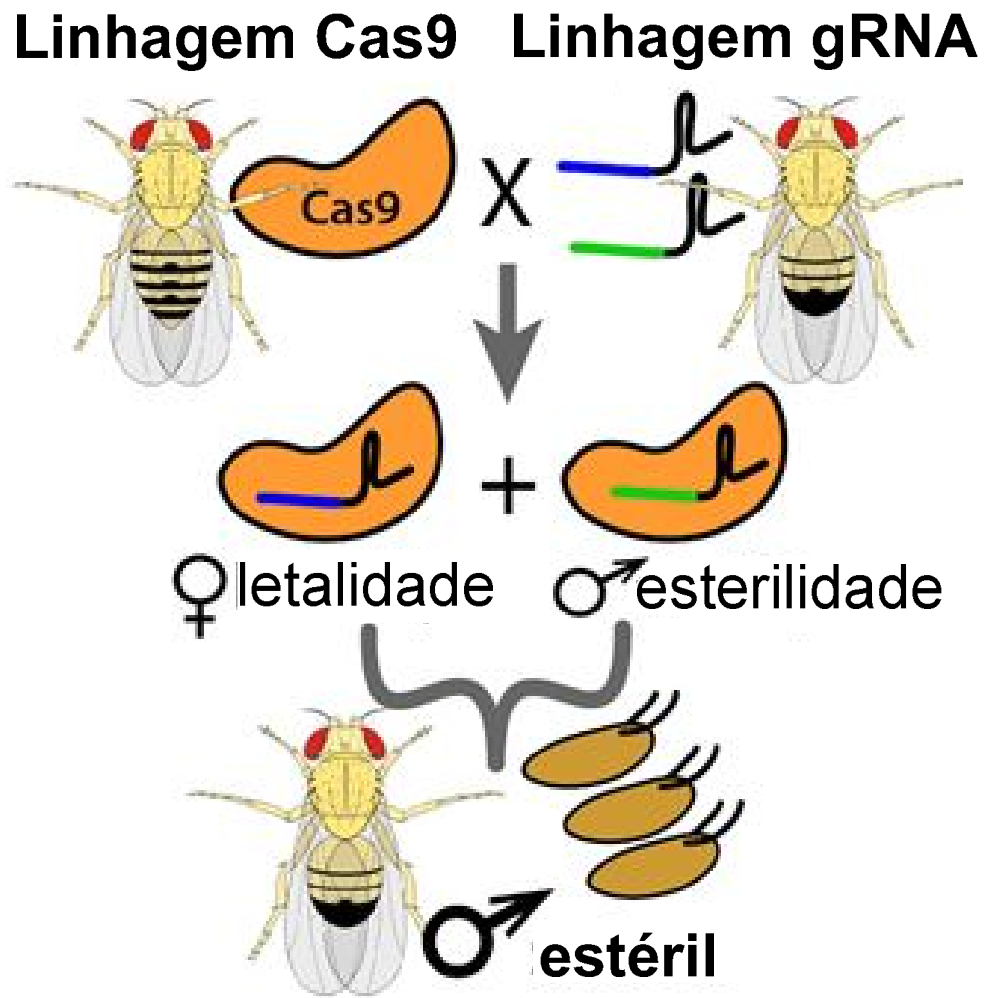




FIG. 1B

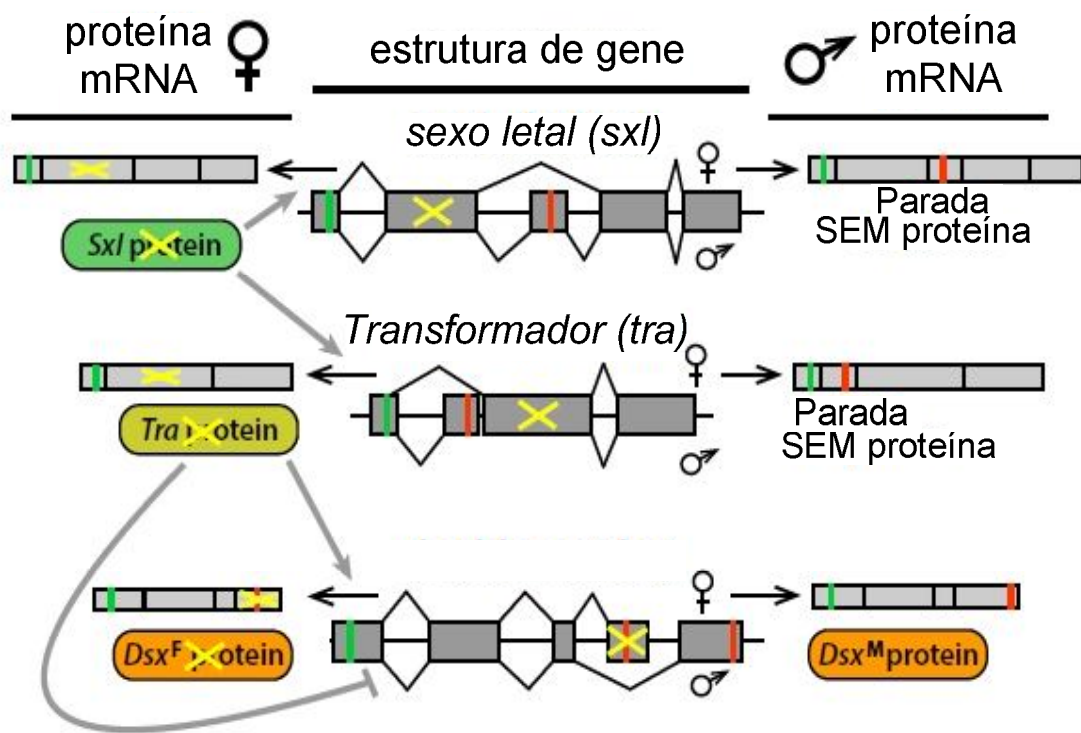


FIG. 1C

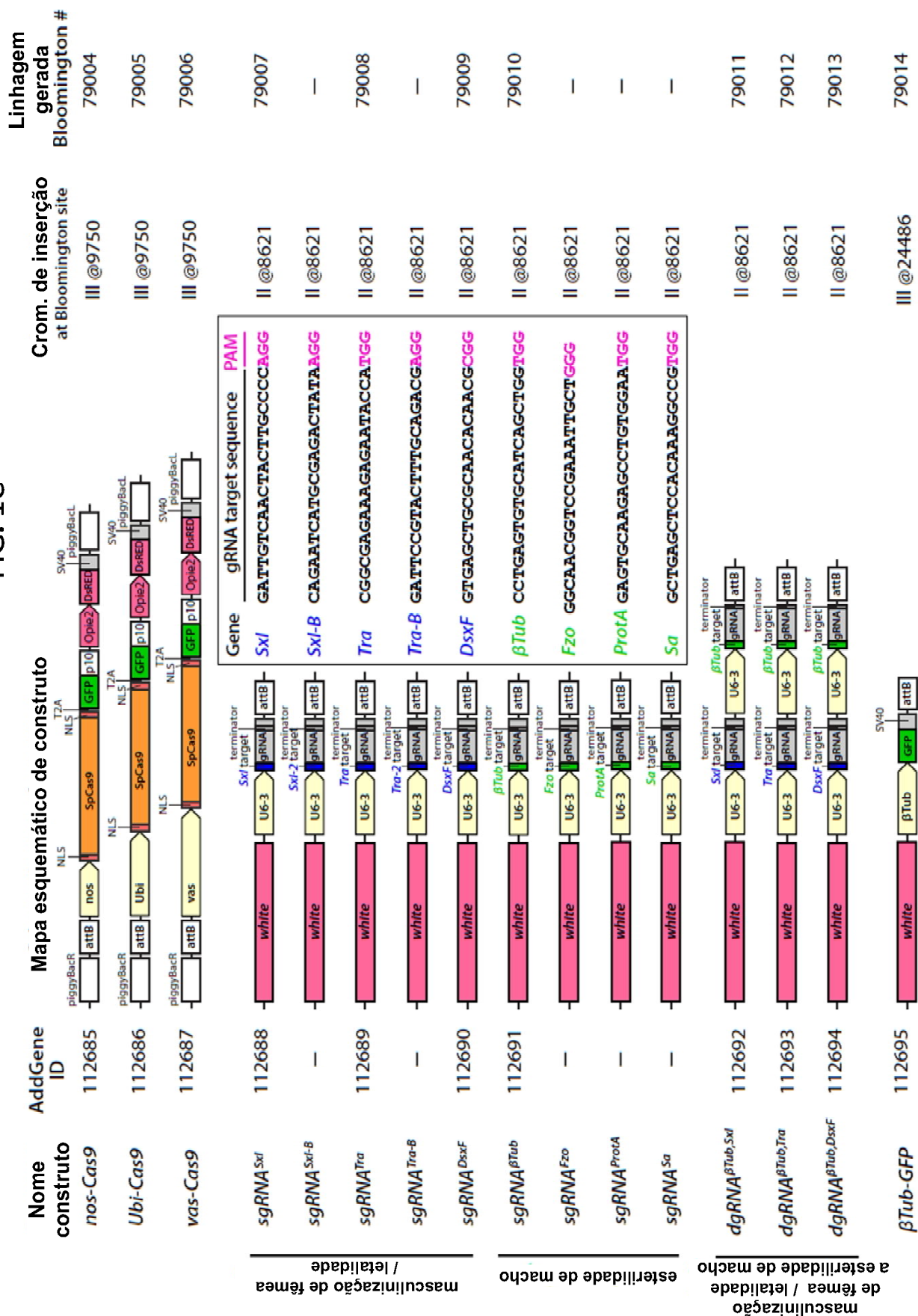


FIG. 1D

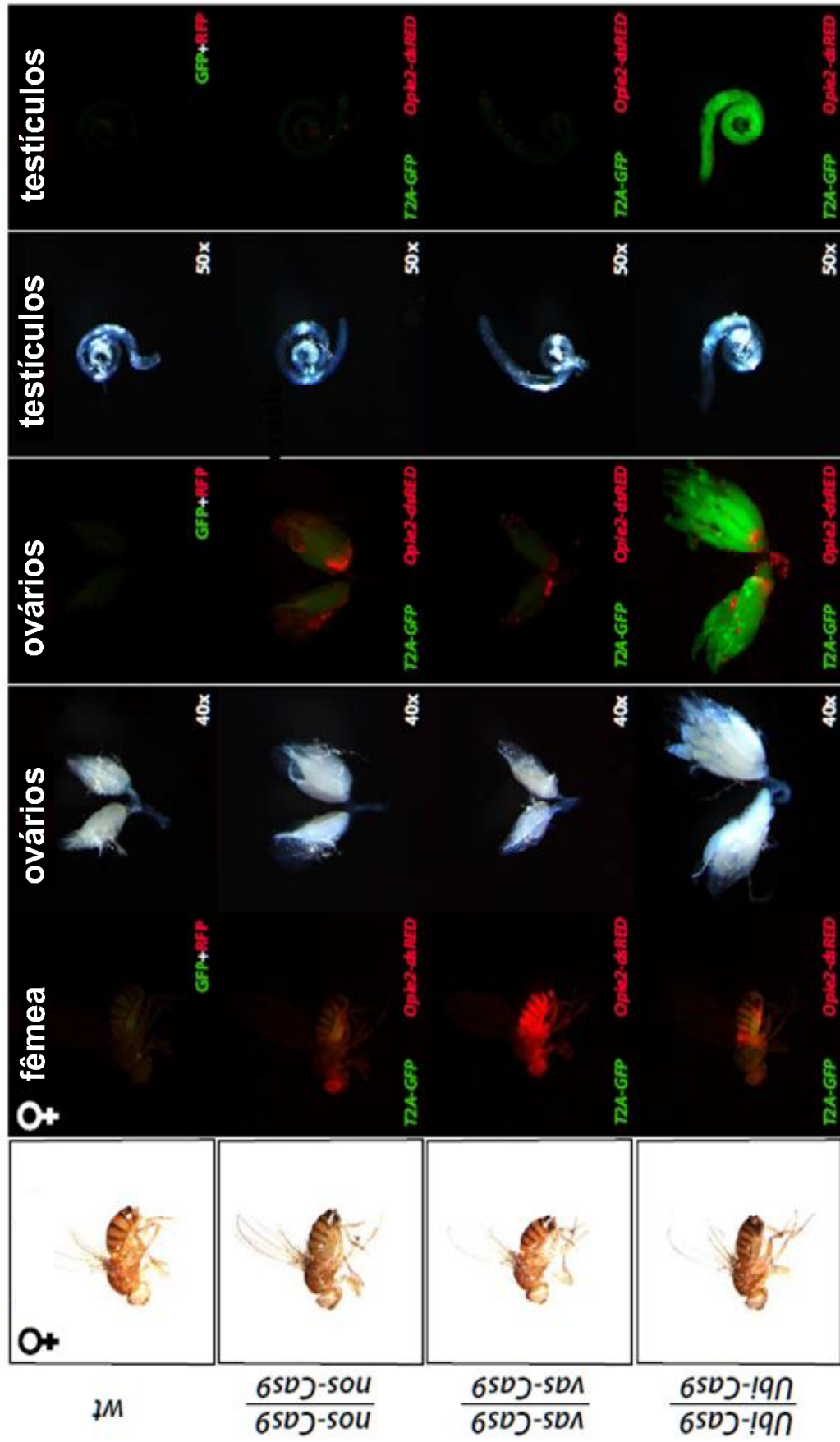
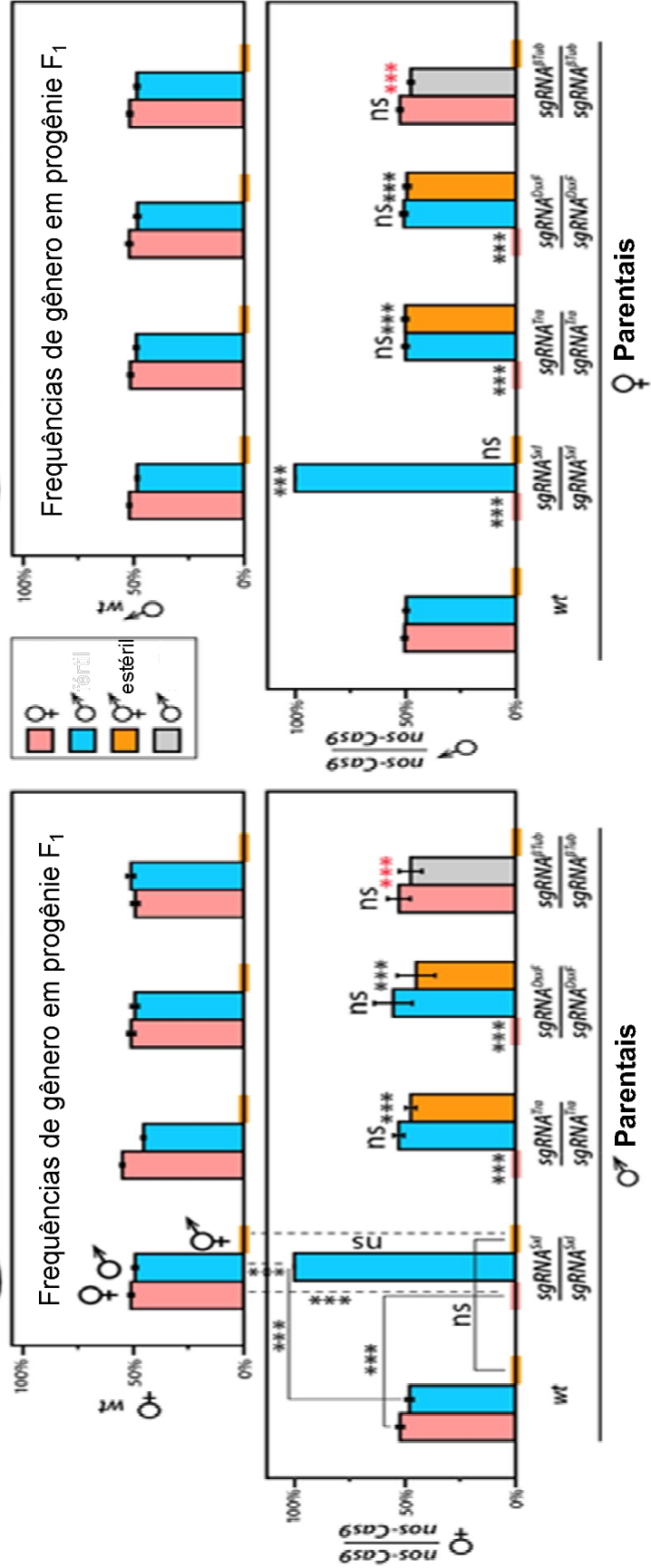


FIG. 1E

Cas9 maternal X Cas9 paternal



**FIG. 1F**  
**A progênie F1 dos cruzamentos entre gRNA único homocigótico (sgRNA/sgRNA) e nos-Cas9 homocigótico (nos-Cas9/nos-Cas9)**

♀ Maternal Cas9																
	♂ Wildtype (w-)		♂ sgRNA[Six]/sgRNA[Sxl]		♂ sgRNA[Six]/sgRNA[Tra]		♂ sgRNA[DsxF]/sgRNA[DsxF]		♂ sgRNA[bTub]/sgRNA[bTub]							
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		
♀ Wildtype (w-)	-	-	119	118	0	0	69	57	0	0	66	63	80	77	0	
♀ Wildtype (w-)	-	-	57	56	0	0	80	64	0	0	67	61	92	101	0	
♀ Wildtype (w-)	-	-	86	79	0	0	72	61	0	0	72	75	88	94	0	
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	84	83	0	0	0	0	0	56	53	0	0	64	61	67	65	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	70	72	0	0	0	0	0	60	54	0	0	56	53	61	58	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	52	49	0	0	0	0	0	57	55	0	0	54	54	63	67	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	-	-	0	88	0	0	0	87	68	0	0	113	53	115	76	0
♂ Paternal Cas9																
	♀ Wildtype (w-)		♀ sgRNA[Six]/sgRNA[Sxl]		♀ sgRNA[Tra]/sgRNA[Tra]		♀ sgRNA[DsxF]/sgRNA[DsxF]		♀ sgRNA[bTub]/sgRNA[bTub]							
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		
♂ Wildtype (w-)	-	-	92	88	0	0	62	57	0	0	65	57	59	53	0	
♂ Wildtype (w-)	-	-	72	67	0	0	77	72	0	0	63	60	66	62	0	
♂ Wildtype (w-)	-	-	76	69	0	0	81	80	0	0	73	70	73	71	0	
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	74	70	0	87	0	0	0	63	67	0	0	91	88	87	75	0
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	70	67	0	90	0	0	0	72	70	0	0	97	100	95	86	0
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	87	74	0	82	0	0	0	81	79	0	0	95	87	95	90	0

Notas: Pelo menos dez fêmeas e dez machos foram definidos para acasalamento em cada réplica de cruzamento, e sua progênie F1 foi pontuada e examinada

\*100% esterilidade

^Em alguns casos esta é uma subestimativa devido a dificuldade de distinguir ♀ de ♂

## FIG. 1G

Genotipagem de loci genômico marcado por gRNAs:

#	Test	Fly line	Fly genotype	Fly sex	gRNA targets	Cas9 parent	<i>βTub</i> target	<i>Sxl</i> target	<i>Tra</i> target	<i>DsxF</i> target
1	wildtype	w-	w-	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
2	wildtype	w-	w-	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
3	wildtype	w-	w-	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
4	wildtype	w-	w-	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
5	wildtype	Canton S	w+	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
6	wildtype	Canton S	w+	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
7	wildtype	Canton S	w+	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
8	wildtype	Canton S	w+	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
9	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/CyO</i>	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
10	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/CyO</i>	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
11	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/nos-Cas9</i>	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
12	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/nos-Cas9</i>	♀	-	-	wt	wt	wt	wt
13	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/CyO</i>	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
14	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/CyO</i>	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
15	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/nos-Cas9</i>	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
16	control	<i>nos-Cas9</i>	<i>nos-Cas9/nos-Cas9</i>	♂	-	-	wt	wt	wt	wt
17	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[βTub]/sgRNA[βTub]</i>	♀	<i>βTub</i>	-	wt	-	-	-
18	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[βTub]/sgRNA[βTub]</i>	♀	<i>βTub</i>	-	wt	-	-	-
19	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[βTub]/sgRNA[βTub]</i>	♂	<i>βTub</i>	-	wt	-	-	-
20	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[βTub]/sgRNA[βTub]</i>	♂	<i>βTub</i>	-	wt	-	-	-
21	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Sxl]/sgRNA[Sxl]</i>	♀	<i>Sxl</i>	-	-	wt	-	-
22	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Sxl]/sgRNA[Sxl]</i>	♀	<i>Sxl</i>	-	-	wt	-	-
23	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Sxl]/sgRNA[Sxl]</i>	♂	<i>Sxl</i>	-	-	wt	-	-
24	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Sxl]/sgRNA[Sxl]</i>	♂	<i>Sxl</i>	-	-	wt	-	-
25	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Tra]/sgRNA[Tra]</i>	♀	<i>Tra</i>	-	-	-	wt	-
26	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Tra]/sgRNA[Tra]</i>	♀	<i>Tra</i>	-	-	-	wt	-
27	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Tra]/sgRNA[Tra]</i>	♂	<i>Tra</i>	-	-	-	wt	-
28	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[Tra]/sgRNA[Tra]</i>	♂	<i>Tra</i>	-	-	-	wt	-
29	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[DsxF]/sgRNA[DsxF]</i>	♀	<i>DsxF</i>	-	-	-	-	wt
30	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[DsxF]/sgRNA[DsxF]</i>	♀	<i>DsxF</i>	-	-	-	-	wt
31	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[DsxF]/sgRNA[DsxF]</i>	♂	<i>DsxF</i>	-	-	-	-	wt
32	control	<i>sgRNA</i>	<i>sgRNA[DsxF]/sgRNA[DsxF]</i>	♂	<i>DsxF</i>	-	-	-	-	wt
33	control	<i>dgRNA</i>	<i>dgRNA[βTub,Sxl]/dgRNA[βTub,Sxl]</i>	♀	<i>βTub &amp; Sxl</i>	-	wt	wt	-	-
34	control	<i>dgRNA</i>	<i>dgRNA[βTub,Sxl]/CyO</i>	♀	<i>βTub &amp; Sxl</i>	-	wt	wt	-	-
35	control	<i>dgRNA</i>	<i>dgRNA[βTub,Sxl]/dgRNA[βTub,Sxl]</i>	♂	<i>βTub &amp; Sxl</i>	-	wt	wt	-	-
36	control	<i>dgRNA</i>	<i>dgRNA[βTub,Sxl]/CyO</i>	♂	<i>βTub &amp; Sxl</i>	-	wt	wt	-	-

FIG. 1G

#	Test	Fly line	Fly genotype	Fly sex	gRNA targets	Cas9 parent	$\beta$ Tub target	Sxl target	Tra target	DsxF target
37	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]	♀	$\beta$ Tub & Tra	-	wt	-	wt	-
38	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/CyO	♀	$\beta$ Tub & Tra	-	wt	-	wt	-
39	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]	♂	$\beta$ Tub & Tra	-	wt	-	wt	-
40	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/CyO	♂	$\beta$ Tub & Tra	-	wt	-	wt	-
41	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]	♀	$\beta$ Tub & DsxF	-	wt	-	-	wt
42	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/CyO	♀	$\beta$ Tub & DsxF	-	wt	-	-	wt
43	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]	♂	$\beta$ Tub & DsxF	-	wt	-	-	wt
44	control	<i>dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/CyO	♂	$\beta$ Tub & DsxF	-	wt	-	-	wt
45	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[ $\beta$ Tub]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub	♀	indels	-	-	-
46	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[ $\beta$ Tub]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub	♀	indels	-	-	-
47	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[ $\beta$ Tub]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub	♀	indels	-	-	-
48	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[ $\beta$ Tub]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub	♀	indels	-	-	-
49	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[Sxl]/+; nos-Cas9/+	♂	Sxl	♀	-	indels	-	-
50	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[Sxl]/+; nos-Cas9/+	♂	Sxl	♀	-	indels	-	-
51	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[Tra]/+; nos-Cas9/+	♀	Tra	♀	-	-	indels	-
52	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[Tra]/+; nos-Cas9/+	♀	Tra	♀	-	-	indels	-
53	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[Tra]/+; nos-Cas9/+	♂	Tra	♀	-	-	indels	-
54	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[Tra]/+; nos-Cas9/+	♂	Tra	♀	-	-	indels	-
55	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[DsxF]/+; nos-Cas9/+	♀	DsxF	♀	-	-	-	indels
56	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[DsxF]/+; nos-Cas9/+	♀	DsxF	♀	-	-	-	indels
57	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[DsxF]/+; nos-Cas9/+	♂	DsxF	♀	-	-	-	indels
58	experiment	<i>Cas9 &amp; sgRNA</i>	sgRNA[DsxF]/+; nos-Cas9/+	♂	DsxF	♀	-	-	-	indels
59	experiment	<i>Cas9 &amp; gRNAs</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♀	indels	indels	-	-
60	experiment	<i>Cas9 &amp; gRNAs</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♀	indels	indels	-	-
61	experiment	<i>Cas9 &amp; gRNAs</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♂	indels	indels	-	-
62	experiment	<i>Cas9 &amp; gRNAs</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♂	indels	indels	-	-
63	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; TM3, Sb/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♀	indels	indels	-	-
64	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; TM3, Sb/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♀	indels	indels	-	-
65	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; TM3, Sb/+	♀	$\beta$ Tub & Sxl	♀	indels	indels	-	-
66	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Sxl]/+; TM3, Sb/+	♀	$\beta$ Tub & Sxl	♀	indels	indels	-	-
67	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♂	wt	wt	-	-
68	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Sxl	♂	wt	wt	-	-
69	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Sxl	♂	wt	wt	-	-
70	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Sxl	♂	wt	wt	-	-

FIG. 1G

#	Test	Fly line	Fly genotype	Fly sex	gRNA targets	Cas9 parent	$\beta$ Tub target	Sxl target	Tra target	DsxF target
71	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
72	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
73	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♂	indels	-	indels	-
74	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♂	indels	-	indels	-
75	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
76	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
77	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♂	indels	-	indels	-
78	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♂	indels	-	indels	-
79	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; TM3, Sb/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
80	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; TM3, Sb/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
81	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; TM3, Sb/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
82	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,Tra]/+; TM3, Sb/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♀	indels	-	indels	-
83	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♂	wt	-	wt	-
84	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & Tra	♂	wt	-	wt	-
85	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♂	wt	-	wt	-
86	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & Tra	♂	wt	-	wt	-
87	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
88	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
89	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♂	indels	-	-	indels
90	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♂	indels	-	-	indels
91	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
92	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
93	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♂	indels	-	-	indels
94	experiment	<i>Cas9 &amp; dgRNA</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♂	indels	-	-	indels
95	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; TM3, Sb/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
96	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; TM3, Sb/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
97	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; TM3, Sb/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
98	experiment	<i>dgRNA+loaded Cas9</i>	dgRNA[ $\beta$ Tub,DsxF]/+; TM3, Sb/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♀	indels	-	-	indels
99	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♂	wt	-	-	wt
100	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♂	$\beta$ Tub & DsxF	♂	wt	-	-	wt
101	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♂	wt	-	-	wt
102	experiment	<i>Cas9+loaded dgRNA</i>	CyO/+; nos-Cas9/+	♀	$\beta$ Tub & DsxF	♂	wt	-	-	wt



FIG. 2A

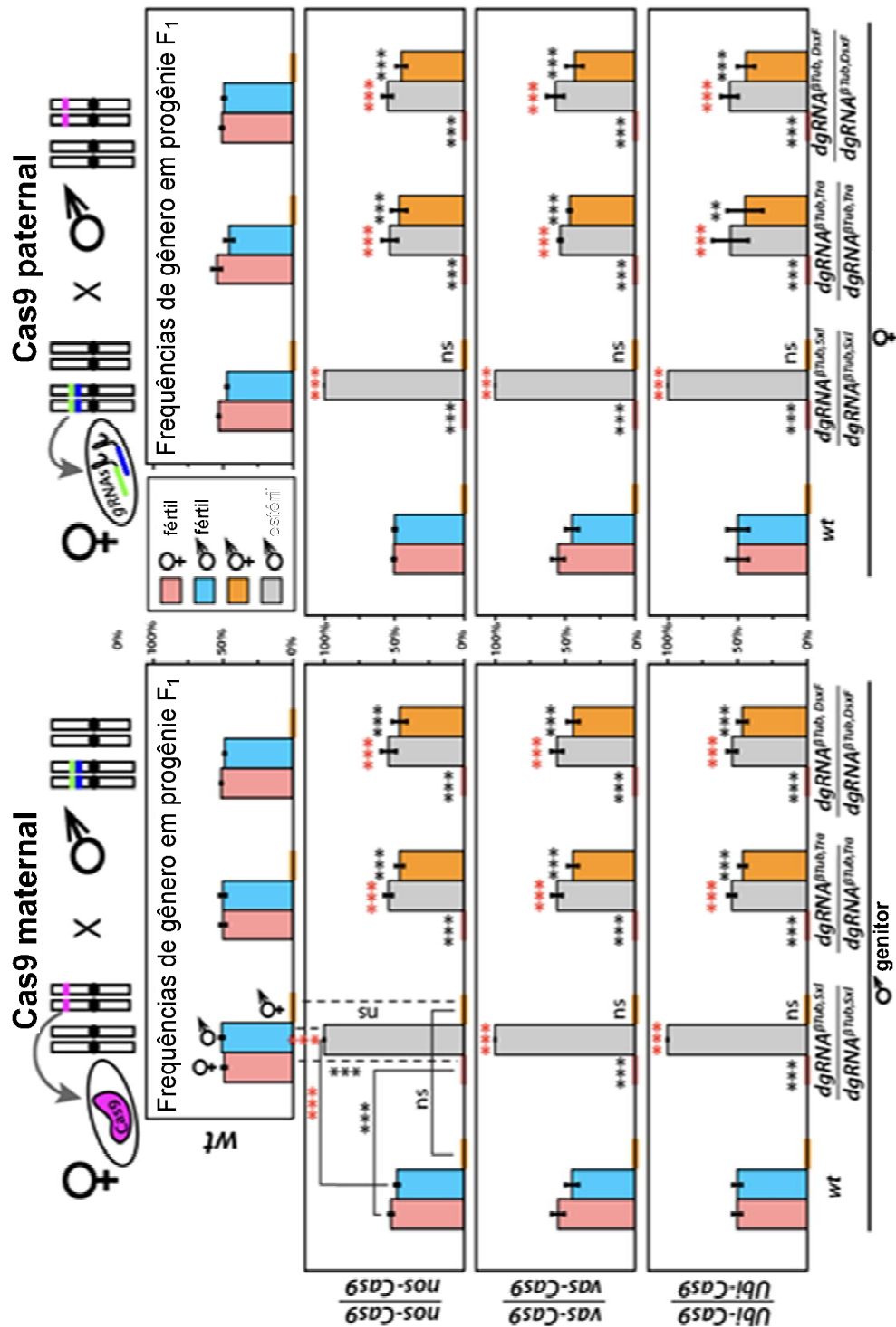


FIG. 2B

A progênie F1 dos cruzamentos entre linhagens de gRNA duplo homozigótico (sgRNA/dgRNA) e Cas9 homozigótico (Cas9/Cas9)

♀ Maternal Cas9															
	♂ Wildtype (w-)			♀ dgRNA[bTub,Sxl]/sgRNA[bTub,Sxl]				♀ dgRNA[bTub,Tra]/gRNA[bTub,Tra]				♀ dgRNA[bTub,DsxF]/dgRNA[bTub,DsxF]			
	♀	♂	♀	♀	♂	♂*	♀*	♀	♂	♂*	♀**	♀	♂	♂*	♀**
♀ Wildtype (w-)	-	-	-	106	102	0	0	103	106	0	0	96	91	0	0
♀ Wildtype (w-)	-	-	-	103	112	0	0	79	86	0	0	106	103	0	0
♀ Wildtype (w-)	-	-	-	116	123	0	0	83	75	0	0	108	101	0	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	84	83	0	0	0	104	0	0	0	65	48	0	0	74	58
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	70	72	0	0	0	91	0	0	0	81	78	0	0	72	68
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	52	49	0	0	0	121	0	0	0	115	105	0	0	71	77
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	-	-	-	0	0	146	0	0	0	90	73	0	0	93	61
♀ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	54	59	0	0	0	91	0	0	0	61	44	0	0	126	91
♀ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	51	52	0	0	0	77	0	0	0	53	48	0	0	87	72
♀ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	66	65	0	0	0	113	0	0	0	58	51	0	0	115	105
♀ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	-	-	-	0	0	140	0	0	0	44	41	0	0	112	114
♀ vas-Cas9/vas-Cas9	84	87	0	0	0	176	0	0	0	108	69	0	0	121	76
♀ vas-Cas9/vas-Cas9	47	54	0	0	0	75	0	0	0	65	57	0	0	71	65
♀ vas-Cas9/vas-Cas9	96	76	0	0	0	96	0	0	0	81	64	0	0	84	76
♀ vas-Cas9/vas-Cas9	-	-	-	0	0	172	0	0	0	86	77	0	0	86	65
♂ Paternal Cas9															
	♀ Wildtype (w-)			♀ dgRNA[bTub,Sxl]/dgRNA[bTub,Sxl]				♀ dgRNA[bTub,Tra]/dgRNA[bTub,Tra]				♀ dgRNA[bTub,DsxF]/dgRNA[bTub,DsxF]			
	♀	♂	♀	♀	♂	♂*	♀*	♀	♂	♂*	♀**	♀	♂	♂*	♀**
♂ Wildtype (w-)	-	-	-	111	99	0	0	82	61	0	0	77	77	0	0
♂ Wildtype (w-)	-	-	-	121	110	0	0	80	65	0	0	82	76	0	0
♂ Wildtype (w-)	-	-	-	111	96	0	0	63	61	0	0	99	98	0	0
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	74	70	0	0	0	65	0	0	0	69	62	0	0	57	53
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	70	67	0	0	0	127	0	0	0	120	136	0	0	168	130
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	87	74	0	0	0	86	0	0	0	105	91	0	0	63	58
♂ nos-Cas9/nos-Cas9	-	-	-	0	0	111	0	0	0	83	54	0	0	59	40
♂ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	52	60	0	0	0	67	0	0	0	53	49	0	0	96	83
♂ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	54	51	0	0	0	57	0	0	0	46	41	0	0	68	42
♂ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	58	53	0	0	0	105	0	0	0	68	71	0	0	61	52
♂ Ubi-Cas9/Ubi-Cas9	-	-	-	0	0	125	0	0	0	59	29	0	0	79	67
♂ vas-Cas9/vas-Cas9	68	46	0	0	0	149	0	0	0	138	120	0	0	79	79
♂ vas-Cas9/vas-Cas9	72	71	0	0	0	54	0	0	0	171	150	0	0	270	145
♂ vas-Cas9/vas-Cas9	83	68	0	0	0	58	0	0	0	45	37	0	0	56	42
♂ vas-Cas9/vas-Cas9	-	-	-	0	0	115	0	0	0	110	102	0	0	89	72

Notas: Pelo menos dez fêmeas e dez machos foram definidos para acasalamento em cada réplica de cruzamento, e sua progênie F1 foi pontuada e examinada

\*100% esterilidade

FIG. 2C

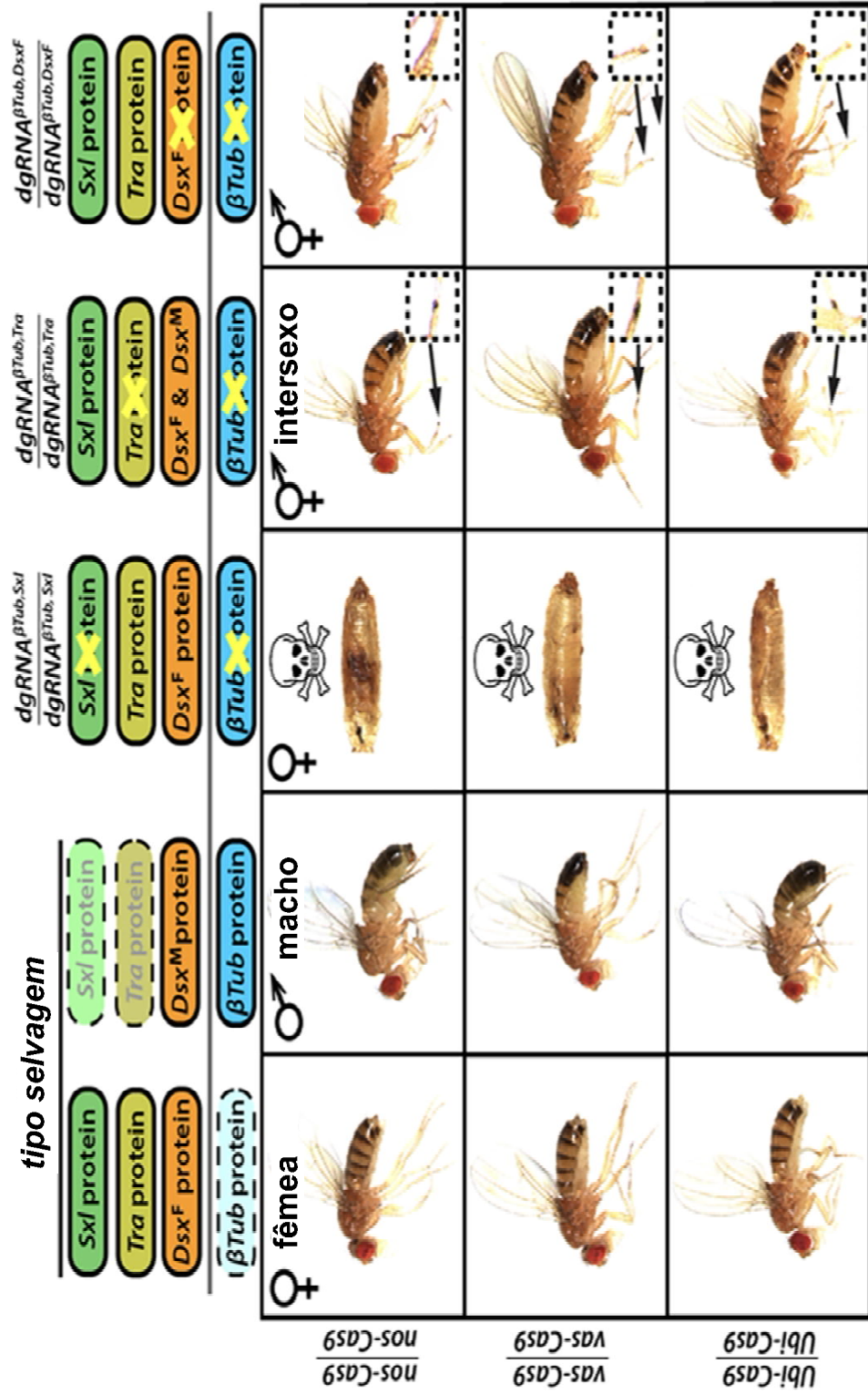


FIG. 2D

Taxa de eclosão de ovos

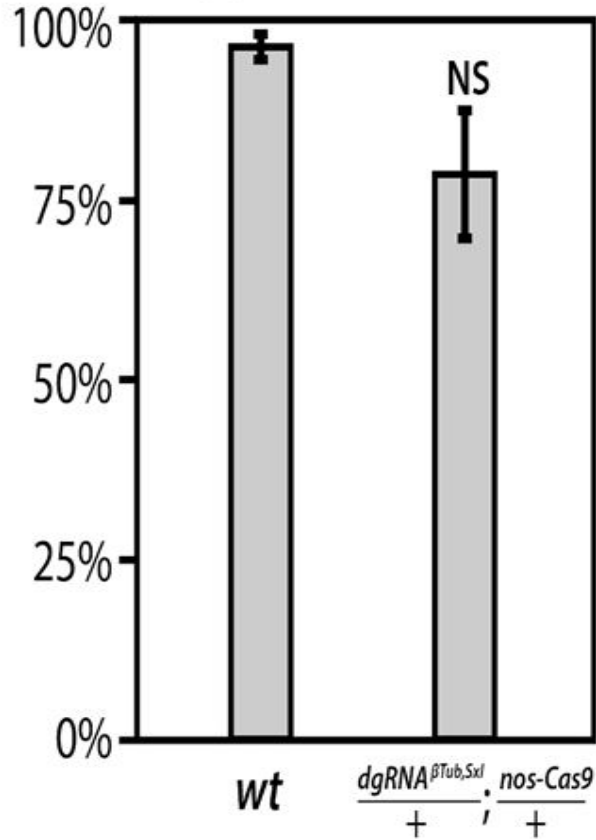


FIG. 2E

Sobrevivência larval até idade adulta

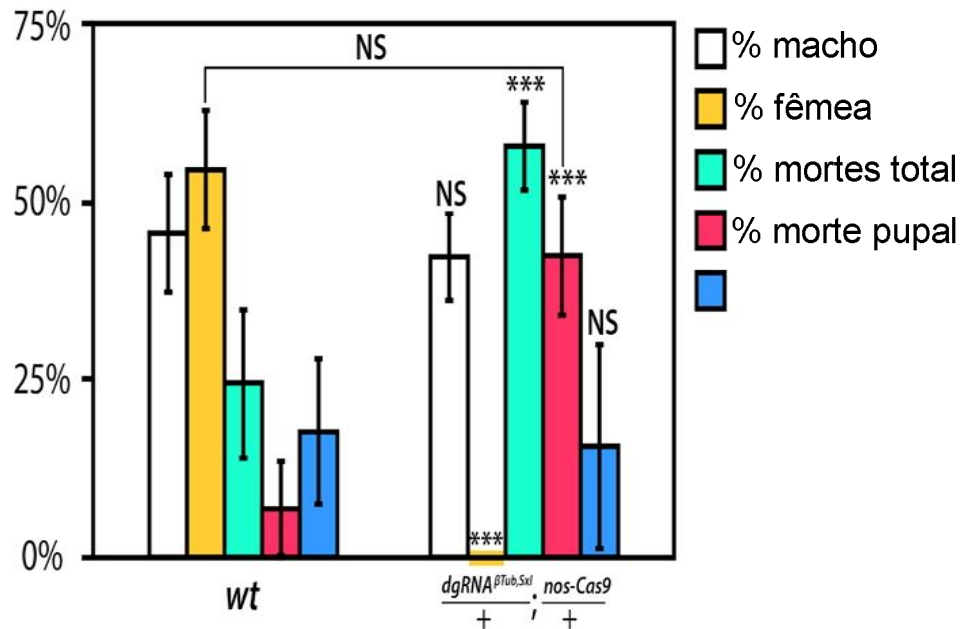


FIG. 2F

## Características fenotípicas de moscas trans-heterozigóticas carregando Cas9 egRNAs duplos (dsRNA)

Fenótipo	<i>dgRNA<sup>FTUB, Sxl</sup> /+; Cas9/+</i>		<i>dgRNA<sup>FTUB, Trb</sup> /+; Cas9/+</i>		<i>dgRNA<sup>FTUB, Dicer</sup> /+; Cas9/+</i>	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Viabilidade	Viável	100% letal	Viável	Viável	Viável	Viável
Morfologia externa	macho normal	N/A	macho normal	intersexo	macho normal	intersexo
Fertilidade	100% estéril	N/A	100% estéril	100% estéril	100% estéril	100% estéril
Ovários	ausente	N/A	absent	rudimentar, variável	ausente	desenvolvido ou rudimentar
Ovos produzidos	N/A	N/A	N/A	poucos, raros	N/A	numerosos, frequentes
Ovos postos	N/A	N/A	N/A	nunca	N/A	nunca
Testículos	desenvolvido	N/A	desenvolvido	ausente	desenvolvido	ausente
Glândulas acessórias masculinas	desenvolvido	N/A	desenvolvido	desenvolvido	desenvolvido	desenvolvido
"Pentes sexuais"	desenvolvido	N/A	desenvolvido	desenvolvido, variável	desenvolvido	ausente

Nota: As características fenotípicas diferentes de letalidade e esterilidade mostram manifestação variável independentemente de qual

FIG. 2G

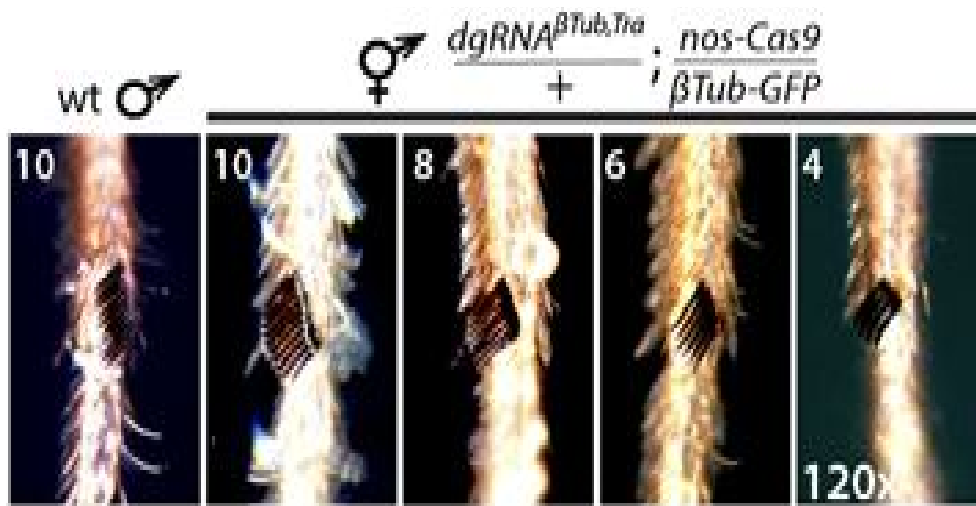


FIG. 2H

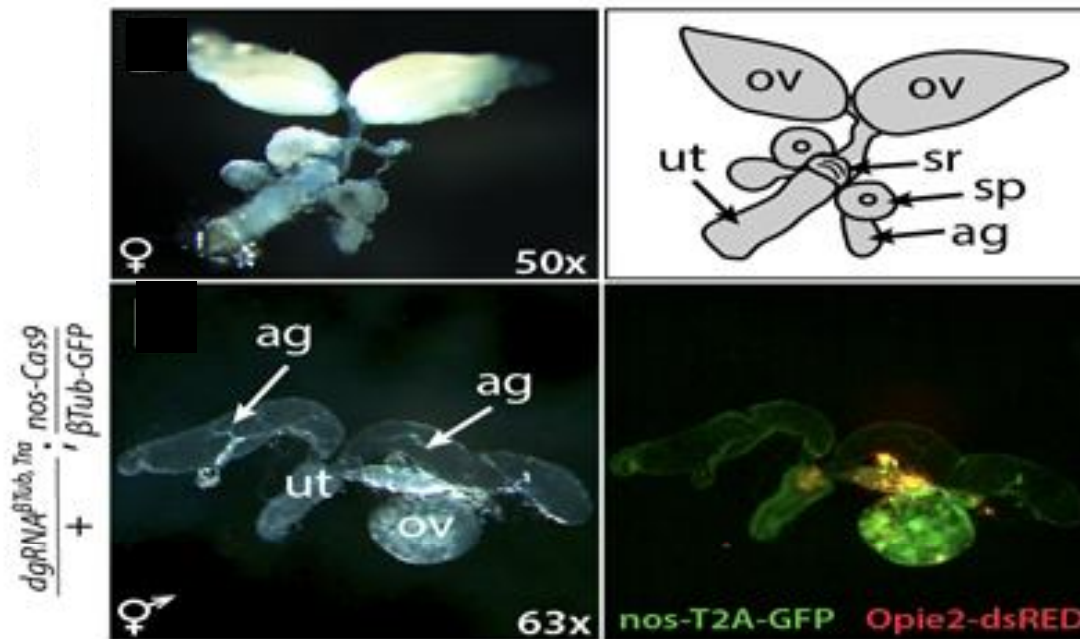


FIG. 2I

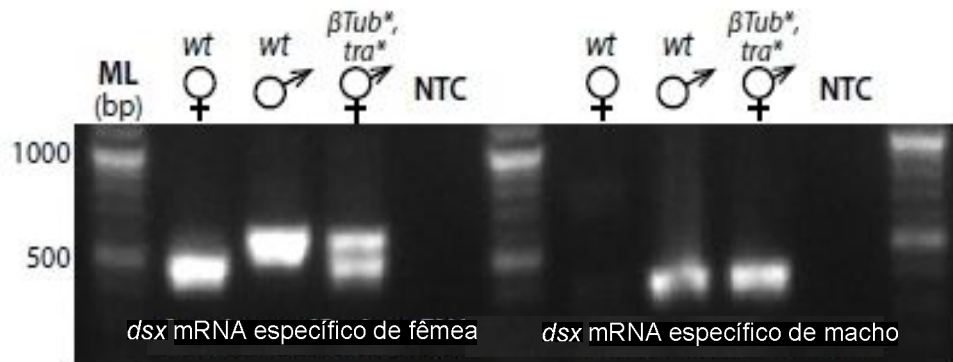


FIG. 2J

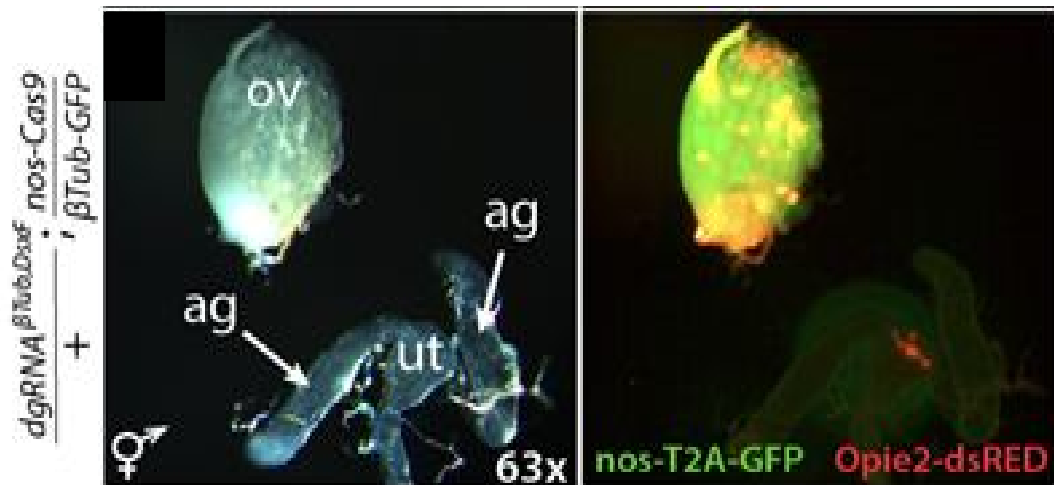


FIG. 2K

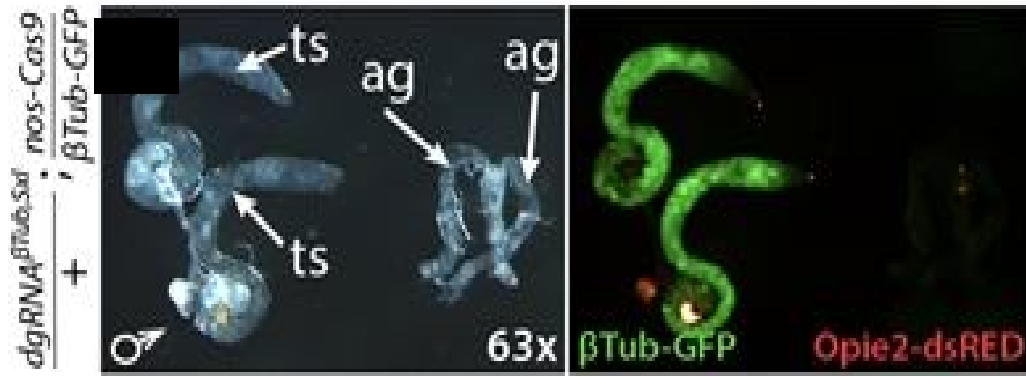


FIG. 2L

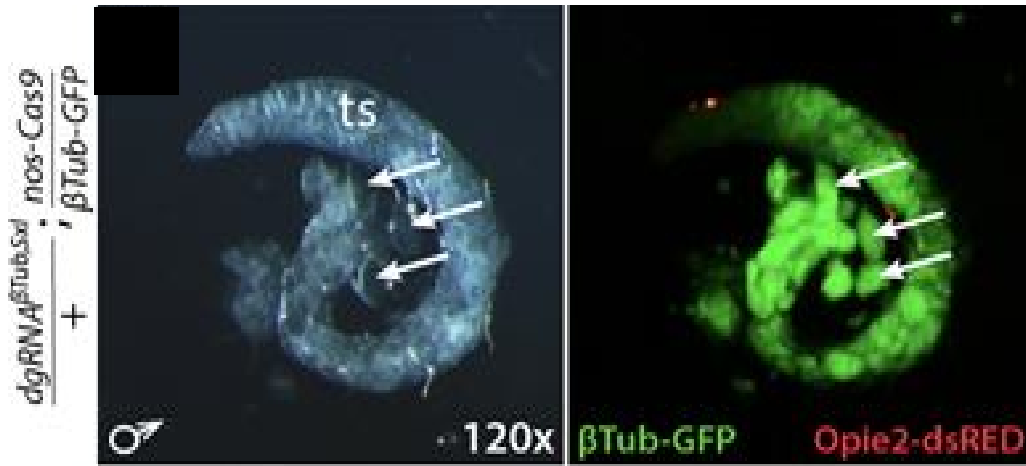


FIG. 2M

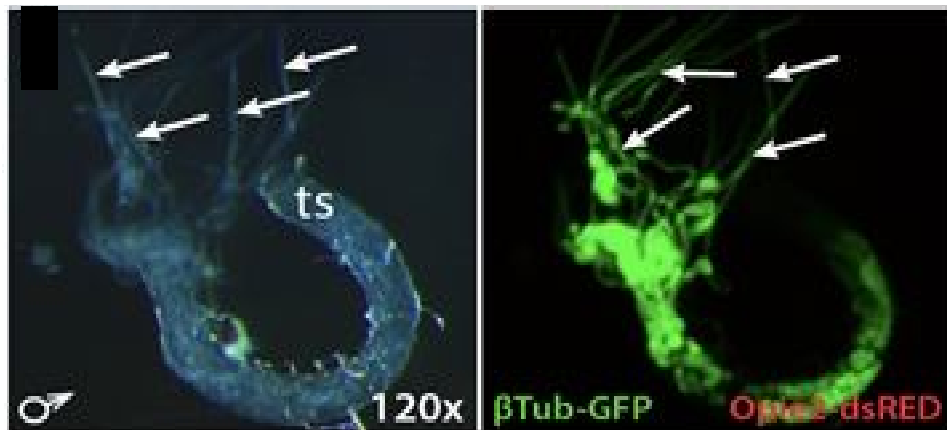






FIG. 20

*alvo Sexo Letal (sxl)*

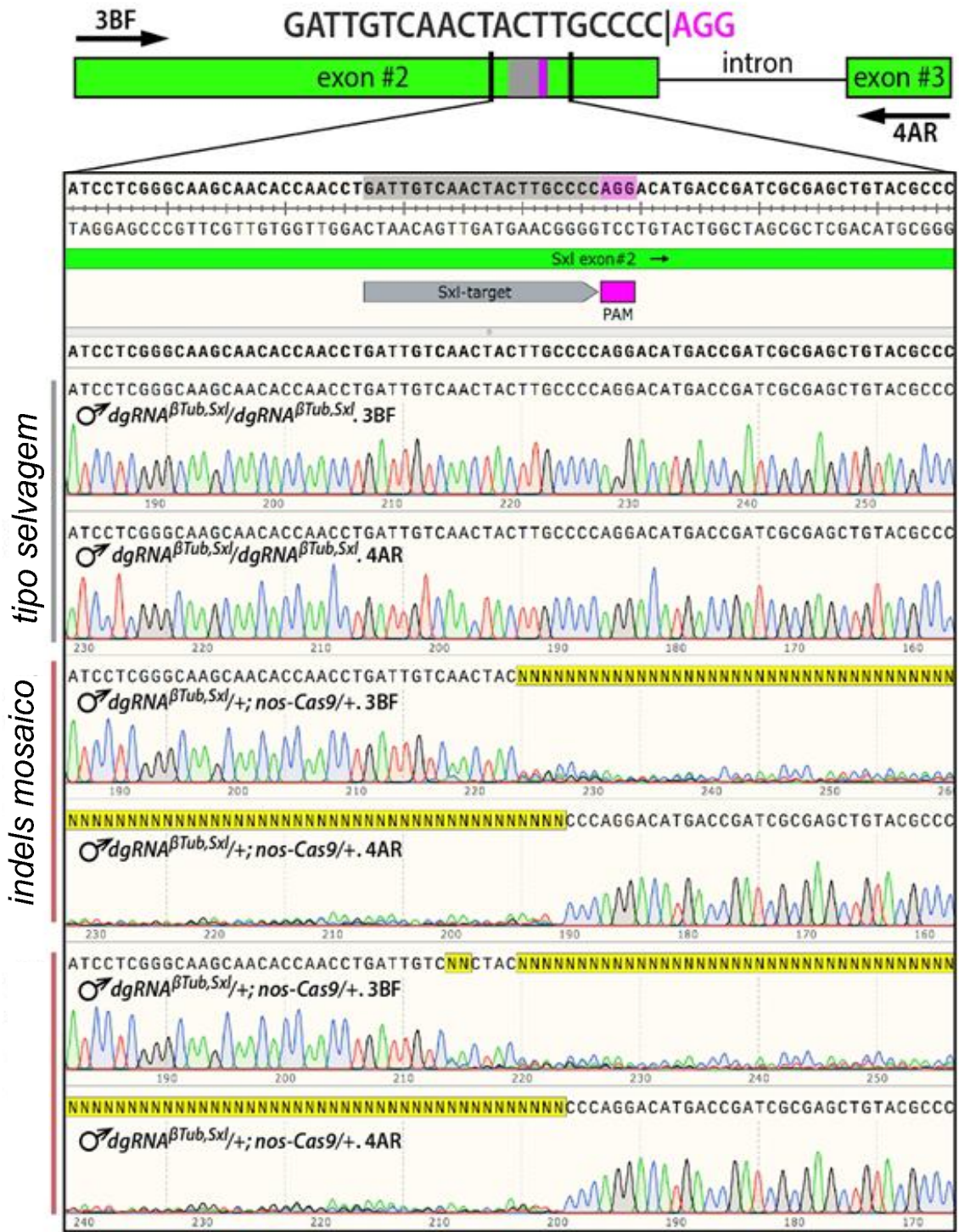


FIG. 2P

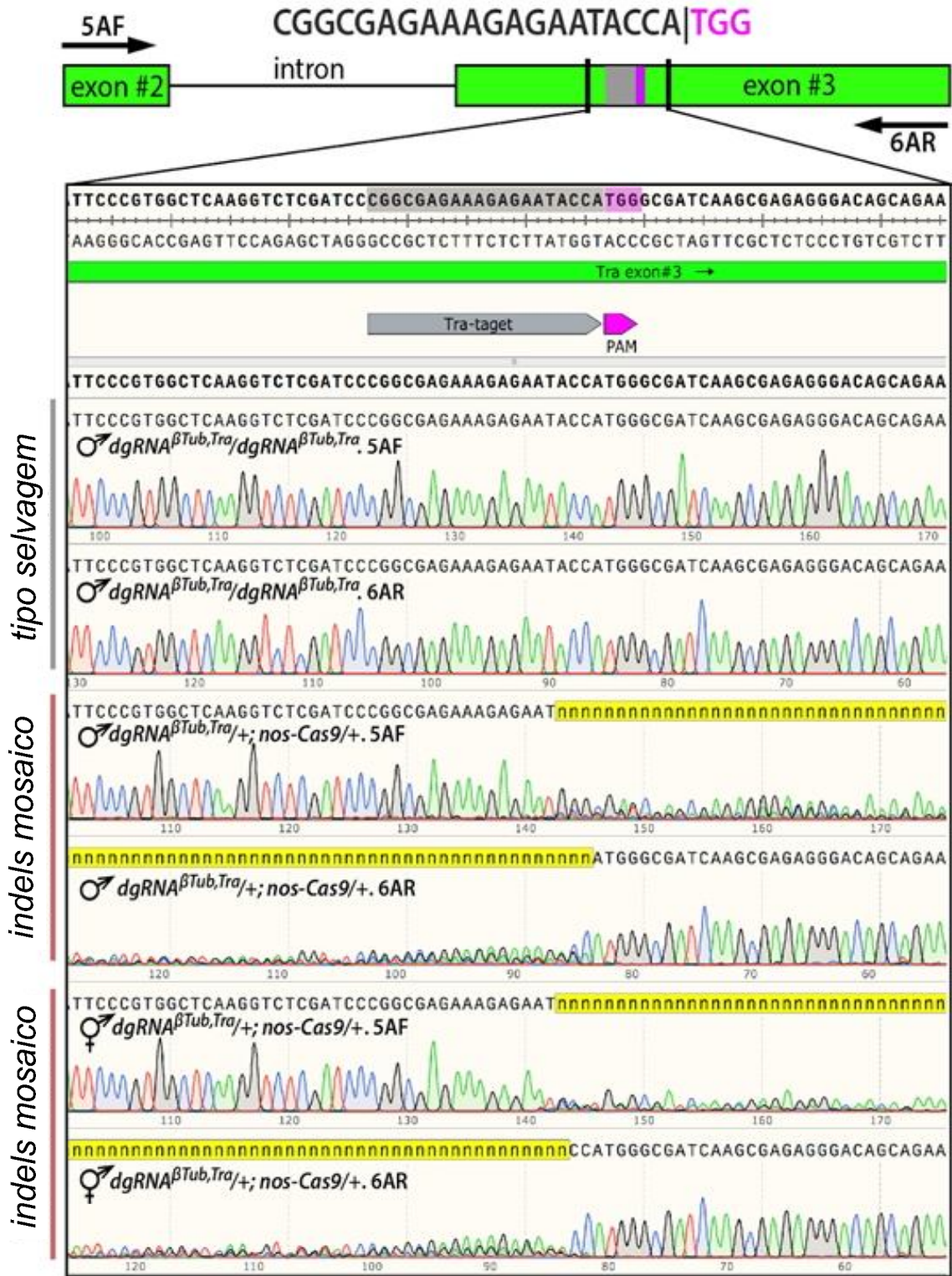


FIG. 2Q

**alvo Sexo Duplo (DsxF)**

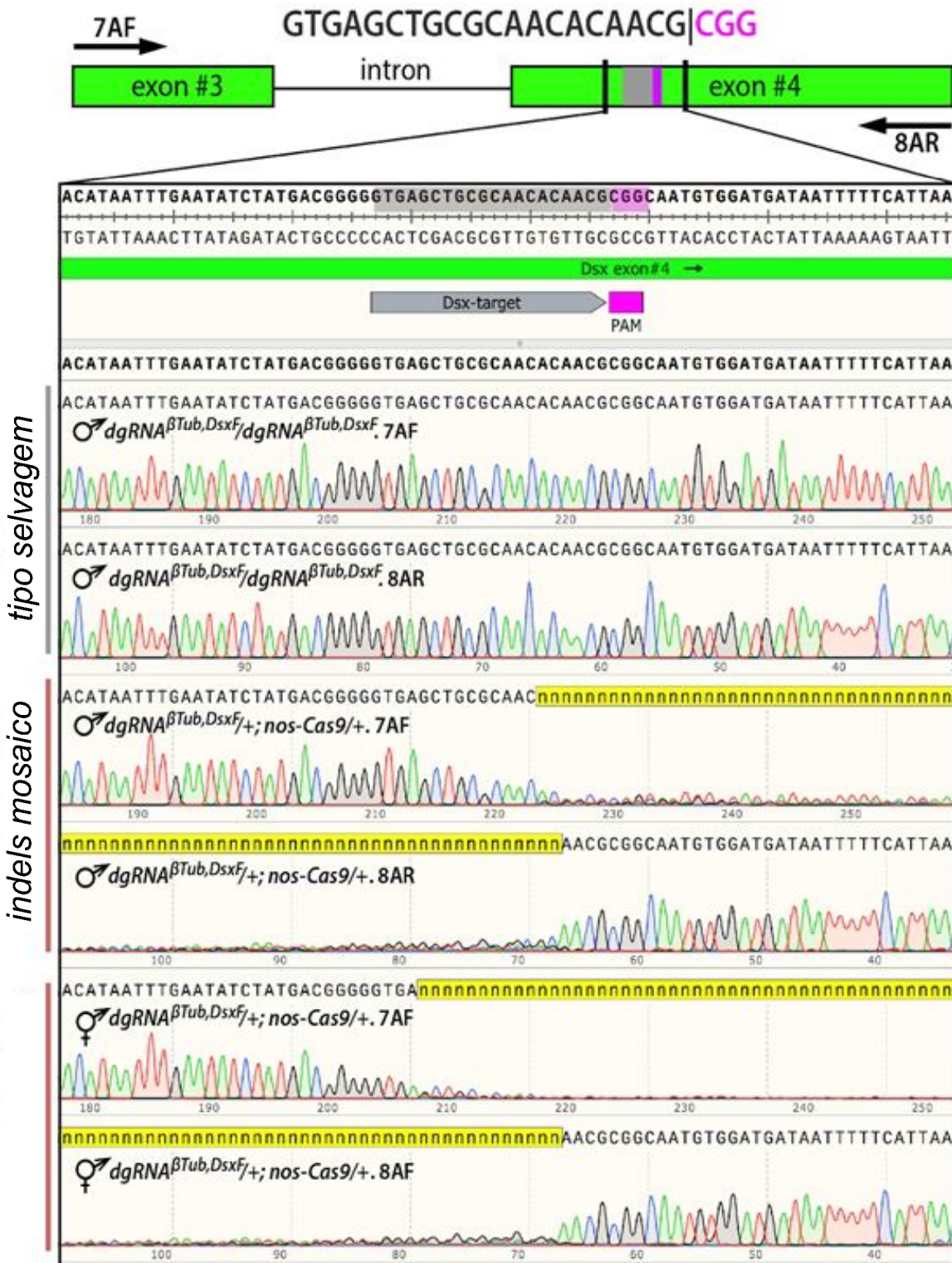


FIG. 3A

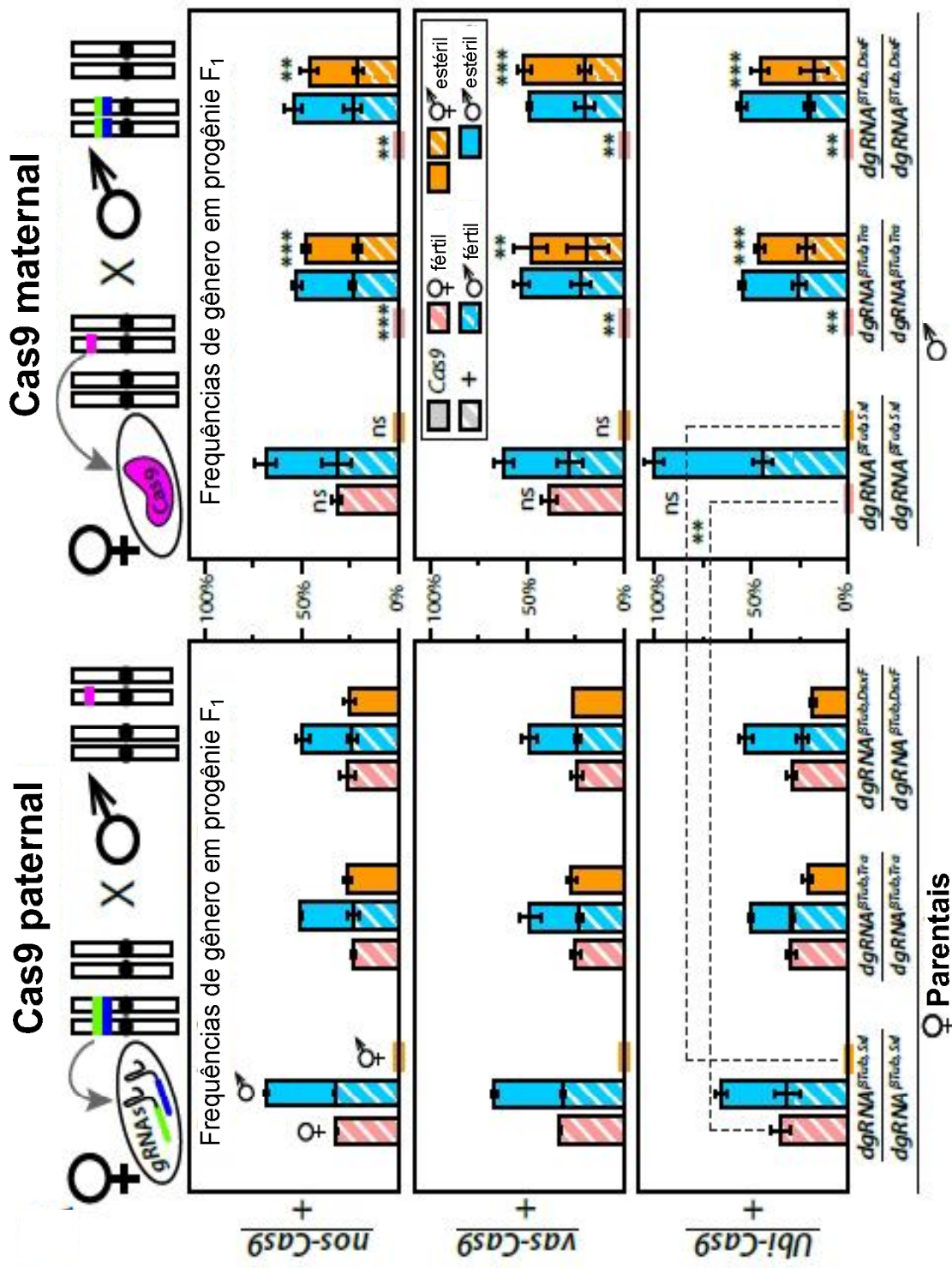


FIG. 3B

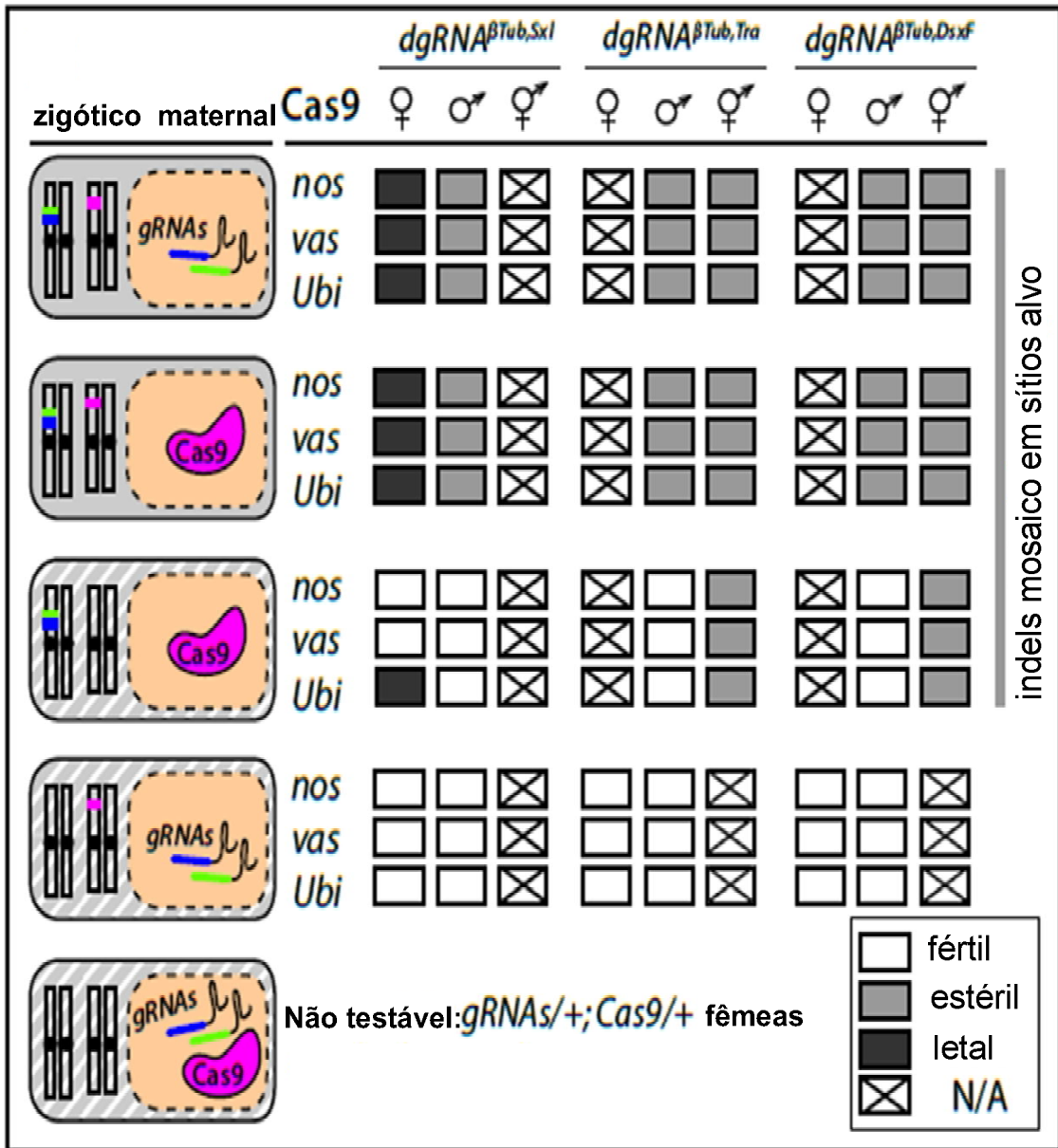


FIG. 3C

A progénie F1 dos cruzamentos entre gRNA/dgRNA duplo homocigótico e Cas9 heterocigótico (Cas9/TM3, Sb)

♂ Paternal Cas9																
	♀ dgRNA[bTub, Six]/dgRNA[bTub, Six]				♀ dgRNA[bTub, Traj]/dgRNA[bTub, Traj]				♀ dgRNA[bTub, DsxF]/dgRNA[bTub, DsxF]							
	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*
♂nos-Cas9/TM3, Sb	0	49	52	0	0	46	56	54	51	0	40	44	39	44	0	0
♂nos-Cas9/TM3, Sb	0	53	61	0	0	47	57	46	54	0	46	56	42	54	0	0
♂nos-Cas9/TM3, Sb	0	57	63	0	0	52	57	45	60	0	60	42	53	42	0	0
♂Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	48	50	0	0	68	56	72	61	0	47	36	40	24	0	0
♂Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	46	51	0	0	60	39	58	37	0	65	73	50	45	0	0
♂Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	56	47	0	0	58	38	56	38	0	45	51	37	31	0	0
♂vas-Cas9/TM3, Sb	0	47	51	0	0	37	48	35	42	0	41	57	45	52	0	0
♂vas-Cas9/TM3, Sb	0	45	46	0	0	42	46	42	44	0	45	45	42	48	0	0
♂vas-Cas9/TM3, Sb	0	44	49	0	0	55	37	46	58	0	57	44	54	54	0	0

♀ Maternal Cas9																
	♂ dgRNA[bTub, Six]/dgRNA[bTub, Six]				♂ dgRNA[bTub, Traj]/dgRNA[bTub, Traj]				♂ dgRNA[bTub, DsxF]/dgRNA[bTub, DsxF]							
	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*	♀	♂TM3	♂*	♀TM3*
♀nos-Cas9/TM3, St	0	43	55	0	0	46	41	48	39	0	49	42	46	41	0	0
♀nos-Cas9/TM3, St	0	41	46	0	0	36	24	32	21	0	57	31	53	35	0	0
♀nos-Cas9/TM3, St	0	43	43	0	0	36	30	31	24	0	39	38	40	33	0	0
♀nos-Cas9/TM3, St	0	80	96	0	0	47	45	43	40	0	50	39	26	25	0	0
♀Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	0	35	0	0	32	30	24	23	0	42	23	31	37	0	0
♀Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	0	46	0	0	48	32	41	45	0	58	36	46	28	0	0
♀Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	0	40	0	0	39	38	39	27	0	47	24	45	16	0	0
♀Ubi-Cas9/TM3, Sb	0	0	45	0	0	46	41	34	28	0	54	33	37	19	0	0
♀vas-Cas9/TM3, Sb	0	88	91	0	0	49	25	53	39	0	64	35	74	56	0	0
♀vas-Cas9/TM3, Sb	0	66	64	0	0	53	59	49	46	0	39	39	41	27	0	0
♀vas-Cas9/TM3, Sb	0	110	77	0	0	93	58	100	7	0	76	57	79	53	0	0
♀vas-Cas9/TM3, Sb	0	85	69	0	0	48	36	31	42	0	55	30	66	31	0	0

Notas: Pelo menos sete fêmeas e sete machos foram definidos para acasalamento em cada réplica de cruzamento, e sua progénie F1 foi pontuada e examinada \*100% esterilidade

♂

FIG. 3D

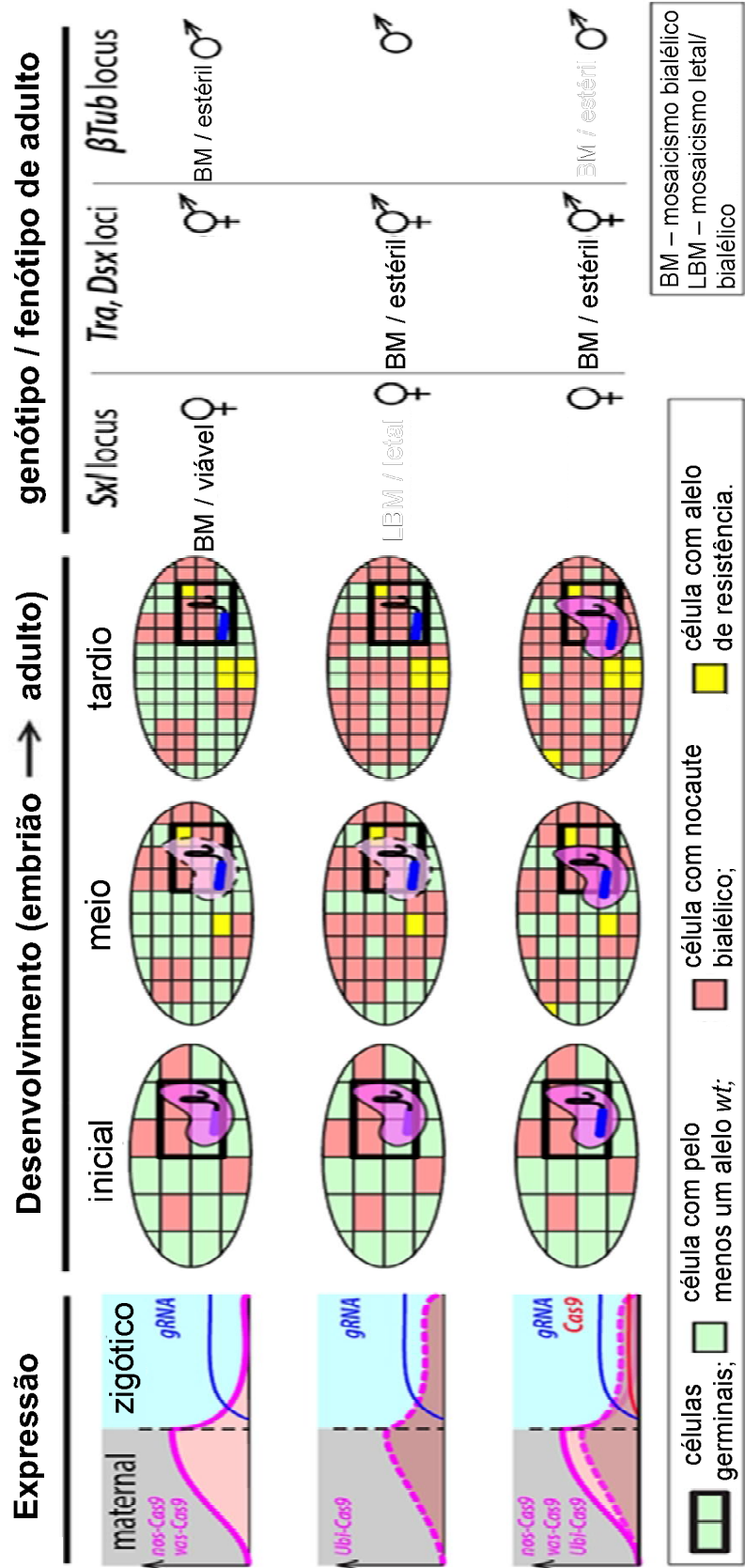




FIG. 4A

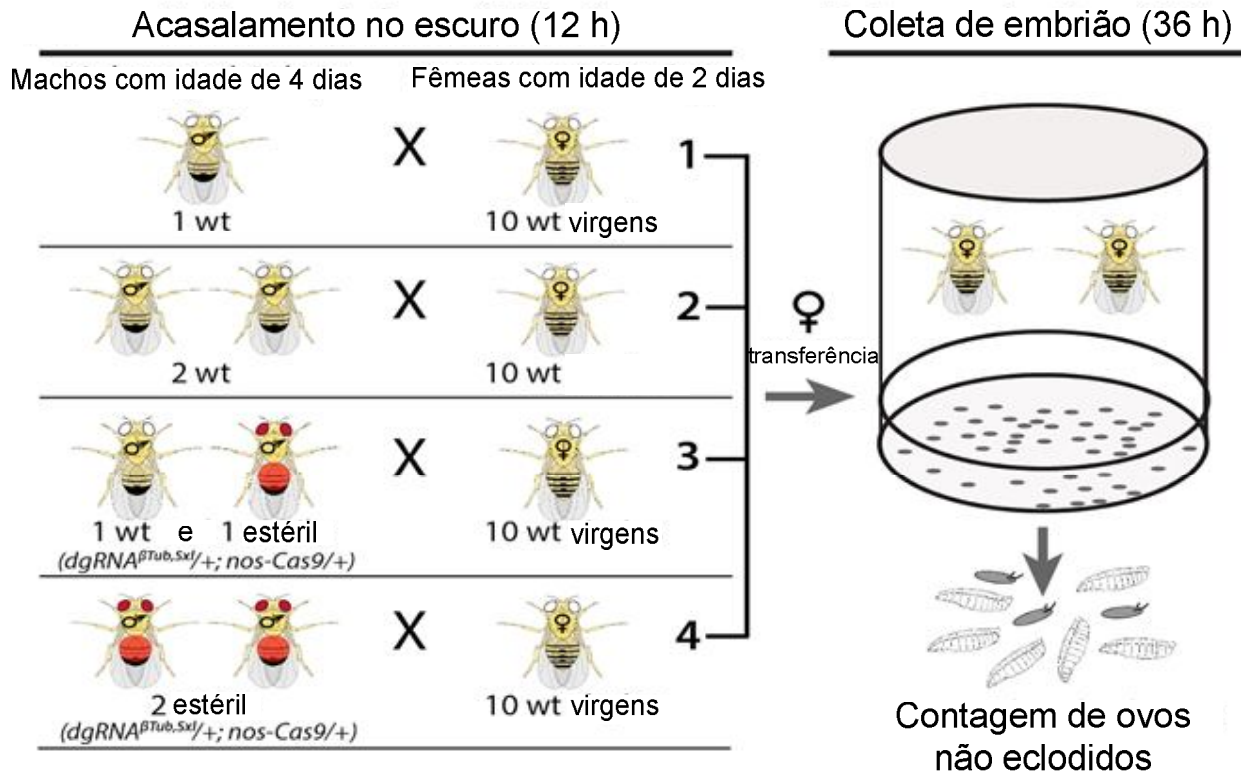


FIG. 4B

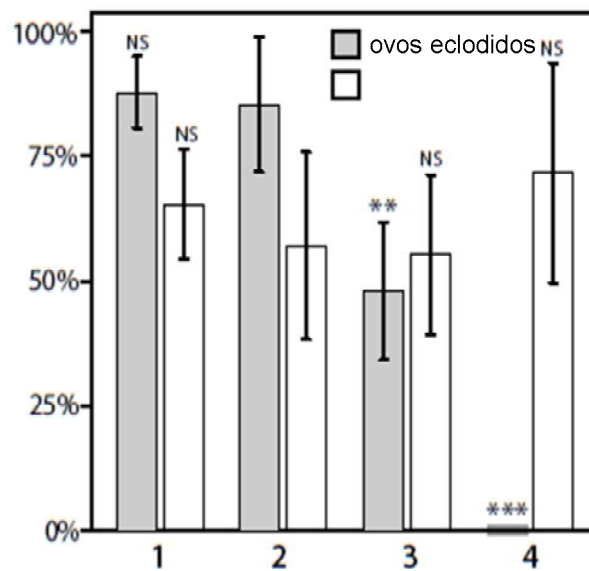


FIG. 4C  
Competitividade de dgRNA**Tub,Sxl**/**+**;nos-Cas9/**+** machos

# Classe em Fig. 4B	♂ genótipo	ovos postos	ovos não eclodidos	ovos eclodidos	% ovos postos
2	2 wt ♂	131	6	125	65.83
2	2 wt ♂	60	18	42	30.15
2	2 wt ♂	141	10	131	70.85
2	2 wt ♂	146	5	141	73.37
2	2 wt ♂	89	26	63	44.72
1	1 wt ♂	124	6	118	62.31
1	1 wt ♂	129	24	105	64.82
1	1 wt ♂	127	18	109	63.82
1	1 wt ♂	104	5	99	52.26
1	1 wt ♂	165	32	133	82.91
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, sxl* ♂	144	50	94	72.36
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, sxl* ♂	108	71	37	54.27
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, sxl* ♂	85	56	29	42.71
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, sxl* ♂	72	31	41	36.18
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, sxl* ♂	139	71	68	69.85
4	2 bTub*, Sxl* ♂	145	145	0	72.86
4	2 bTub*, Sxl* ♂	169	169	0	84.92
4	2 bTub*, Sxl* ♂	97	97	0	48.74
4	2 bTub*, Sxl* ♂	199	199	0	100.00
4	2 bTub*, Sxl* ♂	101	101	0	50.75

FIG. 4D

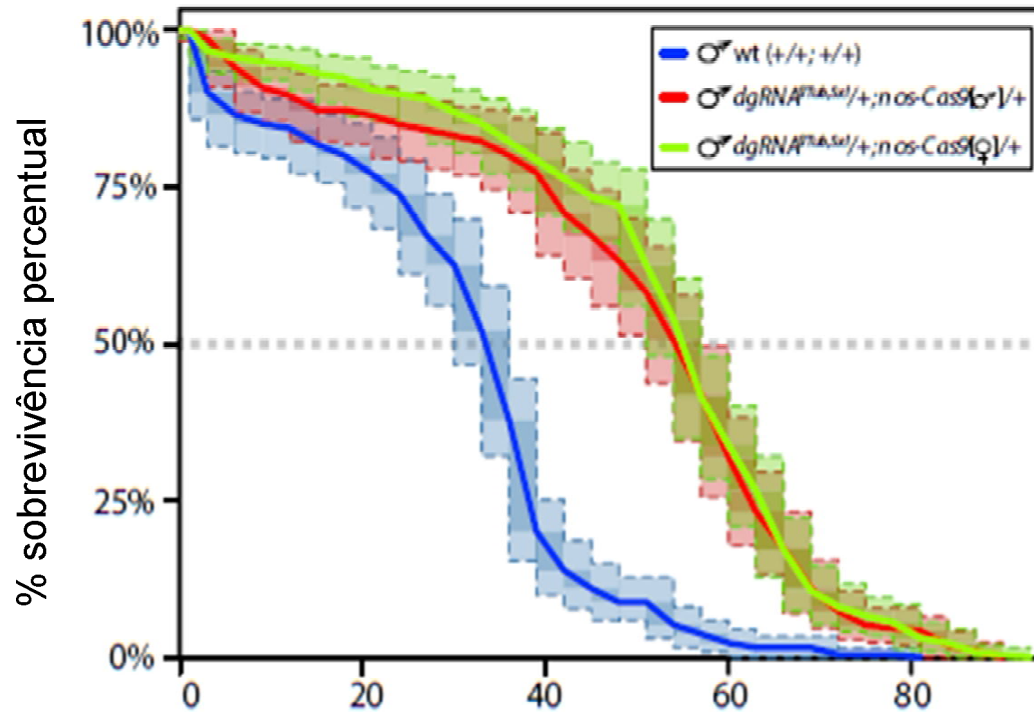


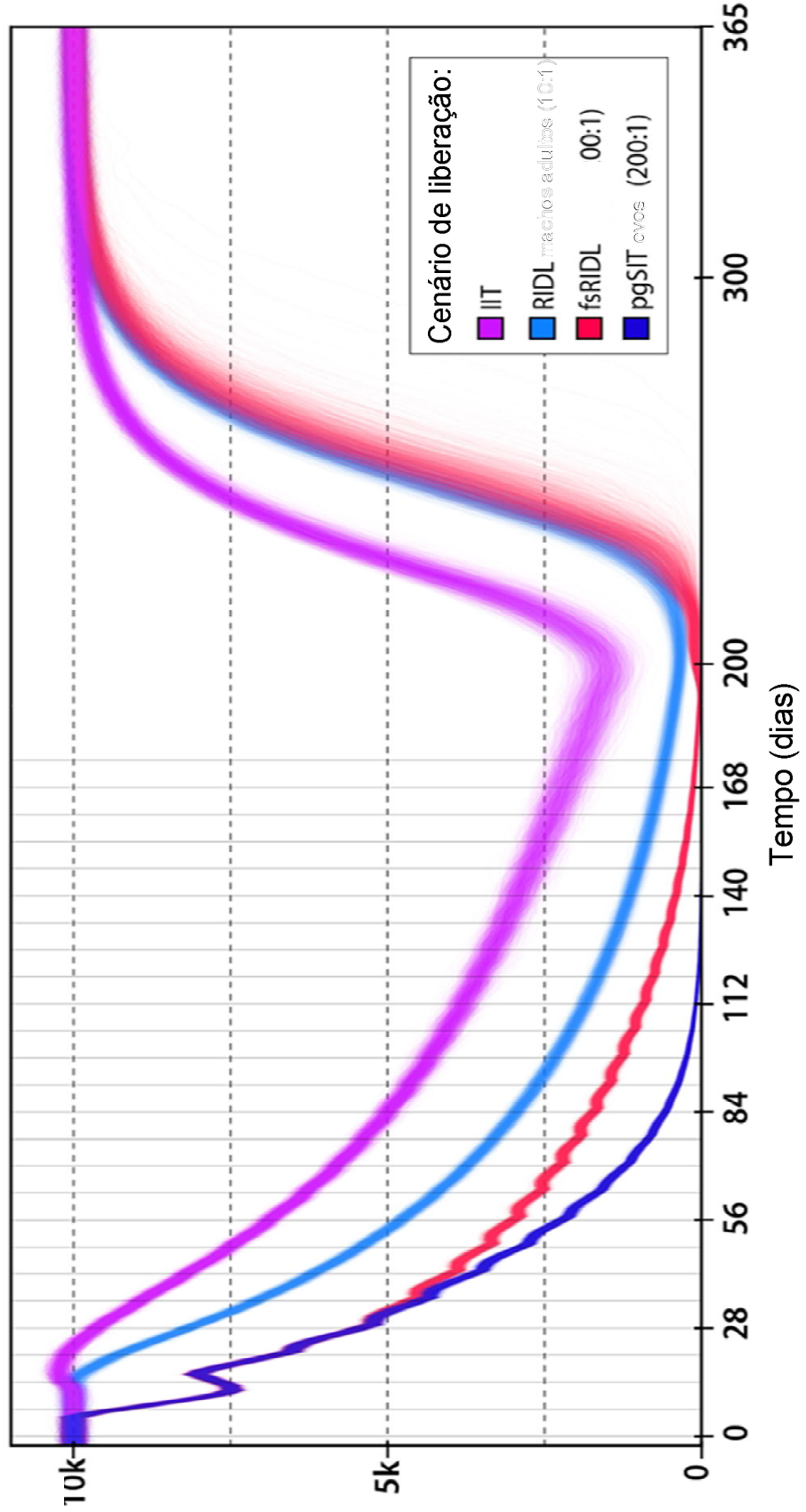
FIG. 4E

# réplica	Descrição de ♂ \	1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42
1	♂, control w-	50	47	45	45	45	44	44	39	34	26	25	18	12	5	1
2	♂, control w-	50	43	39	38	38	37	32	32	30	25	24	16	13	7	1
3	♂, control w-	50	49	45	45	45	45	45	44	44	42	35	25	13	3	1
4	♂, control w-	75	62	62	60	58	58	58	57	55	54	51	49	42	23	19
5	♂, control w-	50	47	47	46	46	41	41	40	40	38	37	35	24	17	16
1	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♂)/+	50	50	43	43	43	42	42	42	41	40	39	38	38	37	33
2	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♂)/+	50	50	48	43	42	41	41	40	40	40	40	39	39	37	33
3	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♂)/+	40	39	39	38	37	37	37	37	36	36	36	36	36	35	33
4	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♂)/+	40	38	38	37	37	35	35	34	33	33	33	33	31	29	27
5	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♂)/+	40	40	39	39	38	37	37	37	37	36	35	35	32	32	30
1	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♀)/+	50	45	43	42	42	42	42	41	41	41	41	40	38	38	38
2	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♀)/+	50	50	50	50	50	48	47	46	46	46	46	46	43	42	41
3	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♀)/+	50	49	49	48	48	47	47	47	46	45	41	38	38	37	36
4	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♀)/+	75	73	72	72	72	71	70	69	68	68	66	65	64	59	56
5	♂, dgRNA[bTub,Sxl]/+;nos-cas9(♀)/+	50	49	49	49	48	48	48	46	46	45	45	45	43	42	39

FIG. 4F

Estratégia	Parâmetro	Valor	Referência
Geral	Produção de ovos por fêmea (dia <sup>-1</sup> )	20	Otero et al., Bull. Math. Biol. 68, 1945–1974 (2006).
	Duração de estágio de ovos (dias)	5	Christophers, <i>Aedes aegypti</i> (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure Cambridge University Press; 1st edition (June 18, 2009).
	Duração de estágio larval (dias)	6	Christophers, 2009( <i>supra</i> ).
	Duração de estágio pupal (dias)	4	Christophers, 2009( <i>supra</i> ).
	Taxa de crescimento de população diária (dia <sup>-1</sup> )	1.175	Simoy et al., <i>Ecol. Modell.</i> , 314:100-110 (2015).
	Risco de mortalidade diária de estágio adulto (dia <sup>-1</sup> )	0.090	Focks et al., J. Med. Entomol., 30:1018-1028, (1993), Focks et al., J. Med. Entomol., 30:1003-1017, (1993); Horsfall, J. Econ. Entomol., 65:891-892, (1972); and Fay, <i>Mosq. News</i> , 24, 300-308 (1964).
	Tamanho de população fêmea adulta	10,000	Carvalho et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003864 (2015).
IIT	Redução da duração de vida de macho adulto	0.50	Yamada et al., J. Med. Entomol. 51, 811–816 (2014); Zhang et al., PLoS One 10, e0121126 (2015) <sup>1</sup> ; and Zhang et al., PLoS One 10, e0135194 (2015) <sup>2</sup> .
	Competitividade de	1.00	Bellini et al., J. Med. Entomol., 50:94-102, (2013); and Atyame et al., PLoS One, e0146834, doi:10.1371/journal.pone.0146834, (2016).
RIDL/ fsRIDL	Redução da duração de vida de macho adulto	0.18	Massonnet-Bruneel et al., PLoS One, e62711, (2013).
	Competitividade de acasalamento de macho	0.05	Carvalho et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003864 (2015); Harris et al., Nat. Biotechnol. 29, 1034–1037 (2011).
pgSIT	Redução da duração de vida de macho adulto	0.18	Massonnet-Bruneel et al., (2013) ( <i>supra</i> ).
	Competitividade de	0.78	FIG. 4B

FIG. 4G



Sensibilidade de previsões do modelo pgSIT para

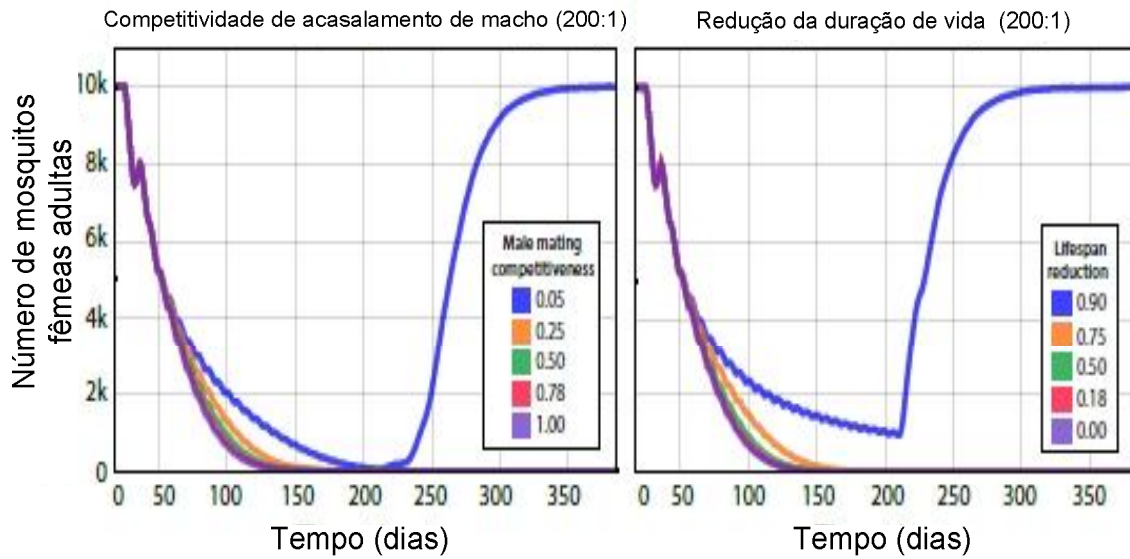
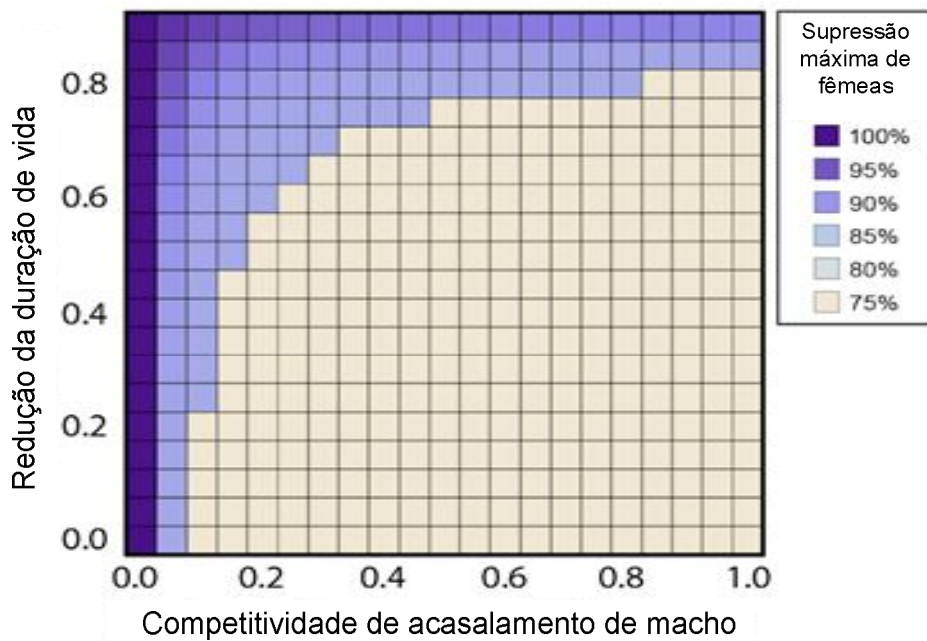


FIG. 4I  
Ovos psSIT (200:1)



Sensibilidade de previsões do modelo pgSIT para

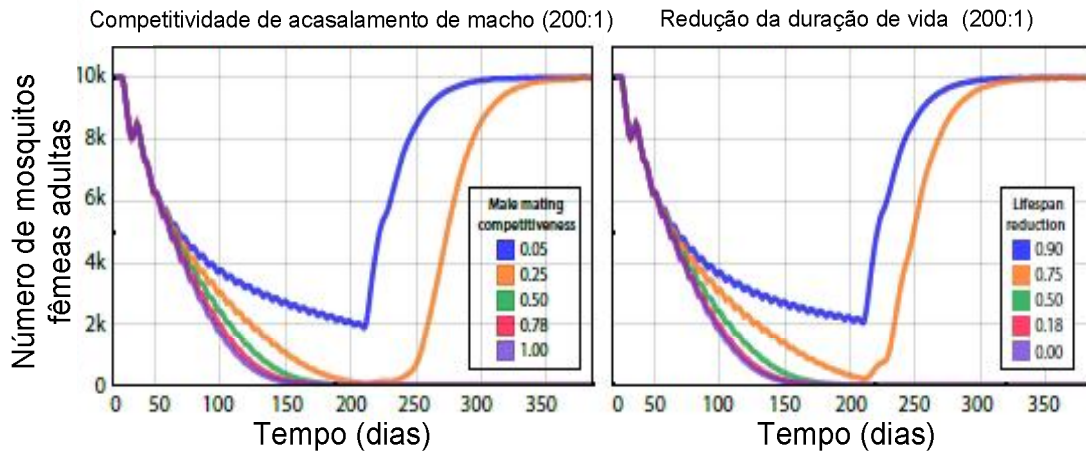


FIG. 4K

Ovos psSIT (100:1)

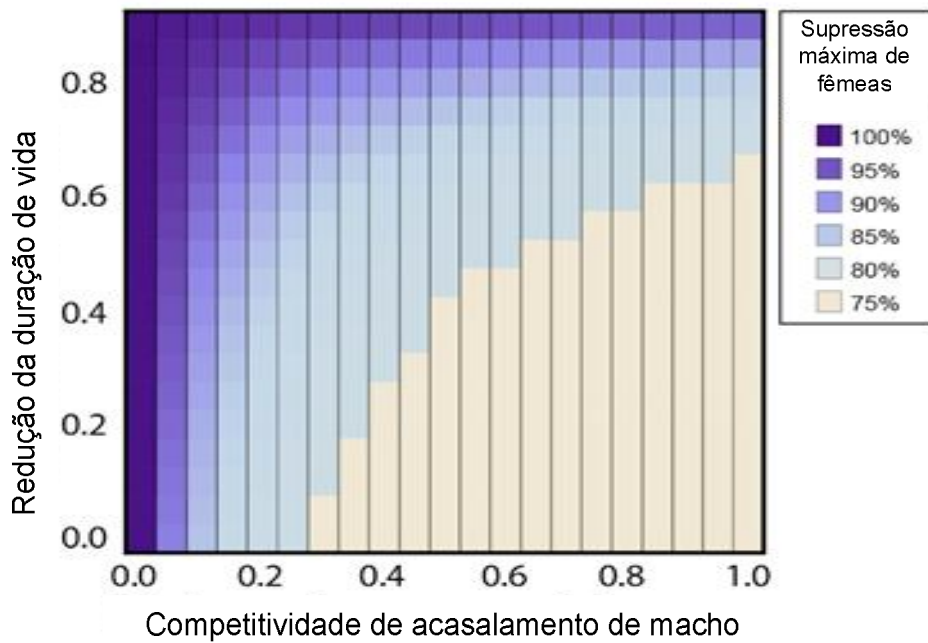
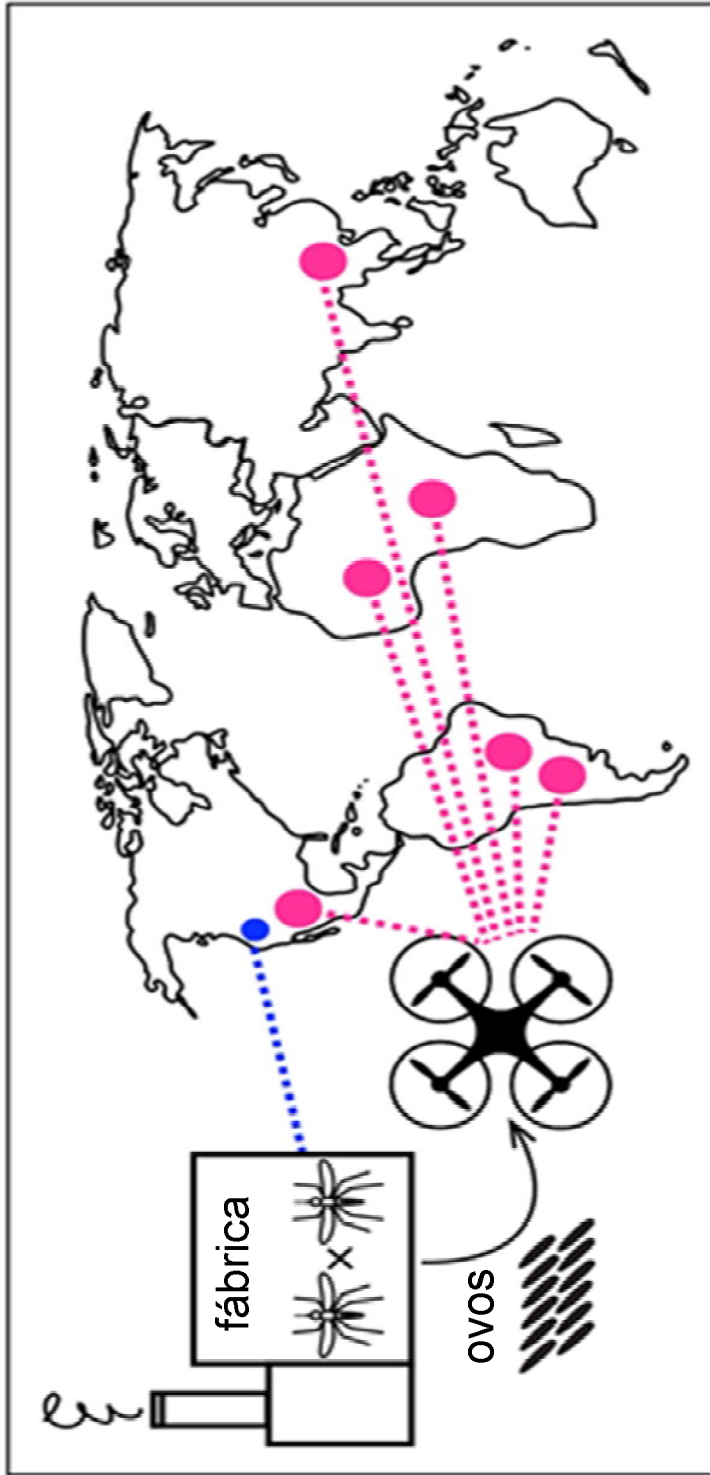




FIG. 5



### RESUMO

“MÉTODOS DE DIRIGIR SEXAGEM DE MACHO EM UMA PROGÊNIE DE INSETOS GENETICAMENTE MODIFICADOS, DE PRODUZIR UMA PROGÊNIE GENETICAMENTE MODIFICADA DE OVO DE INSETO MACHO ESTÉRIL, PROGÊNIE DE OVOS DE INSETO, INSETO MACHO ESTÉRIL GENETICAMENTE MODIFICADO, E, MÉTODO DE REDUZIR UMA POPULAÇÃO DE INSETOS DE TIPO SELVAGEM”

Métodos da técnica de inseto estéril guiada por precisão (pgSIT) descrita incluem métodos para dirigir sexagem de macho em um inseto geneticamente modificado e métodos de produzir uma progênie de ovo de inseto macho estéril geneticamente modificado. Estes métodos incluem a integração de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico em um genoma de um primeiro inseto, a pelo menos uma sequência de ácido nucleico tendo pelo menos um primeiro polinucleotídeo guia tendo como alvo uma sequência genômica essencial de fêmea que é requerida para uma viabilidade específica de fêmea, introdução de uma endonuclease em um segundo inseto, e cruzamento genético do primeiro inseto e do segundo inseto produzindo, assim, progênie expressando a endonuclease e a pelo menos uma sequência de ácido nucleico. Para a esterilidade de macho, um segundo polinucleotídeo guia tem como alvo uma sequência genômica de esterilidade de macho que é requerida para esterilidade específica de macho.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P-21657 LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS (1).txt
- Data de Geração do Código: 20/05/2020
- Hora de Geração do Código: 17:46:47
- Código de Controle:
  - Campo 1: FE6203F00B1FEE3B
  - Campo 2: 7682A809308F0BF9