

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

KÁRITAS FARIAS ALVES LIMA

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE MACHOS ESTERILIZADOS POR RADIAÇÃO  
GAMA, PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE CONTROLE POPULACIONAL  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

RECIFE

2015

**KÁRITAS FARIAS ALVES LIMA**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE MACHOS ESTERILIZADOS POR RADIAÇÃO  
GAMA, PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE CONTROLE POPULACIONAL  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos

Coorientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

RECIFE

2015

---

L732v Lima, Káritas Farias Alves.

Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Káritas Farias Alves Lima. - Recife: [s. n.], 2015.

85 p.: il., graf.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

Orientadores: Maria Alice Varjal de Melo Santos, Constância Flávia Junqueira Ayres.

1. *Aedes* – efeitos de radiação. 2. Controle de insetos. 3. Efeitos de Radiação. 4. Raios gama. 5. Infertilidade. I. Melo-Santos, Maria Alice Varjal. II. Ayres, Constância Flávia Junqueira. III. Título.

CDU 616.92

---

**KÁRITAS FARIAS ALVES LIMA**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE MACHOS ESTERILIZADOS POR RADIAÇÃO  
GAMA, PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE CONTROLE POPULACIONAL  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Data de aprovação: 31/7/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos (Orientadora)  
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Edvane Borges da Silva (Membro titular externo)  
Departamento de energia nuclear/UFPE

---

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (Membro titular interno)  
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Maria Alice Varjal, por acreditar em meu trabalho e lapidá-lo de todas as formas. Por representar a inteligência, perseverança e dedicação. Por todos os “esporros” e “brincas”, meu sincero obrigado.

À Dra. Rosângela Barbosa, Dra. Maria Helena e Dra. Duschinka pelo senso crítico construtivo em momentos deste trabalho.

À Dra. Cláudia Fontes, Dra. Edvane Borges e Dra. Ana Paula pela participação na qualificação deste trabalho.

Aos amigos Dr. Luís e Dr. Fábio do Departamento de Biologia Celular e Molecular, pelo carinho e amizade. Por todos os conselhos, “casquinhos”, conversas amigas e de bastante incentivo. Muito obrigado.

Ao Professor, amigo e tricolor Dr. Marcelo Paiva, que viu e participou desta caminhada desde os tempos mais primórdios. Por todos os conselhos, brincas e companheirismo, meu muitíssimo obrigado.

Aos amigos Rafael Padilha, Jana e Olávio do departamento de microscopia eletrônica, pelos ótimos momentos de ciência, experimentos e boas conversas.

Ao George, Rafael e Ju Carlos pelos cálculos estatísticos utilizados nos resultados deste trabalho.

À Dra. Edvane Borges, Sloana Giesta, André e ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE por todo envolvimento neste trabalho. Muito Obrigado.

À minha turma de mestrado, pelo companheirismo e bons momentos juntos fazendo e vivendo ciência.

A todos os amigos do departamento de Microbiologia, em especial ao Artur Leonel e Wagner Tenório.

Ao eterno amigo Ayslan Melo, por todos os conselhos, amizade e bons momentos. Muitas vitórias ainda virão. *Draco Dormiens Nunquam Titillandus.*

À família Leonel, especialmente a Camila Leonel, Zezé, Açucena, Venceslau e Nicéias pelos conselhos, companheirismo, noites mal dormidas de muito café e muito amor. Sou grato eternamente a vocês. Um cheiro na cabeça e obrigado por tudo.

À minha família, especialmente ao meu pai Ailton e minha mãe Deise que estiveram ao meu lado durante esta caminhada. Ao meu tio Alexandre e Tia Carmem, pela acolhida, pela impressora e milhões de papéis gastos ao longo desta jornada.

A todos do laboratório de Entomologia e do insetário por ter tornado este trabalho possível.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz pela infraestrutura e apoio financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta, influenciaram meu caminhar e produção científica.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

**(Isaac Newton)**

LIMA, K. F. A. **Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

Este estudo avaliou o desempenho biológico e reprodutivo de machos de *Aedes aegypti* esterilizados por radiação gama e seu potencial para uso no controle da espécie, através da técnica do inseto estéril (TIE). A eficácia de esterilização de diferentes doses de radiação gama, 30, 40 e 50 Gy, foi avaliada em machos irradiados (MI) na fase de pupa. O seu efeito sobre a longevidade e competitividade de acasalamento dos MI, sobre a fecundidade e fertilidade das fêmeas acasaladas com estes machos, bem como de fêmeas também irradiadas (FI), foram parâmetros analisados. Os testes de competitividade foram conduzidos em gaiolas teladas (2 X 2 m) em condições simuladas de campo, onde foram liberados machos irradiados e machos não irradiados (MNI), nas seguintes proporções: 5:1, 10:1 e 15:1. Os resultados revelaram que o *fitness* biológico e reprodutivo dos mosquitos são afetados pela radiação, de modo que os efeitos são diretamente proporcionais a dose de radiação utilizada. O parâmetro de longevidade apresentou diferenças significativas, tanto quando os MI foram analisados de forma individual quanto em grupo. Para a maior dose, MI e FI viveram em média  $19,6 \pm 2,2$  dias e  $25,8 \pm 2,2$  dias, respectivamente, enquanto que no grupo controle, estes valores foram de  $24,9 \pm 2,5$  dias e  $30,4 \pm 2,5$  dias. Foi observado também um efeito da radiação na fecundidade das fêmeas irradiadas (FI), visto que 100% delas não realizaram postura e na fertilidade de machos irradiados (MI), expostos às doses de 40 e 50 Gy, cujo cruzamento com fêmeas não irradiadas promoveu cerca de 80% e 100% de inviabilidade dos embriões. Nos experimentos de competitividade, na menor proporção (5:1) apenas 24,5% dos ovos estavam inviáveis, enquanto que nas proporções maiores (10:1 e 15:1) este percentual aumentou para cerca de 80%. Estes resultados sugerem que para a supressão de *A. aegypti* pela TIE, em campo, será necessária uma quantidade de machos estéreis, pelo menos, 10 vezes maior do que a de machos selvagens. Em conclusão, machos esterilizados por radiação gama parecem ser competitivos e com potencial para uso nas condições locais de campo, como um método espécie-específico de controle para *A. aegypti*.

**Palavras chave:** *Aedes aegypti*, controle genético, radiação gama.

LIMA, K. F. A. **Biological evaluation of sterilized males by gamma radiation for use in the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population control programs.** 2015. Dissertation (Masters in Bioscience and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## ABSTRACT

This study evaluated the biological and reproductive performance of *Aedes aegypti* males sterilized by gamma radiation and its potential for use in controlling the species through the Sterile Insect Technique (SIT). The sterilization efficacy of different doses of gamma radiation, 30, 40 and 50 Gy, was assessed in irradiated males (IM) in the pupal stage. The direct effects of gamma radiation on the longevity and competitiveness of IM, as well as the effect on the fecundity and fertility of females mated with these males, and also irradiated females (IF), were analyzed. The competitiveness was examined by tests conducted in large cage (2 x 2 meters) in semi field conditions where irradiated males (IM) and non-irradiated males (NIM) were released in the following proportions: 5:1, 10:1 and 15:1. The results revealed that the biological and reproductive fitness of the mosquitoes are affected by radiation, so that the effects are directly proportional to the radiation dose. The longevity parameter showed significant differences, especially regarding the group effect where, to the highest dose, IM and IF lived an average of  $19.6 \pm 2,2$  days and  $25.8 \pm 2,2$  days, respectively, while in the control, these values were  $24.9 \pm 2,5$  days and  $30.4 \pm 2,5$  days. It was also observed an effect of radiation on IF fertility, since 100% of them did not perform oviposition and IM fertility, exposed to the doses 40 and 50 Gy, which promoted around 80% and 100% unviable embryos, respectively. In semi field experiments in the minor proportion (5:1) only 24.5% of the eggs were infertile, while the larger ratios (10:1 and 15:1) this percentage increased to about 80%. These results suggest that the *A. aegypti* suppression by SIT in the field will require a large amount of the sterile males, at least 10 times higher than the wild males. In conclusion, males sterilized by gamma radiation appear to be competitive and with potential for use in local field conditions, as a species-specific control method for *A. aegypti*.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, genetic control, gamma radiation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> – Registros de utilização da Técnica do Inseto Estéril em culicídeos....	33
<b>Figura 1</b> – Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	18
<b>Figura 2</b> – Fases que compõem o ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .....	20
<b>Figura 3</b> – Criadouros naturais de <i>Aedes aegypti</i> .....	21
<b>Figura 4</b> – Criadouros artificiais de <i>Aedes aegypti</i> .....	22
<b>Figura 5</b> – Distribuição do vírus Dengue nos continentes .....	22
<b>Figura 6</b> – Mapa da circulação do vírus Dengue no Brasil .....	23
<b>Figura 7</b> – Charge “Oswaldo Cruz contra as doenças” .....	26
<b>Figura 8</b> – Espécies de insetos erradicadas pela TIE .....	31
<b>Figura 9</b> – Técnica do inseto estéril .....	35
<b>Figura 10</b> – Irradiador de armazenamento a seco e seus componentes .....	40
<b>Figura 11</b> – Irradiador panorâmico de larga escala .....	40
<b>Figura 12</b> – Esquema do efeito da radiação ionizante na molécula de DNA .....	41
<b>Figura 13</b> – Esquema da espermatogênese em mamíferos e insetos.....	43
<b>Figura 14</b> – Apresentação esquemática dos diferentes efeitos das radiações ionizantes sobre a ultraestrutura de cromossomos .....	44
<b>Figura 15</b> – Organograma representativo da metodologia utilizada no projeto .....	53
<b>Figura 16</b> – Distinção sexual entre pupas de <i>Aedes aegypti</i> .....	55
<b>Figura 17</b> – Acondicionamento de pupas de mosquitos para esterilização .....	55
<b>Figura 18</b> – Objetos utilizados para acondicionamento individual e coletivo de casais de mosquitos para a reprodução.....	57
<b>Figura 19</b> – Gaiola utilizada para os testes de competitividade em ambiente simulado de campo .....	60
<b>Figura 20</b> – Esquemática do ambiente interno do experimento de competitividade em campo simulado .....	60
<b>Figura 21</b> - Longevidade de machos de <i>Aedes aegypti</i> expostos a diferentes doses de radiação gama, em avaliação individual e em grupo .....	63
<b>Figura 22</b> – Morfologia de ovos viáveis (embrionados) e inviáveis (não fertilizados) submetidos à técnica de clarificação para detectar a presença de embrião, observada por microscopia óptica convencional.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Quadro 1</b> - Registro de utilização da Técnica do Inseto Estéril (TIE) em culicídeos, no período de 1960 a 1981.....	33
<b>Tabela 1</b> - Mortalidade de pupas acondicionadas em placas de Petri após o procedimento de irradiação em diferentes períodos de tempo e densidade .....	62
<b>Tabela 2</b> - Fecundidade e Fertilidade de fêmeas de <i>A. aegypti</i> acasaladas com machos submetidos à esterilização por radiação gama e longevidade de machos irradiados.....	64
<b>Tabela 3</b> - Experimento de competitividade entre machos de <i>Aedes aegypti</i> irradiados (estéreis) e não irradiados em condições simuladas de campo .....	66
<b>Tabela 4</b> - Valores das variáveis ambientais inferidos ao longo dos experimentos de competitividade reprodutiva dos machos estéreis de <i>A. aegypti</i> , em TCS .....	68
<b>Tabela 5</b> - Longevidade, fecundidade e fertilidade de fêmeas irradiadas com 50 e 40 Gy .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA** - Análise de Variância

**AW-IPM** – Area wide Integrated Pest Management (Programa Integrado para o Manejo de Pragas em Área Extensa)

**Bti** - *Bacillus thuringiensis israelenses*

**CPqAM** - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

**Co** – Cobalto

**DDT** – Diclorodifeniltricloroetano

**DENV** - Vírus Dengue

**FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz

**Gy** – Gray

**I** – Irradiado

**L1, L2, L3 e L4** - Larva de primeiro, segundo, terceiro e quarto estágio

**MoReNAa** - Rede de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas

**MS** - Ministério da saúde

**NI** - Não irradiado

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PEAa** - Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*

**PIACD** - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue

**PNCD** - Plano Nacional de Controle da Dengue

**RecL** - Linhagem Recife-Laboratório

**RIDL** - Release of Insects with Dominant Lethality (liberação de insetos com gene letal)

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**TIE** - Técnica do Inseto estéril

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	18
<b>2.1 <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762)</b> .....	18
<b>2.2 Importância epidemiológica do <i>Aedes aegypti</i> como vetor de dengue</b> .....	21
<b>2.3 Controle vetorial do <i>Aedes aegypti</i></b> .....	24
2.3.1 Controle de <i>Aedes aegypti</i> no Brasil: Histórico e cenário atual .....	25
<b>2.4 Um meio alternativo ao controle de insetos: Uma breve história da técnica do inseto estéril</b> .....	28
2.4.1 Aplicação da técnica do inseto estéril em mosquitos vetores .....	31
<b>2.5 Técnica do inseto estéril – Conceito e método</b> .....	33
2.5.1 Esterilização por radiação .....	37
2.5.2 Efeitos biológicos das radiações ionizantes .....	40
2.5.3 Embriogênese e gametogênese em <i>Aedes aegypti</i> .....	42
2.5.3.1 <i>Espermio gênese</i> .....	42
2.5.3.2 <i>Oogênese</i> .....	44
2.5.3.3 <i>Embriogênese</i> .....	45
<b>2.6 Viabilidade biológica de machos estéreis: Controle de qualidade na técnica do inseto estéril</b> .....	46
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	48
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	50
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	51
<b>6 OBJETIVOS</b> .....	52
6.1 Objetivo Geral .....	52
6.2 Objetivos Específicos .....	52
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
7.1 Colônia de <i>Aedes aegypti</i> .....	54
7.2 Sexagem pupal e preparação das amostras biológicas para irradiação ..	56
7.3 Avaliação das doses radioativas .....	56
7.4 Sobrevivência de pupas em placa de Petri .....	57
7.5 Verificação dos parâmetros biológicos de <i>A. aegypti</i> após processo de esterilização por radiação .....	58
7.6 Efeito da radiação gama sobre a reprodução de fêmeas .....	58

<b>7.7 Competitividade para o acasalamento: Teste em condições simuladas de campo (TCS) .....</b>	<b>58</b>
<b>7.8 Desenho experimental e análise de dados .....</b>	<b>61</b>
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>8.1 Sobrevivência de pupas ao meio de acondicionamento para esterilização</b>	<b>62</b>
<b>8.2 Desempenho biológico de machos de <i>Aedes aegypti</i> esterilizados por radiação gama .....</b>	<b>62</b>
8.2.1 Longevidade.....	62
8.2.2 Fecundidade e Fertilidade .....	64
<b>8.3 Competitividade para o acasalamento: Teste em condições simuladas e campo (TCS) .....</b>	<b>66</b>
<b>8.4 Desempenho reprodutivo de fêmeas submetidas à radiação gama.....</b>	<b>69</b>
<b>9 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>10 CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose transmitida por mosquitos de maior repercussão epidemiológica e expansão geográfica na atualidade. É estimado que cerca de 40% da população mundial viva em áreas endêmicas para a doença, resultando em mais de 120 milhões de pessoas infectadas anualmente (BHATT *et al.*, 2013; CENTER FOR DISEASES CONTROL, 2013; SHEPARD, 2011). O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor envolvido na transmissão do vírus Dengue em vários países, inclusive no Brasil, cuja circulação dos quatro sorotipos tem causado uma situação de hiperendemicidade da doença no país (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999). Apesar dos resultados promissores nos estudos clínicos de fase III com a vacina candidata tetravalente da Sanofir Pasteur, iniciado em 2011 (GUY *et al.*, 2011), esta ou outras ainda não estão disponíveis, o que tem reforçado o importante papel do controle vetorial como estratégia para reduzir a incidência da doença e prevenir surtos epidêmicos (BHATT *et al.*, 2013; GUBLER *et al.* 1994).

As ações utilizadas para controle populacional de *A. aegypti*, em âmbito mundial, estão centradas na eliminação mecânica de criadouros e na utilização de inseticidas químicos (BHATT *et al.*, 2013; BRAGA; VALLE 2007; DONALISIO, 2002; GUBLER *et al.*, 1994). Outros agentes/ferramentas de controle como larvicidas biológicos, predadores (BECKER *et al.*, 2003) e armadilhas (ovitrampas) para a coleta e destruição de milhares de ovos do mosquito (REGIS *et al.*, 2013), são utilizados como métodos alternativos, de forma bem restrita.

No Brasil, o uso de inseticidas químicos como o temephos, cipermetrina, deltametrina e outros tem levado a seleção de populações de *A. aegypti* resistentes e conseqüentemente, ampliado as dificuldades de controle vetorial no âmbito do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (ARAÚJO *et al.*, 2013; BRASIL, 2006; LIMA *et al.*, 2003; MONTELLA *et al.*, 2007).

Larvicidas biológicos a base de bactérias entomopatogênicas como *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti) foram utilizados no PNCD, no período de 2000 a 2009, como medida de manejo da resistência ao temephos, pois, além de ser eficiente contra *A. aegypti*, apresenta mecanismo de ação seletivo e diferenciado dos inseticidas químicos (BECKER *et al.*, 2003). Na sequência, outros inseticidas como, os inibidores de síntese de quitina (Diflubenzuron e Novaluron) e mais recentemente, análogos do hormônio juvenil (Pyriproxyfen) passaram a fazer parte

do esquema de rotatividade entre compostos para o controle de formas jovens do mosquito (ARAÚJO *et al.*, 2013; ABAD-FRANCH *et al.*, 2015; BRAGA, VALLE 2007).

O tratamento dos criadouros com produtos larvicidas apesar de representar a forma mais indicada de controle para a maioria das espécies de mosquitos, sua efetividade está diretamente relacionada ao percentual de cobertura, o que implica dizer que, para manter as populações em baixas densidades por longos períodos, a cobertura de tratamento dos criadouros deve ser muito elevada (BECKER *et al.*, 2003). Neste contexto, é importante ressaltar que o comportamento de oviposição de *A. aegypti*, caracterizado pela capacidade de distribuir grupos de ovos em qualquer tipo de objeto que possa acumular água, favorece a multiplicidade de criadouros (BECKER, 2000; REGIS *et al.*, 2008) e a existência de criadouros crípticos do mosquito, aspectos que podem dificultar ainda mais seu controle populacional (AYRES *et al.*, 2004).

Desta forma, a clara necessidade de agregar as atuais ações de controle do PNCD estratégias alternativas, dirigidas as outras fases de vida do mosquito, inclusive aquelas baseadas no controle autocida, como a Técnica do Inseto Estéril (TIE), geraram alguns estudos voltados à avaliação desta abordagem para o controle de *A. aegypti*.

A TIE está baseada no conceito de liberação de insetos estéreis para o autocontrole das populações-alvo (KNIPLING, 1955). Compreende a criação massiva de insetos machos de uma determinada espécie, seguida de esterilização e liberação em uma área alvo. Os machos estéreis ao acasalarem com fêmeas selvagens inviabilizam suas proles, e os efeitos são mais evidentes quando as fêmeas só acasalam uma vez ao longo da sua vida (ROBINSON, 2002). Por se tratar de uma técnica baseada na reprodução/acasalamento é considerada espécie-específica, sendo, portanto segura para outros organismos não-alvo e ambientalmente limpa, por não gerar resíduos químicos que possam se acumular no ambiente (ALPHEY, 2002; DYCK *et al.*, 2005; PAPATHANOS *et al.* 2009; PHUC *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2011; WILKE *et al.*, 2009).

A esterilidade pode ser induzida expondo o inseto a agentes mutagênicos tais como, à radiação gama, raios-x e quimioesterilizantes. Este tipo de exposição ocasiona danos nos genes, como fragmentações cromossômicas, anomalias e mutações letais, interferindo assim na função e no desenvolvimento de algumas

células, entre estas, os gametas, ocasionando esterilidade no indivíduo exposto (BAKRI *et al.*, 2005; ROBINSON, 2002).

Desde 1952, a técnica do inseto estéril tem sido utilizada com sucesso no controle de pragas agrícolas (KLASSEN; CURTIS, 2005) e algumas espécies de vetores, como a *Cochliomyia hominivorax* (HENDRICHS *et al.* 1995). Avaliações do potencial da TIE para controle populacional de *A. aegypti* foram iniciadas na década de 1960 (BENEDICT; ROBSON, 2003). No entanto, limitações impostas pela tecnologia da época e o pouco conhecimento sobre os aspectos bioecológicos desta espécie, levaram a resultados inexpressivos de supressão populacional. Com a crescente popularização dos inseticidas químicos nesta mesma época, a preferência por estes compostos devido ao seu rápido efeito de controle sobre as espécies e sua repercussão na redução de casos de algumas doenças, preponderou, levando a um abandono dos estudos com a TIE para controle de vetores (BECKER *et al.*, 2003).

Resultados significativos de controle populacional com o uso da TIE requerem a superação de alguns obstáculos decorrentes do processo de esterilização. Doses excessivas de radiação ionizante podem gerar um elevado custo biológico aos machos estéreis, interferindo em aspectos como competitividade para copular com fêmeas selvagens e longevidade/viabilidade no habitat natural (ALPHEY *et al.*, 2009; BAKRI *et al.*, 2005). Portanto, é de suma importância, avaliar a qualidade e viabilidade biológica do macho estéril, enquanto produto biotecnológico. Além disso, implantar sistemas eficientes para produção destes insetos em massa e para a logística de sua liberação em campo são requisitos não menos importantes para o desenvolvimento e aplicabilidade da TIE (BARRY *et al.*, 2003; HELINSKI *et al.*, 2009; PAPATHANOS, *et al.*, 2009; WILKE *et al.*, 2009).

Este trabalho, portanto, se propôs a avaliar a viabilidade biológica de mosquitos esterilizados por radiação gama para seu uso em programas de controle populacional de *A. aegypti*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 *Aedes aegypti* LINNAEUS, 1762

*Aedes aegypti* é um díptero da família Culicidae, pertencente à subfamília Culicinae, cuja forma adulta, apresenta coloração geral enegrecida, com faixas branco-prateadas no tórax, formando um padrão de linhas característico da espécie que se assemelha a uma “lira” (Figura 1) (BECKER *et al.*, 2003; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Figura 1 - Mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Godoi (2008).

Nota: Destaque para o desenho em forma de “lira”.

Esta espécie é oriunda da África, tendo sido descrita inicialmente no Egito. Encontra-se distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Sua distribuição e expansão geográfica são influenciadas por múltiplos fatores ambientais, sobretudo a temperatura (GLASSER; GOMES, 2002). Possivelmente, foi introduzida no Brasil durante o período colonial, através do tráfico de escravos provenientes de regiões onde o mosquito já existia. A adaptação desta espécie aos ambientes urbanos está associada à presença de múltiplas áreas adequadas ao desenvolvimento de suas formas jovens e a seu elevado grau de domiciliação (ACIOLI, 2006).

*A. aegypti* apresenta um curto ciclo de vida, o qual pode se completar no período de 15 a 30 dias em regiões tropicais, e seu desenvolvimento, compreende quatro estágios: ovo, larva (quatro estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 2). O tempo de desenvolvimento das larvas varia em função da temperatura

da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional de indivíduos presentes nos criadouros (CLEMENTS, 1992).

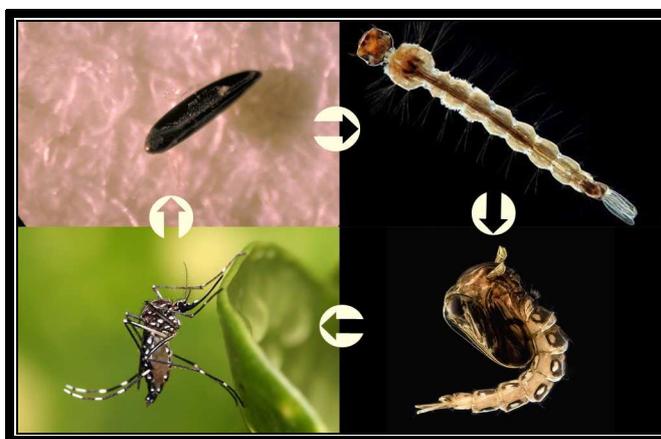
O primeiro estágio larval (L1 com ~ 2,5 mm) dura de 36 a 48 h, o segundo (L2 com ~ 3,9 mm) de 24 a 36 h, o terceiro (L3 com ~ 5,05 mm) 36 a 48 h e o quarto e último (L4 com ~ 7,3 mm) de 48 a 72 h (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2009). Após o quarto e último estágio larval, ocorre a primeira metamorfose e a passagem para a fase de pupa. Nesta fase, os indivíduos não mais se alimentam e utilizam as reservas energéticas, armazenadas durante o estágio larval para a realização da segunda metamorfose. Após 48 a 72 h da pupa emerge a forma alada do mosquito (BESERRA, *et al.*, 2009).

Na forma de mosquitos adultos, machos e fêmeas, buscam por fontes de carboidratos, adquiridos na alimentação de seivas vegetais, essenciais ao seu metabolismo básico. Além disso, as fêmeas também necessitam de alimentação sanguínea para a produção de ovos. A maturidade sexual é alcançada aproximadamente 24 h após a passagem para a fase adulta. A fêmea está disponível para o acasalamento uma única vez (monogamia), e nesta ocasião, geralmente copula com apenas um macho, reservando o conteúdo espermático transferido em três espermatecas. Estas estruturas são fundamentais para armazenar de forma viável os espermatozoides ao longo do período de vida da fêmea (CLEMENTS, 1992). Múltiplas inseminações são menos frequentes e podem ocorrer caso a fêmea não tenha preenchido completamente as espermatecas. As fêmeas vivem em média 45 dias e os machos um pouco menos (CLEMENTS, 1992; SILVA, 1999).

Fêmeas, uma vez inseminadas, podem produzir uma quantidade abundante de ovos férteis, desde que alimentadas com sangue. *A. aegypti* apresenta alto grau de antropofilia. A atividade hematofágica é diurna e após o repasto sanguíneo a fêmea procura no ambiente, intra ou peridomiciliar, locais para repouso, enquanto realiza a digestão sanguínea, em um período de até 72 h. A fêmea poderá realizar mais de um repasto para produzir e depositar uma mesma bateria de ovos, caracterizando assim a discordância gonadotrófica da espécie. Cerca de 90 a 120 ovos podem ser produzidos por uma fêmea em cada ciclo de oviposição. Os ovos são depositados de forma individual nas paredes internas dos recipientes, próximos à lâmina d'água (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Em condições ambientais adversas, sobretudo relacionadas à ausência de água, os ovos podem entrar em quiescência (dormência), um período de interrupção temporária do processo final de eclosão das larvas, podendo permanecer viáveis no ambiente por períodos superiores há um ano (SILVA, 1999). Este último aspecto é de grande importância, por representar a principal forma de permanência e dispersão passiva de *A. aegypti* no ambiente. Além disto, as fêmeas têm o hábito de distribuir pequenos grupos de ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico em mais de um criadouro, comportamento este que potencializa sua dispersão e dificulta as ações de controle e vigilância (BRAGA; VALLE, 2007; REITER *et al.*, 1991).

**Figura 2** - Fases que compõem o ciclo biológico de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de University of Florida (2008).

Nota: Em sentido horário: Ovo, larva, pupa e adulto alado.

Os criadouros utilizados por *A. aegypti* podem ser naturais (internódios de bambu, ocos em árvores, casca de frutas e outros) (Figura 3) ou artificiais, originados por objetos deixados a céu aberto preenchidos por água pluvial, como pneus, latas, vasos de plantas, ou ainda aqueles utilizados pelo homem para armazenar água como, caixas d'água, tonéis, tanques, cisternas, piscinas entre outros (Figura 4) (FORATTINI, 2002).

A estratégia de rápido crescimento populacional de *A. aegypti* decorre principalmente da sua capacidade de colonizar uma ampla diversidade de criadouros, aliada ainda a sua elevada fecundidade e curto ciclo de desenvolvimento pós-embrionário (REGIS, *et al.*, 2013). Tais características o definem como insetos "r-estrategistas" cuja sobrevivência da população está baseada na capacidade de colonização de habitats instáveis, aliada a uma elevada fecundidade/fertilidade, gerando acentuadas flutuações de densidade populacional (SCHOFIELD, 1991).

**Figura 3** - Criadouros naturais de *Aedes aegypti*

Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Da esquerda para direita: Internódios de bambu, oco de árvore, plantas.

**Figura 4** - Criadouros artificiais de *Aedes aegypti*

Fonte: Elaborado pelo autor

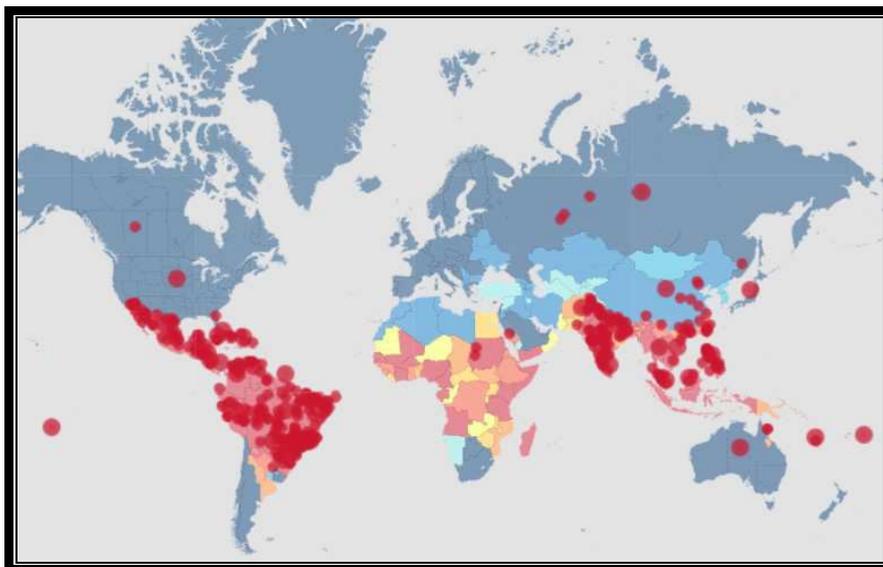
Nota: Da esquerda para direita: Pneus sem uso, caixas d'água, piscinas, vasos de plantas

## 2.2 Importância epidemiológica de *Aedes aegypti* como vetor de dengue

O vírus Dengue (DENV) é transmitido ao ser humano, através da picada de fêmeas de mosquitos infectados pertencentes ao subgênero *Stegomyia*, sendo que a espécie *A. aegypti* é considerada a única implicada no ciclo de transmissão da doença no Brasil (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O DENV aparenta ter evoluído originalmente na Ásia, espalhando-se, posteriormente, aos demais continentes (GUBLER, 1998). Pertencente ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, o DENV possui quatro sorotipos virais bem caracterizados, (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (GUBLER, 1998), com possibilidade do quinto sorotipo (DENV-5), isolado na Malásia (CIDRAP, 2013).

A transmissão horizontal do vírus para o mosquito ocorre após o repasto sanguíneo em um ser humano infectado. Cerca de sete dias após este contato (período de incubação extrínseca) a fêmea do mosquito fica apta a transmitir o vírus ao longo da sua vida, inclusive aos seus descendentes por transmissão vertical ou transovariana (transmissão para os ovos) (KHIN; THAN, 1983; JOSHI *et al.*, 1996).

**Figura 5** - Distribuição do vírus dengue nos continentes.

Fonte: Centers of Disease and Prevention (2013).

Nota: Simbologia vermelha representa os registros de casos de dengue, enquanto que as áreas demarcadas em roxo e amarelo representam respectivamente regiões de maior e menor risco para a doença.

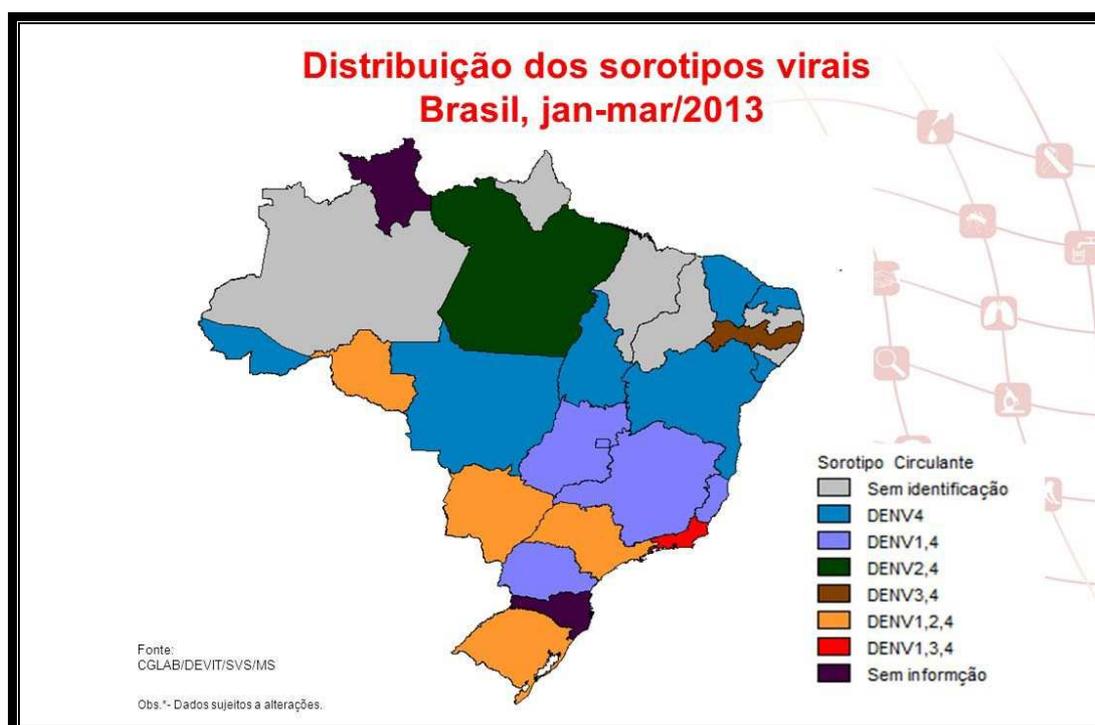
Atualmente, os diferentes sorotipos virais circulam em mais de 100 países, muitas vezes simultaneamente, resultando na ocorrência de 50 a 100 milhões de casos anuais (Figura 5) (SHEPARD, 2011; CDC, 2014). Pacientes infectados podem apresentar aspecto clínico de infecção branda (dengue clássico), até quadros de hemorragia e choque hipovolêmico (dengue hemorrágico), podendo evoluir para óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A difusão do vírus Dengue está intimamente ligada à expansão do mosquito *A. aegypti* no mundo, impulsionado pela intensa movimentação humana, ocupação desordenada dos grandes centros urbanos e ineficiência dos sistemas de vigilância epidemiológica e controle vetorial. No Brasil, a primeira epidemia de dengue clássico, laboratorialmente diagnosticada, ocorreu no estado de Roraima, na cidade de Boa Vista, em 1982. Entretanto, foi a partir da introdução do DENV-1, no Rio de Janeiro em 1986, que a doença tomou proporções maiores no país (NOGUEIRA; EPPINGHAUS, 2011).

No ano de 1998, todos os estados brasileiros encontravam-se infestados pelo *A. aegypti* e em 19 deles, a transmissão viral já estava estabelecida, com circulação simultânea de DENV-1 e 2, sobretudo nas regiões Nordeste e Sudeste do país (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

Um fato que agravou a situação epidemiológica da dengue no Brasil, foi à introdução do DENV-3 e DENV-4, concomitante à circulação dos demais sorotipos no país (Figura 6), caracterizando uma situação de hiperendemicidade, o que pode aumentar ainda mais o número de casos graves da doença nos próximos anos. Dados atualizados mostram que apenas no ano de 2013 no Brasil, houve cerca de 1.452.489 casos confirmados de dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

**Figura 6** – Mapa da circulação do vírus dengue no Brasil



Fonte: Ministério da Saúde (2013).

Nota: Distribuição dos sorotipos do vírus dengue nos estados brasileiros no período de janeiro a Março de 2013.

### 2.3 Controle vetorial de *Aedes aegypti*

Um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento, é reduzir o aparecimento de surtos epidêmicos de dengue (GUBLER *et al.*, 1994). A indisponibilidade para o Sistema único de Saúde (SUS) de uma vacina efetiva contra todos os sorotipos virais, aliada ao rápido desenvolvimento do mosquito em áreas urbanas, tornou o controle do vetor a principal estratégia para prevenir novas epidemias. O controle de insetos vetores em saúde pública é realizado com o objetivo de reduzir a densidade populacional de uma espécie-alvo, de forma consistente e progressiva, minimizando a ocorrência de surtos e epidemias (BRAGA; VALLE, 2007).

Dentre os diversos meios de controle vetorial, os inseticidas químicos têm sido os mais utilizados. O uso de compostos químicos com ação inseticida obteve seu marco em 1939, com a introdução do diclorodifeniltricloroetano, conhecido popularmente como DDT. Este inseticida se tornou o composto químico mais famoso e mais utilizado do século 20. Logo em seguida, outros compostos com atividade inseticida foram sintetizados como os organofosforados na Alemanha, os carbamatos na Suíça, e entre 1960-1970, os piretróides no Japão e no Reino Unido (BECKER *et al.*, 2003). *A priori*, o controle por inseticidas mostrou-se bastante eficaz, no entanto, foi observado com o tempo, que certas espécies tinham habilidade de desenvolver mecanismos de resistência a diversas classes destes compostos químicos, especialmente em resposta ao uso excessivo dos mesmos em campo (BECKER *et al.*, 2003) A aplicação constante de um mesmo produto químico exerce uma pressão contínua de seleção, aumentando a frequência relativa de alguns indivíduos "previamente adaptados" presentes em uma população, caracterizando assim um exemplo típico de evolução Darwiniana.

Outros aspectos negativos associados ao uso dos inseticidas químicos acabaram sendo considerados, como o seu amplo espectro de ação, o qual atinge espécies animais não-alvo, provocando um alto impacto ambiental e o aumento do risco à saúde humana, através da exposição direta e indireta (alimentos e água contaminados) aos compostos químicos. Esses fatores levaram à busca de agentes de controle mais eficazes e, sobretudo mais seguros (BECKER *et al.*, 2003; BROGDON; MCALLISTER, 1998.)

O controle biológico por meio do uso de peixes larvófagos e principalmente por biolarvicidas à base de bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (atual *Lysinibacillus sphaericus*), se tornou bastante eficaz para o controle de diferentes espécies de dipteros aquáticos. Este meio alternativo de controle tem sido utilizado em vários países, inclusive no Brasil para controle de simúlideos (borrachudos) e mosquitos (*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*) (ARAÚJO-COUTINHO, 1995; DONALISIO, 2002; CAPALBO *et al.*, 2008; MARDINI *et al.*, 1999; 2000; REGIS *et al.*, 2001; 2013).

Os biolarvicidas possuem características que favorecem sua utilização em programas de controle, tais como modo de ação específico, segurança para o meio ambiente e facilidade de produção em larga escala (COUCH, 2000). *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus*, são bactérias Gram-positivas, saprófitas de solos e ambientes aquáticos e, quando submetidas a condições adversas, produzem cristais proteicos durante a sua fase de esporulação, em forma de protoxinas de alto poder inseticida (DE BARJAC, 1990). A adoção destes biolarvicidas representa um importante marco na história do controle de vetores em saúde pública (REGIS *et al.*, 2001).

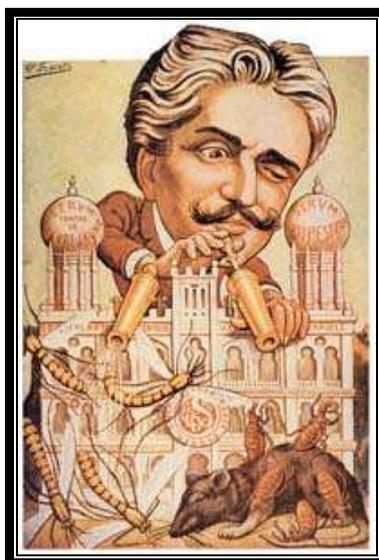
Outro método de controle vetorial extremamente efetivo é o físico/mecânico, no qual ações de saneamento, coleta de resíduos sólidos do ambiente, regularidade no abastecimento de água e outras, levam a eliminação de criadouros reais e potenciais das formas aquáticas do mosquito. Além destas outras medidas complementares de controle direcionadas às atividades preventivas (campanhas voltadas à população, recomendando práticas simples e eficazes direcionadas a eliminação de criadouros do mosquito) e ações de vigilância e monitoramento, também desempenham um papel decisivo na avaliação do impacto das medidas de controle sobre a população do inseto vetor e no redirecionamento destas ações no país (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

### 2.3.1 Controle de *Aedes aegypti* no Brasil: histórico e cenário atual

O controle de *A. aegypti*, considerado vetor primário da febre amarela urbana e da dengue, tem sido um dos maiores desafios direcionados à saúde pública no

Brasil. Várias campanhas foram realizadas na tentativa de erradicar esta espécie, a primeira iniciada por Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (1902-1907) (Figura 7). Durante estas campanhas foram instituídas ações sanitárias que tinham como função detectar e eliminar os focos deste mosquito. Em seguida, outras campanhas foram realizadas entre 1930-1940, incentivadas pela Fundação Rockefeller atuando sobre cidades litorâneas (BRAGA; VALLE, 2007). Nestas décadas, as principais estratégias de controle estavam essencialmente baseadas no uso de produtos químicos como o acetoarsenito de cobre, um inseticida sintético inorgânico de alta toxicidade (SOPER, 1965).

**Figura 7** - Charge “Oswaldo Cruz contra as doenças”



Fonte: Biblioteca virtual Oswaldo Cruz (2012).

Nota: Charge publicada na França em 1911 mostra Oswaldo Cruz combatendo a febre amarela e a peste bubônica.

Em 1947, o Brasil participou da campanha de eliminação hemisférica de *A. aegypti* conduzida pela Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) junto com a Organização Mundial de Saúde (OMS), visando prevenir epidemias urbanas de febre amarela. Este programa eliminou o mosquito vetor em 19 países, representando mais de 73% da área primeiramente infestada (GUBLER, 1997; MONATH, 1994; SCHLEISSMAN; CALHEIROS, 1974).

Durante a mesma época, a utilização de inseticidas sintéticos orgânicos que apresentavam amplo espectro de atividade e baixo custo, como o DDT, foi amplamente difundida. Em 1967, a eliminação do *A. aegypti* havia sido considerada um sucesso, até o reaparecimento do mosquito em alguns estados do país em 1976

(ROZENDAAL, 1997) Naquele ano, como consequência de mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização, e de falhas nos programas de vigilância epidemiológica, foi confirmada a reintrodução do *A. aegypti* em várias regiões do Brasil (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). A utilização exclusiva de organofosforados por quase 20 anos de forma intensiva, teve como consequência, o aparecimento de populações de *A. aegypti* resistentes aos compostos, em diversos países, dificultado a redução populacional do vetor, levando a um aumento dos casos de dengue (CRINNION, 2000).

Com o agravamento epidemiológico da dengue no Brasil, em 1996 foi implantado o Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), resultando no fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). As ações de prevenção e combate ao *A. aegypti* em campo, estavam quase que exclusivamente centradas no uso de inseticidas químicos.

A circulação intensa de um ou dois sorotipos do vírus Dengue em quase todos os estados brasileiros a partir de 1998, seguida da introdução de novos sorotipos, denunciavam o elevado risco de epidemias de dengue, e culminaram em 2001 com a elaboração do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD). Este plano estava voltado à redução dos níveis de infestação vetorial e a intensificação das medidas de controle em áreas consideradas mais críticas, cerca de 600 municípios brasileiros. Diferente do observado com a campanha contra a febre amarela, essa estratégia se mostrou incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue no país. Mais uma vez, as ações não alcançaram resultados que modificassem o cenário epidemiológico da dengue (BRAGA: VALLE, 2007), o que levou, em 2002, ao abandono definitivo da proposta de erradicação do mosquito e a estruturação do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), vigente até o momento, cujas ações estão voltadas ao controle populacional de *A. aegypti* (ARAÚJO *et al.*, 2013; BRAGA: VALLE, 2007; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Em 1999, foi criada a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* a Inseticidas (Rede MoReNAa), coordenada pelo Ministério da Saúde, responsável pelo monitoramento da susceptibilidade das populações de *A. aegypti* aos inseticidas químicos, larvicidas e adulticidas, empregados em seu controle (ARAÚJO *et al.*, 2013; BRAGA, VALLE 2007).

Populações de *A. aegypti* resistentes, sobretudo ao larvicida temephos, passaram a ser detectadas em campo a partir de 2000. Desde então, a principal estratégia encontrada para o manejo da resistência aos inseticidas empregados no PNCD tem sido a rotatividade entre compostos que apresentam diferentes modos de ação, especialmente para o tratamento focal dos criadouros das formas jovens do mosquito. Biolarvicidas à base de Bti foram os primeiros a serem amplamente utilizados em substituição ao temephos no período de 2000 até 2009, seguido dos inibidores de síntese de quitina (Diflubenzuron e Novaluron) em 2010/2014 e mais recentemente, 2014/2015, dos análogos do hormônio juvenil (Pyriproxyfen) (ABAD-FRANCH *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2013; BRAGA, VALLE 2007; CAPALBO *et al.*, 2008).

#### **2.4 Alternativas ao controle de insetos: Uma breve história da Técnica do inseto estéril**

O final do século XIX foi marcado por grandes descobertas científicas, entre elas, a radioatividade e os raios X. Esse fato gerou uma verdadeira revolução no pensamento científico da época, pois, até então se achava que o átomo era algo impenetrável e imutável (NAVARRO *et al.*, 2008). A partir destes achados, o uso das radiações ionizantes se estendeu a diversas áreas, sendo aplicada inicialmente na medicina e logo em seguida, empregada em áreas como engenharia e agricultura (MOULD, 1995).

Runner (1916) demonstrou os primeiros efeitos da radiação ionizante em insetos, no coleóptero *Lasioderma serricorne*, pertencente à família dos Anobídeos, o mesmo era praga das plantações de tabaco, considerada na época o mais importante cultivo não comestível do mundo. Utilizando doses de raios X, Runner tornou estes insetos incapazes de se reproduzir (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1989; MASTRANGELO; RUNNER, 1916; WALDER, 2011).

Muller em 1927 demonstrou que a radiação ionizante provocava um grande número de mutações letais na mosca *Drosophila melanogaster*, sendo uma das principais consequências a infertilidade nas fêmeas (MULLER, 1927; KLASSEN; CURTIS, 2005).

Nos anos seguintes, a ideia de introduzir a esterilidade em insetos foi amplamente difundida no mundo. Diferentes meios para induzir esterilidade foram descobertos, como os quimioesterilizantes (alquilantes e triazinas), radiação gama (Cobalto-60), translocação cromossômica e incompatibilidade citoplasmática (bactérias simbiotes) (BENEDICT; ROBINSON, 2003). Mais de 2.800 referências na literatura foram publicadas ao longo das últimas seis décadas, contendo estudos com mais de 300 espécies de artrópodos, muitas delas de grande importância econômica, já que boa parte dos prejuízos, especialmente na área agrícola, era ocasionada pelo alastramento de pragas em plantações e animais (BAKRI *et al.*, 2005).

Nos anos de 1950, no entanto, foi o momento em que a técnica do inseto estéril obteve o êxito mais significativo, quando a mesma foi integrada a um programa de controle de pragas que tinha como objetivo reduzir a população de *Cochliomyia hominivorax*, uma espécie de mosca que possui como característica, o hábito de depositar seus ovos em tecidos lesionados de animais de sangue quente para o desenvolvimento de suas larvas. Esta mosca possuía uma alta incidência no continente americano e afetava principalmente a bovinocultura da época (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Desde 1930, já se faziam estudos sobre a *C. hominivorax*, tendo sido o primeiro inseto criado com dietas artificiais em laboratório, possibilitando sua criação em massa e estudos (MELVIN; BUSHLAND, 1936). Isto permitiu a Knipling, um dos pesquisadores responsáveis pela criação da técnica do inseto estéril e seus principais conceitos, em 1951, observar e estudar traços comportamentais da *C. hominivorax*, como por exemplo, o aspecto monogâmico das fêmeas desta espécie, que copulam uma única vez durante sua vida. Este fato possibilitou a formulação de um modelo, o qual considerava, que se a esterilidade fosse capaz de ser induzida em insetos machos, um grande número destes poderia ser liberado em campo, inviabilizando assim os descendentes da espécie (KNIPLING, 1955; OLIVEIRA, 1980).

Um estudo publicado por Bushland; Hopkins (1953) descreveu os resultados do uso de radiação ionizante (raios – X) em pupas de *C. hominivorax*. Os dois pesquisadores observaram que os machos adultos após serem submetidos a uma dose radioativa de 50 Grays (Gy) durante a fase de pupa, apresentavam morfologia

aparentemente normal, porém, quando copulavam com fêmeas virgens, as mesmas não geravam ovos férteis (BUSHLAND; HOPKINS, 1953).

Em 1954 na ilha de Curaçao, localizada a 65 quilômetros da Venezuela, Knipling realizou a liberação de pupas irradiadas de *C. hominivorax* em uma área de aproximadamente 435 Km<sup>2</sup>, no período de duas vezes por semana. A liberação de machos estéreis alcançou uma frequência de 155 machos/ Km<sup>2</sup>/semana, promovendo um “valor estéril” inicial de 69%, que aumentou posteriormente, chegando a desejáveis 100%. Esta atividade foi mantida por 14 semanas, até obter um grau satisfatório de eliminação do vetor (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Com o sucesso obtido em Curaçao, Bushland, Knipling e colaboradores, incorporaram a técnica do inseto estéril a um programa integrado para o manejo de pragas em área extensa (originalmente, em inglês, “Area-wide Integrated Pest Management” ou AW-IPM), onde foi elaborada uma série de projetos para a eliminação de *C. hominivorax* em outras regiões do globo. Os locais que se tornaram livres desta peste durante a implantação do projeto foram: Flórida em 1958; Sudoeste dos Estados Unidos e México em 1962; América central em 1984 - Belize e Guatemala 1994, El Salvador 1995, Honduras 1996, Nicarágua 1999, Costa Rica 2000, e Panamá 2001; África do Norte em 1989; e a região do Caribe em 1975 – Porto Rico e Ilhas Virgínicas (BUSHLAND, 1985; HENDRICH, 2000; HENDRICH *et al.*, 1995; KNIPLING, 1955; MEYER; SIMPSON 1995; MASTRANGELO, 2011; WYSS, 2000).

Após a erradicação de *C. hominivorax* nas Américas, a TIE foi direcionada a outras espécies, sobretudo as que compartilhavam características ecobiológicas em comum com a *C. hominivorax*, como: capacidade de explorar amplo número de hospedeiros; fator de dispersão e sobrevivência na forma de adultos; reprodução monogâmica e elevada capacidade reprodutiva. Estes estudos contribuíram para a integração definitiva da TIE em programas de controle vetorial. Entre as espécies erradicadas, podemos citar como exemplo: *Anastrepha ludens* no sudoeste da Califórnia em 1954; *Bactrocera tryoni* na Austrália em 1962; e *Bactrocera cucurbitae* nas ilhas sudoestes do Japão (Figura 8) (ENKERLIN, 2005; KOYAMA *et al.*, 2004; KUBA *et al.*, 1996, LANCE; McINNIS, 2005; SMALLRIDGE *et al.*, 2002).

**Figura 8** - Espécies de insetos erradicadas pela TIE

Fonte: Oxitec (2013).

Nota: Da esquerda para a direita: *Anastrepha ludens*, *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera cucurbitae*.

#### 2.4.1 Aplicação da técnica do inseto estéril em mosquitos vetores.

Estudos com TIE aplicada ao controle de mosquitos têm sido conduzidos desde a década de 1960. As primeiras liberações de mosquitos estéreis foram realizadas em 1959 e 1960, em regiões do sul da Flórida, utilizando machos que emergiram de pupas irradiadas de *Anopheles quadrimaculatus*. Neste estudo, porém, não foram alcançados níveis satisfatórios de supressão populacional. Uma das hipóteses levantadas sugere que mudanças comportamentais de machos estéreis podem ter sido determinantes na redução do número de acasalamentos com fêmeas selvagens, conduzindo desta forma ao insucesso do estudo (ALPHEY et al., 2009; MORLAN et al., 1962)

Resultados promissores surgiram apenas em 1967, com a eliminação de mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* em Myanmar. O projeto utilizou mosquitos esterilizados por meio de incompatibilidade citoplasmática, através da bactéria *Wolbachia pipientis* (BENEDICT; ROBINSON, 2003; LAVEN, 1967). O projeto mais ambicioso realizado com a técnica do inseto estéril em mosquitos foi em 1974, através de uma parceria entre a Organização Mundial de Saúde e o Conselho Indiano de Pesquisas Médicas (PAL, 1974). Durante o projeto foram utilizadas diferentes abordagens, relacionando estudos ecológicos e genéticos com princípios modernos de gestão, tendo como objetivo, a redução populacional das espécies *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti* e *Anopheles stephensis* na Índia. Apesar do uso de várias abordagens operacionais e científicas, efeitos modestos de supressão populacional foram observados. Tal fato ocorreu devido principalmente à inesperada migração de fêmeas ao longo de vários quilômetros adentro das áreas de controle (BENEDICT; ROBINSON, 2003).

Em relação à espécie *A. aegypti*, os primeiros testes utilizando machos estéreis foram realizados por Harvey e colaboradores na cidade de Pensacola, Flórida – Estados Unidos no biênio de 1960/1961. Foi utilizada uma dose de 180 Gy de radiação gama através do elemento Cobalto – 60. No entanto, níveis satisfatórios de supressão populacional não foram atingidos. A diminuição considerável da competitividade dos mosquitos, resultante da elevada dose de radiação a que foram expostos, foi a causa do insucesso no programa de controle vetorial (ALPHEY *et al.*, 2009).

A partir destes estudos, outras tentativas subsequentes com *A. aegypti* e outras espécies obtiveram resultados diversificados (Tabela 1), mas de maneira geral todos relatam que, os sistemas e a tecnologia utilizada na época apresentavam falhas como: (1) Produção de mosquitos abaixo dos níveis desejados, devido à ausência de tecnologias para sexagem, gerando atrasos na produção; e (2), falta de calibração da dosagem radioativa, provocando perda do *fitness* biológico dos machos e os tornando menos eficientes e competitivos (BENEDICT; ROBINSON, 2003).

Até meados dos anos 80, vários projetos de pesquisa envolvendo o uso TIE em mosquitos foram realizados, porém, nos anos seguintes, o interesse por este meio alternativo de controle acabou ofuscado pela continuidade do uso de inseticidas químicos, em larga escala (BECKER *et al.*, 2003). Ao longo dos anos, com o advento de novas tecnologias e um melhor entendimento sobre a bioecologia das espécies-alvo, a incorporação de técnicas estéreis em programas de controle vetorial passou a ser novamente considerada (KLASSEN; CURTIS, 2005).

**Quadro 1** – Registros de utilização da Técnica do Inseto Estéril (TIE) em culicídeos.

<b>Espécie</b>	<b>Ano</b>	<b>Local</b>	<b>Meio esterilização</b>	<b>Total de machos liberados</b>	<b>Tempo de liberação</b>
<b><i>Aedes aegypti</i></b>	1960-1961	EUA	Radiação Gama	4,6 milhões	43 semanas
	1974	Índia	Quimioesterilizante	40 mil	03 semanas
	1975	Quênia	Quimioesterilizante	57 mil	10 semanas
	2009-2011	Ilhas Cayman	RIDL/ OX513A	3,3 milhões	96 semanas
	2011-2012	Brasil	RIDL/ OX513A	1 milhão	
<b><i>Aedes albopictus</i></b>	2005-2009	Itália	Radiação Gama	12 milhões	25 semanas
<b><i>Culex pipens</i></b>	1970	França	Translocação cromossômica	Milhares	08 semanas
<b><i>Culex tritaeniorhynchus</i></b>	1977	Paquistão	Translocação cromossômica	167 mil	02 semanas
<b><i>Culex quinquefasciatus</i></b>	1967	Myanmar	Incompatibilidade citoplasmática	315 mil	09 semanas
	1968	EUA	Quimioesterilizante	2.500	12 semanas
	1969	EUA	Quimioesterilizante	930 mil	12 semanas
	1973	Índia	Incompatibilidade citoplasmática	11.400	02 semanas
	1973	Índia	Incompatibilidade citoplasmática	23 milhões	14 semanas
<b><i>Culex tarsalis</i></b>	1977	EUA	Translocação cromossômica	76 mil	04 semanas
	1978	EUA	Translocação cromossômica	180 mil	09 semanas
	1981	EUA	Quimioesterilizante	85 mil	08 semanas
<b><i>Anopheles albimanus</i></b>	1972	El Salvador	Quimioesterilizante	4,4 milhões	22 semanas
<b><i>Anopheles gambiae</i></b>	1968-1969	Burkina Faso	Translocação cromossômica	240 mil	09 semanas
<b><i>Anopheles quadrimaculatus</i></b>	1959-1960	EUA	Quimioesterilizante	400 mil	48 semanas

Fonte: Elaborado pelo autor.

A introdução de novas tecnologias para produção em massa de machos estéreis utilizando, por exemplo, meios menos laboriosos de sexagem (marcadores moleculares e separadores de pupas) e a otimização do sistema de criação (alimentação adaptada e modelos matemáticos) foram essenciais para obter um controle de qualidade na TIE (BAKRI; MEHTA, 2005; BALESTRINO *et al.*, 2014; BALESTRINO *et al.*, 2010; BENEDICT *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2014; CHADEE *et al.*, 2014; FRANZ, 2002; HAMADY *et al.*, 2013; HELINSKI; KNOLS, 2008).

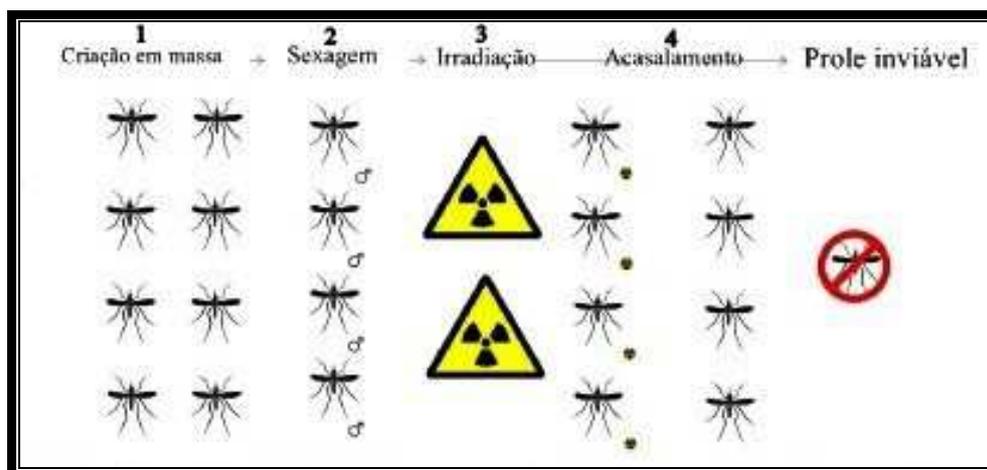
Entre os anos de 2009 a 2013 resultados expressivos de supressão populacional foram obtidos com o uso da técnica estéril em mosquitos, envolvendo espécies como *Aedes albopictus*, *A. aegypti* e *Anopheles gambiae*. A experiência de controle por TIE de *A. albopictus*, em áreas urbanas da Itália, revelou esterilidade de 70% a 80% na população local, demonstrando que a técnica pode e deve ser incluída nos programas atuais de controle (BELLINI *et al.*, 2010; 2013).

As técnicas de esterilização para *A. aegypti* têm sido centradas no uso de radiações ionizantes (gama e raios X) e quimiesterilizantes. Outras técnicas genéticas para controle populacional residem no uso de transgênicos, através do sistema RIDL (liberação de insetos portadores de um gene letal). Empresas que tem como foco o desenvolvimento de tecnologia para o combate de insetos como a Moscamed e a Oxford insect technology (Oxitec Ltd.) têm desenvolvido técnicas aprimoradas para a produção e liberação de mosquitos transgênicos (CARVALHO, *et al.*, 2014).

## 2.5 Técnica do inseto estéril: conceito e método

A Técnica do Inseto Estéril (TIE) proposta em 1950 por Bushland e Knippling, compreende a criação massiva de insetos machos de uma determinada espécie, seguida de esterilização e liberação desse produto em uma área alvo, assim, machos estéreis copulam com fêmeas selvagens e a prole gerada desse cruzamento se tornará inviável. Esta é uma técnica considerada espécie-específica, não envolvendo outros organismos (ALPHEY 2002; DYCK *et al.*, 2005; KNIPLING, 1952; OLIVEIRA, 2011; PHUC *et al.*, 2007; PAPATHANOS *et al.*, 2009; WILKE *et al.*, 2009).

Figura 9 – Técnica do inseto estéril



Fonte: Adaptado de Wilke; Marrelli (2012)

Nota: A técnica do inseto estéril compreende as etapas de: (1) Criação em massa de insetos; (2) Sexagem, pois para a TIE só interessa a liberação de machos; (3) Irradiação por agentes mutagênicos para induzir esterilidade; (4) Liberação de machos estéreis na área alvo e acasalamento com fêmeas selvagens.

A técnica do inseto estéril é geralmente direcionada a espécies que apresentam características como: Reprodução sexual exclusiva (técnica espécie-específica), espécies “R” estrategistas (produção em massa) desenvolvimento holometábolo (fase de pupa facilita o processo de esterilização e manuseio). Tais características agem como fatores facilitadores no processo de supressão populacional (LANCE; McINIIS, 2005).

A TIE apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos de controle por ser uma técnica ambientalmente segura, pois não envolve outros organismos e não gera resíduos tóxicos, além de ser compatível com outros meios de controle vetorial, podendo ser integrada a um programa junto a outras técnicas (TWEEN; MOSCAMED, 2014).

Inicialmente, os meios utilizados para induzir esterilidade na TIE consistiam no uso de radiação ionizante (raios – X e radiação gama) e quimioesterilizantes (alquilantes e triazinas) (BENEDICT; ROBINDSON, 2003). Com a introdução de novas tecnologias, sobretudo na área de biologia molecular, utilizando bactérias simbiotes e organismos transgênicos, a TIE passou a ser classificada de acordo com o método esterilizante. Na TIE clássica, que tem esta denominação, pois, o emprego destas tecnologias é utilizado desde a concepção da técnica em 1950, as seguintes metodologias são utilizadas para esterilização de insetos:

Quimioesterilizantes: São conhecidas cerca de 400 substâncias químicas que causam esterilidade reprodutiva em insetos (MAYER, 1998). Alguns desses

compostos inibem o desenvolvimento ovariano ou induzem alterações na estrutura de ácidos nucléicos (DNA e RNA). Os quimioesterilizantes podem ser aplicados diretamente sobre os insetos ou incorporados ao alimento dos mesmos. Alguns exemplos de quimioesterilizantes são: agentes alquilantes (metepa e afolato), antimetabólitos (fluorascila e aminopterina), organotinas, antibióticos (porfiromicina, ciclohexamida), alcaloides (monocrotalina e colchicina), triazinas (tiouréia), entre outros (MAYER, 1998).

Dentre os diversos compostos, alquilantes e triazinas, têm sido os mais testados como métodos de indução de esterilidade em mosquitos. Trabalhos contendo o uso destes compostos em *C. quinquefasciatus* e *Anopheles albimanus* são relatados, no entanto, atualmente, os quimioesterilizantes não são muito utilizados por envolver substâncias carcinogênicas, mutagênicas e/ou teratogênicas, podendo ocasionar contaminação ambiental (BENEDICT; ROBINSON, 2003).

Radiação ionizante: Constitui o método esterilizante mais antigo e utilizado em vários programas de controle vetorial. As radiações ionizantes utilizadas são geralmente raios X e gama. Desses, a esterilização por raios gama é a mais comum. Como fonte radioativa, são utilizados radioisótopos como o Cobalto 60 e a dose utilizada é calculada através de irradiadores que determinam a taxa de dose (BAKRI *et al.*, 2005). O potencial da radiação ionizante de interagir com numerosos materiais, provocando a quebra e mudanças estruturais em várias moléculas, proporciona sua aplicação em várias áreas, sobretudo na técnica do inseto estéril (ALPHEY, 2002).

O uso de radiação para esterilizar insetos inclui vantagens como: (1) O aumento de temperatura durante o processo é insignificante, (2) insetos estéreis podem ser liberados imediatamente após a irradiação, e (3) a radiação pode passar através de diversos materiais, permitindo que os insetos sejam irradiados, mesmo após terem sido embalados (BAKRI *et al.*, 2005).

A TIE moderna, no entanto, utiliza tecnologias recentes de biologia molecular como organismos transgênicos e paratransgênesis para impedir a reprodução de insetos.

Paratransgênesis: Inclui a manipulação de organismos simbiotes presentes na espécie-alvo para induzir esterilidade. Entre estes simbiotes, o mais relacionado à indução de esterilidade em mosquitos é a bactéria *Wolbachia pipientis*. Esta bactéria está presente em 76% das espécies de inseto, e por esta relação

simbiótica, é tida como um candidato ideal ao procedimento de paratransgênesis (ROBINSON; HENDRICH, 2005).

O fenótipo mais comum associado à infecção por *Wolbachia* em insetos é a incompatibilidade citoplasmática (IC), uma forma de falha reprodutiva pós-fecundação. A IC é expressa quando um mosquito macho infectado acasala com uma fêmea não infectada. Embora o espermatozóide consiga penetrar com sucesso no óvulo, não há a descondensação correta dos cromossomos paternos, ocasionando a fusão com os cromossomos maternos antes da primeira divisão mitótica (SINKINS, 2004). Este fenômeno causa mudanças estruturais na cromatina, ocasionando a morte do embrião. (GUBLER; LASSY; KARR, 1996). Apesar das *Wolbachia* spp. estarem presentes em 40% de todas as espécies de insetos (ZUG; HAMMERSTEIN, 2012), elas não são endossimbiontes naturais de *A. aegypti*. Assim, pesquisas recentes levaram ao desenvolvimento da linhagem desta espécie transfectadas com *Wolbachia*, *wMel*, refratária à infecção por vírus Dengue (WALKER *et al.*, 2011). Testes para avaliar seu potencial como ferramenta de controle biológico estão em curso em diversos países, inclusive no Brasil, no âmbito do Programa Eliminate Dengue ([www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)). A estratégia consiste em liberar uma grande quantidade de indivíduos portadores da *Wolbachia*, cujos machos infectados ao copularem com fêmeas selvagens inviabilizarão suas proles, enquanto que as fêmeas infectadas acasaladas com machos selvagens produzirão novos descendentes infectados com a *Wolbachia*, de forma que, ao longo do tempo, ocorrerá a substituição da população natural. Apesar de não ser esperada a eliminação da presença de *A. aegypti* em campo, a substituição por uma linhagem refratária à infecção com o vírus Dengue, levará ao longo do tempo a uma redução do número de casos da doença (DUTRA *et al.*, 2015). O sistema genético – molecular também conhecido como sistema RIDL (liberação de insetos portadores de um gene letal dominante, originalmente no inglês “Release of Insects with Dominant Lethality”), é um dos métodos de esterilização mais recentes utilizado para o controle de vetores. Este sistema compreende a liberação de machos portadores de um gene letal que será expresso apenas em uma determinada condição ambiental. Os machos transgênicos ao copularem com fêmeas selvagens transmitem este gene letal para prole, impedindo o indivíduo de alcançar a fase adulta (OLIVEIRA, 2011). No Brasil, a tecnologia RIDL, voltada à supressão populacional, já está sendo testada por empresas como a Mosamed e possui

resultados importantes em dois bairros de Juazeiro (BA) – Mandacaru e Itaberaba, onde foi registrada uma redução de 90% da população de *A. aegypti* em seis meses ([www.moscamed.org.br](http://www.moscamed.org.br)) (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

### 2.5.1 Esterilização por irradiação

Para a irradiação de insetos, geralmente são utilizados irradiadores de raios gama, devido à sua alta energia e penetração (KLASSEN, 2005). As fontes mais comuns de raios gama são os radioisótopos Cobalto 60 e Césio 137, como ambos têm uma meia-vida longa (5,6 anos e 30 anos respectivamente) e emitem raios gama de alta energia, sendo o Co 60 mais facilmente fabricado e utilizado com mais frequência. No irradiador, mais especificamente em sua base, está o local onde ocorrerá a irradiação. Este local encontra-se tipicamente preenchido por várias “pastilhas” em formato cilíndrico, de cobalto ou de césio. A taxa de dose é pré-determinada pela atividade atual da fonte radioativa e o operador controla a dose que será absorvida pela amostra, ajustando o tempo de exposição (HELINSKI, *et al.*, 2009). Normalmente, há dois tipos de irradiadores gama usados em programas de liberação de insetos estéreis: irradiadores de armazenamento à seco e irradiadores panorâmicos de larga escala.

Os irradiadores de armazenamento a seco (Figura 10) são os mais utilizados em laboratórios de pesquisa e indústrias de pequeno porte. Estes dispositivos abrigam a fonte radioativa dentro de um escudo protetor de chumbo e geralmente possuem um mecanismo para o manuseio das amostras. Através de um dispositivo denominado “canister”, a amostra biológica é armazenada e colocada em contato com a fonte radioativa. Estes canisters são reutilizáveis (geralmente feitos de aço, alumínio ou plástico) e são organizados de tal modo a manter os recipientes onde estão as amostras, imobilizados durante o procedimento de irradiação. O recipiente então é colocado na câmara de irradiação e o temporizador é ajustado para fornecer a dose pré-selecionada. Na maioria destes irradiadores, o local da irradiação está no centro de uma matriz circular, onde contém a fonte de radiação encapsulada. Com este design, a dose é relativamente uniforme no interior da câmara de irradiação, permitindo uma uniformidade de dose nas amostras (BAKRI *et al.*, 2005).

Os irradiadores panorâmicos de larga escala (Figura 11) são os mais adequados para um grande volume de amostras. A fonte radioativa consiste de

várias hastes de Co 60 dispostos em um plano e localizadas ao fundo de um poço coberto por água ou chumbo. No momento da irradiação, as amostras são colocadas em uma câmara, e em seguida, ao comando do operador, elas são direcionadas ao poço onde estão as hastes contendo a fonte radioativa e permanecem nesta condição pelo tempo definido pelo operador (BAKRI, 2005).

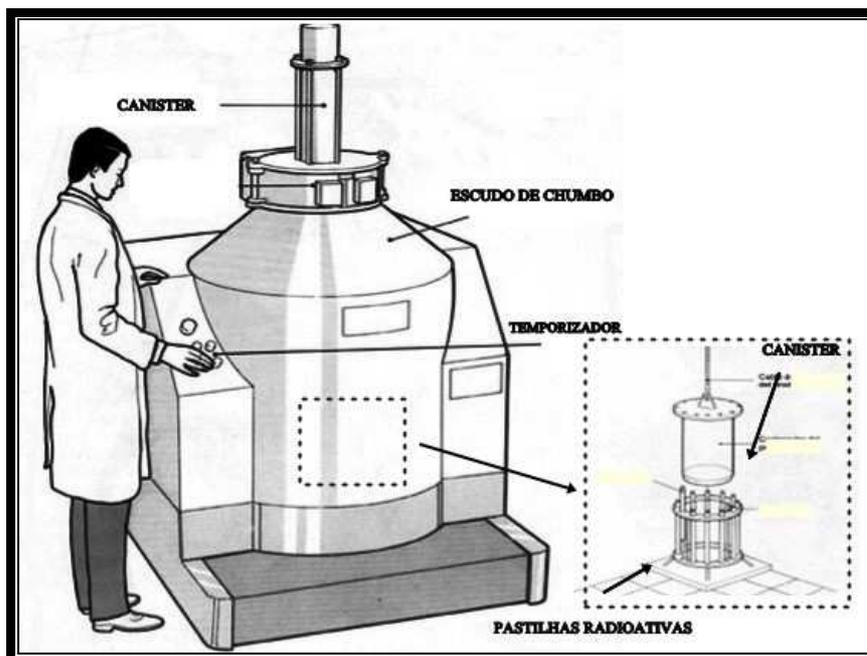
A esterilização por radiação em insetos é um processo relativamente simples, com procedimentos de controle de qualidade confiáveis. O parâmetro chave é a dose absorvida de radiação, que é expressa no Sistema Internacional de Unidades como Gray (Gy), onde 1 Gy é equivalente a um efeito de Joule (J) de energia absorvida em 1 kg de um material específico ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} / \text{kg}$ ) (BAKRI *et al.*, 2005). O parâmetro de “dose absorvida” foi criado com o objetivo de se medir a energia depositada por um feixe de fótons de alta energia (raios X ou raios gama) em um tecido biológico e os seus efeitos sobre este tecido. A dose absorvida de radiação depositada por quilograma de tecido é expressa em “rad” (*radiation absorbed dose*, ou dose de radiação absorvida). Pelo sistema internacional de medidas, 1 Gy equivale a 100 rad (D’IPPOLITO; MEDEIROS, 2005).

A escolha do estágio de desenvolvimento e a idade em que o inseto será irradiado são baseadas no tempo de maturação dos seus órgãos reprodutivos. Esta escolha influenciará diretamente nos procedimentos para manuseio, irradiação e transporte de amostras (KLASSEN, 2005).

### 2.5.2 Efeito biológico das radiações ionizantes

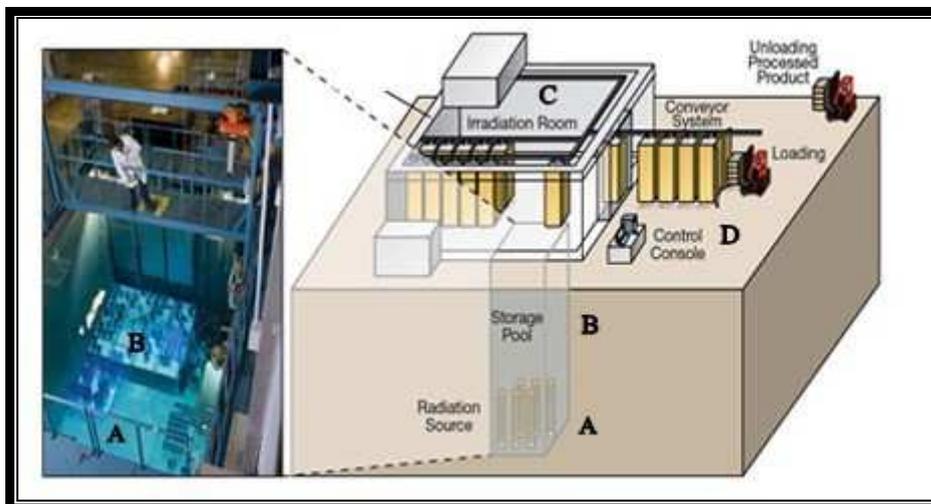
O modo de ação das radiações ionizantes em células vivas consiste em uma cadeia de reações oxidativas que vão ocorrendo durante a irradiação, formando metabólitos altamente reativos como radicais livres, ocasionando danos irreversíveis ao DNA, como quebras cromossômicas e mutações letais (MASTRANGELO; WALDER, 2011). A radiação ionizante é uma onda eletromagnética de alta energia (raios X ou raios gama) que, ao interagir com a matéria, desencadeia uma série de ionizações, transferindo energia aos átomos e moléculas presentes no campo irradiado e promovendo, assim, alterações físico-químicas intracelulares (BIRAL, 2002; D’IPPOLITO; MEDEIROS, 2005).

**Figura 10** - Irradiador de armazenamento a seco e seus componentes



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2010).

**Figura 11** - Irradiador panorâmico de larga escala



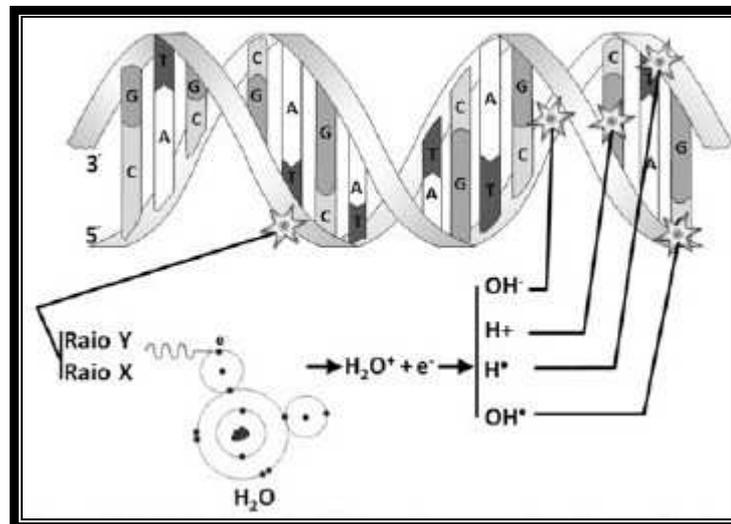
Fonte: United States Nuclear Regulatory Commission (2014).

Nota: Estruturas que compõe o irradiador panorâmico de larga escala. A – Hastes radioativas; B – Poço de armazenamento; C – Câmara de irradiação; D – Temporizador.

A radiação ionizante pode interagir diretamente com os componentes celulares (efeito direto) ou de modo indireto (efeito de radiólise), resultando em alterações celulares e moleculares (Figura 12) (SEGRETO *et al.*, 2000).

Os efeitos das radiações ionizantes podem ser somáticos ou hereditários. Efeitos hereditários ocorrem, sobretudo, nos descendentes do indivíduo irradiado, enquanto que, efeitos somáticos ocorrerão no próprio indivíduo exposto à radiação. Efeitos somáticos podem ainda serem divididos em efeitos estocásticos e efeitos determinísticos (SEGRETO *et al.*, 2000).

**Figura 12** – Efeito da radiação ionizante na molécula de DNA



Fonte: Bonato e Elneave (2011).

Nota: A lesão direta no DNA ocasiona a quebra de suas ligações estruturais. Na lesão indireta, há deslocamento de elétron ( $e^-$ ) da molécula da água ( $H_2O$ ), que se torna um íon água positivo ( $H_2O^+$ ). O elétron reagirá com outra molécula de água formando  $H_2O^-$ , que se dissocia em íon hidroxila ( $OH^-$ ) e radical livre hidrogênio ( $H^\bullet$ ). Os íons e radicais livres são altamente reativos com as estruturas celulares.

Os efeitos determinísticos ocorrem conseqüentemente após a exposição por altas doses de radiação em um curto período de tempo, onde existe um limiar de dose absorvida necessário para sua ocorrência e cuja gravidade aumenta com o aumento da dose radioativa (NAVARRO, *et al.*, 2008). As reações teciduais são resultantes de doses altas radioativas e somente surgem quando ultrapassam o limiar de dose, cujo valor depende do tipo de radiação e do tecido irradiado. Um dos principais efeitos determinísticos é a morte celular (SEGRETO *et al.*, 2000).

Efeitos estocásticos, no entanto, são alterações que levam à transformação celular. São efeitos não aparentes, que estão relacionados a baixas doses de radiação. Estes efeitos se manifestam após um período maior de tempo, não permitindo estabelecer uma relação clara de “causa e efeito”. Em células germinativas, efeitos genéticos ou hereditários podem ocorrer (BIRAL, 2002; D'IPPOLITO; MEDEIROS, 2005).

De acordo com a lei de Bergonie e Tribondeau, por uma característica denominada radiosensibilidade, as células mais sensíveis à radiação ionizante são aquelas que estão em intenso processo de divisão mitótica, enquanto que células somáticas são menos sensíveis devido à perda da capacidade de divisão celular. (SEGRETO, 2000).

### 2.5.3 Gametogênese e embriogênese em *Aedes aegypti*

A gametogênese é o processo pelo qual ocorre a formação e o desenvolvimento das células germinativas especializadas, os gametas, em organismos dotados de reprodução sexuada (BOGDANOV, 1970). A gametogênese pode ser caracterizada por três etapas distintas denominadas multiplicação (mitose), crescimento e maturação (meiose) e diferenciação/formação de células germinativas maduras (espermatogênese em machos e oogênese em fêmeas). O evento fundamental na gametogênese é a meiose, que reduzirá pela metade a quantidade de cromossomos de células diplóides, originando células haplóides. Na fecundação, a fusão de dois gametas haplóides reconstituirá o número diplóide característico de cada espécie (CLEMENTS, 2000).

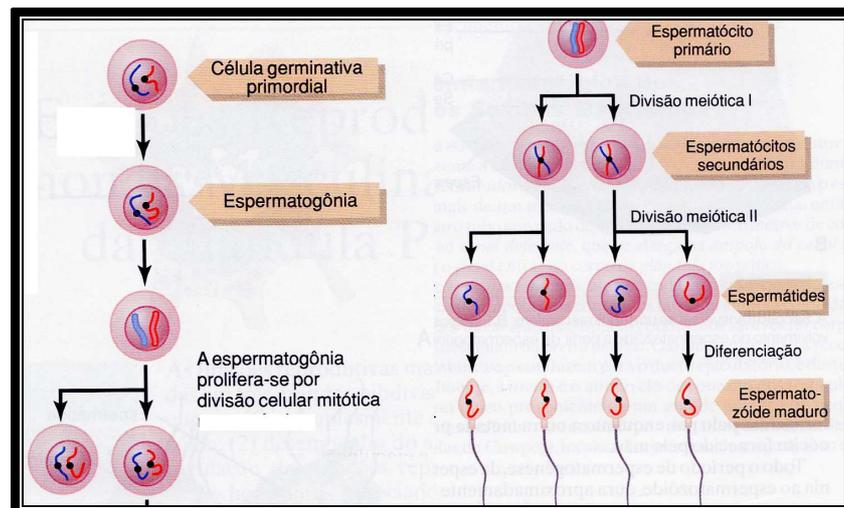
#### 2.5.3.1 Espermiogênese

No processo de gametogênese do *A. aegypti* macho, durante os estágios sucessivos da espermatogênese, um pequeno número de células germinativas primordiais irão sofrer multiplicação e diferenciação dando origem a milhares de espermatozoides (CHRISTOPHERS, 1960). A espermatogênese inclui as seguintes fases de desenvolvimento: período germinativo, no qual há a formação e multiplicação das células germinativas primordiais (espermatogônias e espermatócitos); período de crescimento e maturação (formação de espermátides) e

diferenciação celular (formação das células espermáticas maduras, os espermatozoides) (Figura 12) (CLEMENTS, 2000).

Pela lei de Bergonie e Tribondeau, a radiosensibilidade se fará mais presente em espermatócitos e espermatogônias, que são células germinativas ainda em intenso processo de divisão celular (BAKRI *et al.*, 2005). Quando uma pausa é induzida nos cromossomos de espermatozoides em desenvolvimento, esta condição irá permanecer mesmo após a maturação do espermatozoide e entrada do mesmo no óvulo. Após a fusão do espermatozóide com a célula ovo, as divisões nucleares começam, e as rupturas cromossômicas ocasionadas pela radiação, poderão ter efeitos drásticos sobre a viabilidade do embrião a medida que o desenvolvimento avança.

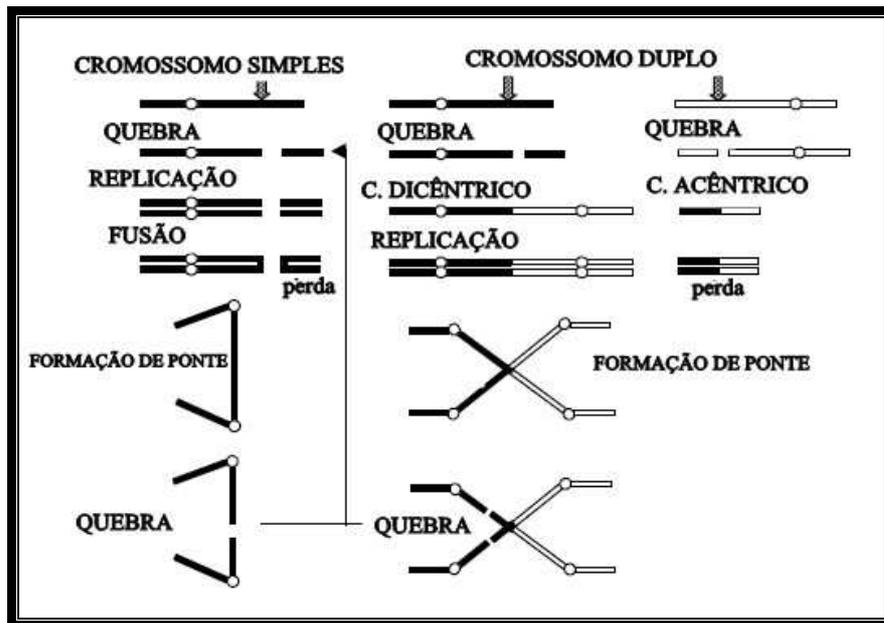
**Figura 13** – Espermatogênese em mamíferos e insetos



Fonte: Adaptado de Guyton e Hall (2006).

Durante o fenômeno de divisão celular, mais precisamente no início da prófase, cromossomos fragmentados sofrem replicação normal, porém, durante a metáfase, as extremidades quebradas podem fundir-se, levando à formação de cromossomos dicêntricos (dois centrômeros) e/ou fragmentos acêntricos (sem centrômero). O fragmento acêntrico é freqüentemente perdido, enquanto que o fragmento dicêntrico pode ocasionar a formação de pontes durante a anáfase, levando a mais quebras cromossômicas (Figura 14). Todo este processo repete-se em vários ciclos, levando à acumulação de sérios desequilíbrios, como mutações, na molécula de DNA e conseqüentemente, comprometimento da informação genética que será repassada às células filhas (ROBINSON, 2005).

**Figura 14:** Diferentes efeitos das radiações ionizantes sobre a ultra estrutura de cromossomos.



Fonte: Adaptado de Robinson (2005).

### 2.5.3.2 Oogênese

Na estrutura dos ovários, encontram-se agrupamentos celulares característicos chamados folículos ovarianos. A gametogênese feminina denominada oogênese ou ovogênese, inicia-se no interior dos folículos ovarianos, que são as unidades funcionais e fundamentais dos ovários. Mosquitos hematófagos como o *Ae. aegypti*, possuem ovários compostos por muitos folículos ovarianos individuais, cada um capaz de produzir um ovo viável após cada repasto sanguíneo (CLEMETS, 2000; BARTHOLOMAY; JENNINGS, 2011).

A oogênese pode ser dividida em três etapas: Fase de multiplicação ou de proliferação, caracterizada por mitoses consecutivas, quando as células germinativas aumentam em quantidade e originam ovogônias; fase de crescimento, ocorre logo que as ovogônias são formadas e iniciam a primeira divisão da meiose, passando por um notável crescimento, com aumento do citoplasma e grande acumulação de substâncias nutritivas. Esse depósito citoplasmático de nutrientes chama-se vitelo, e será responsável pela nutrição do embrião durante seu desenvolvimento; e Fase de maturação: Formação dos oócitos primários e secundários (CLEMETS, 2000).

Grandes quantidades de proteínas, lipídios e açúcares são incorporadas nos ovócitos em crescimento durante a ovogênese. A principal proteína de reserva dos ovos de artrópodes é a vitelina. A função da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, e sua utilização está relacionada à ação de proteases específicas (FAGOTTO, 1990; LOGULLO *et al.*, 1998; YAMAMOTO; TAKAHASHI, 1993). Em insetos, aminoácidos derivados da alimentação sanguínea são utilizados por células do corpo gorduroso para a síntese de proteínas do vitelo. Tais proteínas sintetizadas pelo corpo gorduroso são então secretadas na hemolinfa e subsequentemente absorvidas pelos ovários onde são depositadas nos ovócitos. Este processo é denominado vitelogênese (RAIKHEI; DHADIALLA, 1992).

Vários genes estão relacionados à regulação da oogênese em *A. aegypti*, interferindo assim, no funcionamento correto das etapas de multiplicação de ovogônias, maturação de oócitos e produção de proteínas na vitelogênese, necessárias à formação correta do embrião (UCHIDA *et al.*, 2004). O uso da radiação ionizante interferirá nesses processos, justamente pelo seu alto grau de interação com a matéria, interagindo diretamente na molécula de DNA e promovendo alterações na ultraestrutura de cromossomos.

Em células que se encontram em intensa atividade mitótica, como células germinativas (oócitos e ovócitos) presentes nos ovários, o fenômeno de radiosensibilidade se torna mais presente. Distúrbios na estrutura dos folículos ovarianos comprometem significativamente a maturação de oócitos e conseqüentemente, à fecundidade e fertilidade de fêmeas expostas à irradiação (BAKRY *et al.*, 2005).

### 2.5.3.3 Embriogênese

O fenômeno de embriogênese têm início após a fertilização, que ocorre no momento da postura dos ovos pelas fêmeas. Durante a oviposição, os espermatozoides até então armazenados na espermateca são liberados e penetram no ovo através de um orifício externo denominado micrópila. Ao mesmo tempo, ocorre também a passagem do oócito, proveniente da ovulação, através da câmara genital. Após a oviposição, tem início a fusão dos pró-núcleos provenientes de cada gameta, seguido de retomada da atividade meiótica e restauração do número diploide característico da espécie (CLEMENTS, 2000).

Os embriões desenvolvem-se basicamente de duas formas: os que têm a embriogênese ocorrendo desde o início por divisões mitóticas formando estruturas semelhantes à mórula, como é o caso de mamíferos; e os que formam um sincício com abrupta celularização, como é observado comumente em dípteros (BATE; ARIAS, 1993).

Após a fecundação, o zigoto passa por rápidas divisões mitóticas, em seguida, o processo é realizado sem clivagem do citoplasma, resultando em uma estrutura denominada sincício, na qual muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum. Até esse momento, o embrião é considerado unicelular. Após novas divisões, resumidamente, ocorrerá as etapas de formação de membranas embrionárias e organogênese, que, em condições ideais de temperatura e umidade, se finaliza em aproximadamente 72 horas (RAMINANI; CUPP, 1975).

## **2.6 Viabilidade biológica de machos estéreis e o controle de qualidade na técnica do inseto estéril**

De acordo com Robinson (2005), o controle de qualidade na criação e liberação de indivíduos estéreis pode ser dividido em duas categorias: (1) controle de qualidade na produção, que envolve equipamentos, reagentes, amostra biológica, processo de produção, como condições ambientais, taxa de infestação, separação larval, sexagem das pupas e dose de irradiação. (2) controle de qualidade do produto, etapa na qual, os insetos produzidos são avaliados por sua efetividade em completar o propósito pelos quais eles foram requeridos (ROBINSON, 2005).

Dado que a supressão populacional pela TIE é essencialmente o resultado de acasalamentos entre machos estéreis e fêmeas selvagens (MCINNIS *et al.*, 1994), a capacidade dos machos estéreis liberados para competir por fêmeas é fundamental. A competitividade de machos estéreis é dada em função da sua propensão ao acasalamento e compatibilidade para acasalar, isto é, a tendência para localizar uma fêmea selvagem, copular e inseminar, sendo, portanto, um componente essencial para avaliar a qualidade da técnica do inseto estéril (WHITE; ROHANI; SAIT, 2010).

A esterilidade genética ideal de insetos machos requer: (1) A produção de espermatozoide; (2) sua transferência para o sexo feminino selvagem durante acasalamento; (3) sua utilização na fertilização dos ovos e (4) a incapacidade do zigoto ser formado, evitando o desenvolvimento completo de um adulto fértil. Em

outras palavras, um inseto macho irradiado deve ser capaz de realizar todas as funções de um inseto fértil normal (ROBINSON, 2005).

Portanto, são de suma importância a análise de determinados parâmetros biológicos (*fitness*) dos insetos irradiados como: fecundidade, longevidade e competitividade, para que se obtenha conhecimentos sobre a capacidade reprodutiva dos mosquitos esterilizados; sucesso competitivo de populações estéreis sob populações naturais; e criação de sistemas eficientes para criação e liberação em massa desses mosquitos (BARRY *et al.* 2003; HELINSKI *et al.* 2009; PAPATHANOS, *et al.* 2009; WILKE *et al.* 2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente a dengue é uma das arboviroses de maior impacto para saúde pública nos países tropicais. A indisponibilidade de uma vacina que garanta imunidade contra os quatro sorotipos do vírus Dengue, faz com que as estratégias utilizadas para minimizar a incidência da doença estejam, principalmente, ligadas ao controle vetorial de espécies de mosquito implicadas em seu ciclo de transmissão, entre elas, *Aedes aegypti*.

No Brasil, as ações de controle estão relacionadas à eliminação mecânica de criadouros potenciais e reais para larvas do mosquito, a aplicação focal de inseticidas químicos, com efeito larvicida, em grandes reservatórios de água, ou de adulticidas sob a forma de borrifação espacial, em pontos estratégicos onde há demasiada prevalência do mosquito. No entanto, a recente detecção de resistência, associada ao uso continuado destes inseticidas, aliada a falhas operacionais nos programas de controle, ampliaram as dificuldades para a redução da densidade populacional e contenção da distribuição de *A. aegypti* em áreas sensíveis ao vírus Dengue em todo o país.

Espécies de mosquitos, como *A. aegypti*, apresentam como principal estratégia de sobrevivência a dispersão passiva de ovos resistentes à dessecação no ambiente, capazes de permanecer viáveis por períodos superiores há um ano, em criadouros secos. As fêmeas realizam a oviposição em saltos, o que permite a deposição de grupos de ovos, oriundos de um mesmo ciclo gonadotrófico, em diversos criadouros. Este comportamento aliado a difícil localização dos ovos no ambiente e sua insensibilidade à maioria dos inseticidas ampliam ainda mais a complexidade de controle desta espécie invasora. Assim, inviabilizar as progênes desta espécie representaria uma importante ação nos programas de controle.

Técnicas alternativas para o controle de insetos utilizando machos estéreis, têm tido comprovada eficiência para espécies de importância na área agrícola e veterinária, entretanto, sua aplicação para o controle de espécies de importância médico-veterinária, como mosquitos vetores, tem sido bastante limitada.

O uso da radiação na produção de mosquitos estéreis tem se mostrado o método mais viável para a produção em larga escala destes insetos, apresentando como principais vantagens, o fato de ser, ambientalmente segura e permitir o uso de populações locais da espécie-alvo.

No entanto, o custo biológico associado à radiação ionizante, pode comprometer a qualidade e eficiência da técnica, por gerar machos estéreis menos competitivos do que os selvagens e levar a resultados pouco expressivos de supressão populacional. Neste contexto, o projeto em questão se propôs a avaliar o desempenho biológico e reprodutivo de machos de *A. aegypti* esterilizados por radiação gama e gerar subsídios para a utilização da técnica do inseto estéril, como método alternativo para seu controle em ambientes urbanos locais.

#### 4 PERGUNTA CONDUTORA

O estabelecimento de melhores condições para a obtenção e produção em massa de machos de *Aedes aegypti* esterilizados por radiação gama viabilizaria o uso da técnica do inseto estéril para o controle populacional do mosquito, em áreas urbanas do Estado de Pernambuco?

## **5 HIPÓTESE**

Obter machos de *Aedes aegypti* esterilizados por radiação gama, viáveis e competitivos, através do estabelecimento de condições adequadas para sua produção local em massa, viabiliza o controle da espécie pela técnica do inseto estéril.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Geral

Avaliar a viabilidade biológica de mosquitos esterilizados por radiação gama para uso na técnica do inseto estéril, para o controle populacional de *Aedes aegypti*.

### 6.2 Específicos

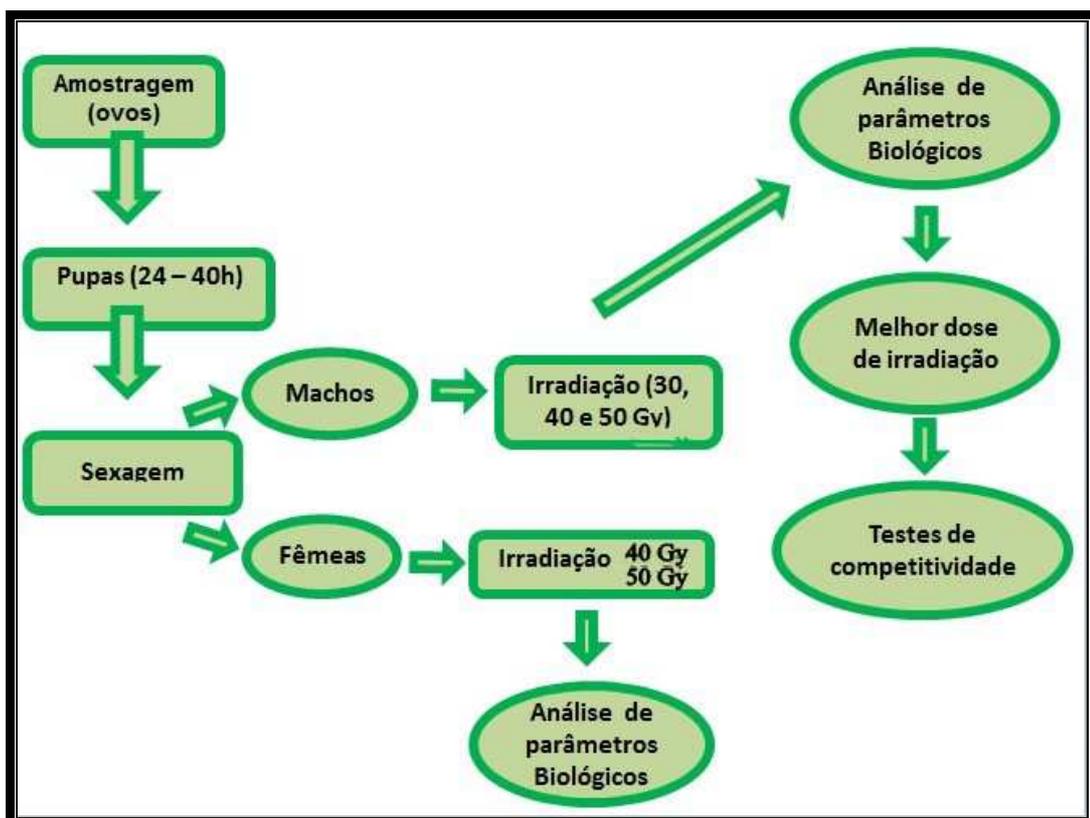
- a) Avaliar a sobrevivência de pupas após o procedimento de exposição à radiação gama;
- b) Verificar a eficácia de diferentes doses de radiação gama para a esterilização de machos de *A. aegypti*;
- c) Analisar o potencial reprodutivo de fêmeas expostas à radiação gama;
- d) Avaliar parâmetros biológicos relacionados ao *fitness* dos machos irradiados;
- e) Avaliar a competitividade de acasalamento dos machos estéreis em condições simuladas de campo;
- f) Determinar as condições adequadas para a produção em massa de machos estéreis de *A. aegypti*, competitivos para sua liberação em campo, visando a redução populacional da espécie.

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

Os efeitos da radiação ionizante ocasionam além de esterilidade, um custo biológico para a sobrevivência dos indivíduos expostos, que pode comprometer diversos processos, tornando-os menos competitivos em campo. Assim, a escolha da dose de radiação ideal, é essencial na produção de machos estéreis.

Os experimentos iniciais foram dirigidos à definição da melhor fase do ciclo de desenvolvimento do mosquito para esterilização e da dose de radiação gama mais adequada à obtenção dos machos estéreis. Em seguida foram realizados os ensaios para verificar as habilidades de sobrevivência e competitividade entre machos estéreis e não estéreis, além do efeito da radiação em fêmeas. Um esquema geral mostrando as etapas do trabalho está ilustrado na figura 15.

**Figura 15** Organograma representativo da metodologia utilizada no projeto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 7.1 Colônia de *Aedes aegypti*

No presente estudo, foi utilizada uma colônia de *Aedes aegypti* Recife-laboratório (RecL) originária do município do Recife - Pernambuco, Brasil, mantida em condições controladas de laboratório no Insetário do Departamento de Entomologia/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, desde 1996 (MELO-SANTOS, et al., 2009).

De um modo geral, a manutenção desta colônia inclui o processo regular de inclusão de ovos em água com baixo teor de oxigênio dissolvido para obter a eclosão sincrônica de larvas de 1º estágio. As larvas são distribuídas em bandejas plásticas de 53 X 37 cm, contendo um litro de água potável. No intuito de padronizar o tempo de desenvolvimento das larvas e minimizar a competição por alimento entre elas, evitando variáveis que podem influenciar o potencial reprodutivo dos indivíduos adultos, foi utilizada a densidade de uma larva/2 ml nos recipientes de criação.

As larvas foram alimentadas com ração para gatos, macerada e autoclavada, em uma quantidade conhecida e padronizada por dia (60, 80, 160, 310, 640, 320, 160 e 80 miligramas) por um período de oito dias consecutivos, até atingirem o estágio de pupa. As pupas então foram removidas para cubas plásticas de 23 X 11 cm, com capacidade para 750 ml e acondicionadas em gaiolas de alumínio, teladas, para contenção dos mosquitos adultos (Figura 18).

Mosquitos machos e fêmeas foram alimentados com solução de açúcar a 10%, *ad libitum* como fonte de carboidratos e, adicionalmente, às fêmeas um repasto com sangue de galinha (*Gallus gallus*), foi oferecido até duas vezes por semana, para obtenção das progênes. Todos os insetos foram mantidos em salas climatizadas a  $26\text{ C}^{\circ} \pm 1\text{ C}^{\circ}$ , umidade relativa de 50 a 60% e fotofase de 12 horas.

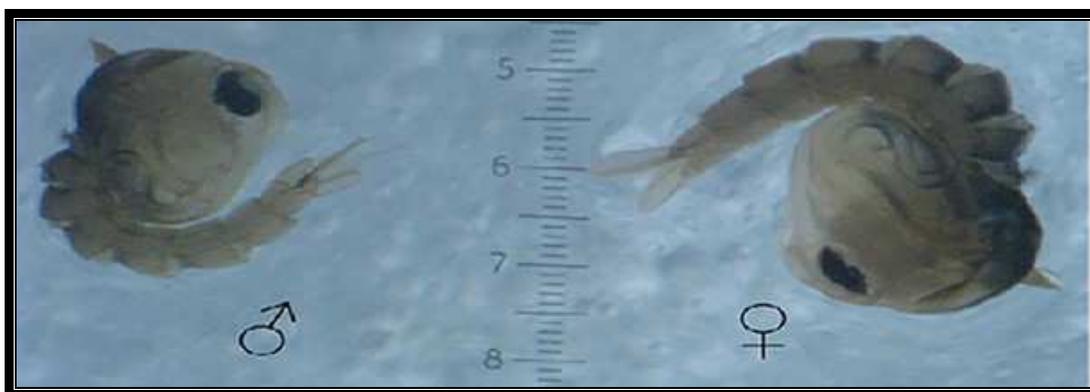
### 7.2 Sexagem pupal e preparação das amostras biológicas para irradiação

O processo de sexagem foi baseado no tamanho relativo das pupas, levando em conta que os machos são menores do que as fêmeas (Figura 16) e são os primeiros a entrarem no processo de pupação (CARVALHO *et al.*, 2014). Após esta etapa, as pupas com idade entre 24 e 40 horas foram transferidas, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, para placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido, para garantir a hidratação das pupas durante o procedimento de irradiação (Figura

17). O confinamento das pupas em placas de Petri, sem água, teve por objetivo reduzir sua mobilidade e assegurar a uniformidade durante a exposição à radiação.

O Irradiador de armazenamento a seco (Gammacell) pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (DEN-UFPE) foi utilizado para irradiar as amostras biológicas. A fonte radioativa utilizada foi o Cobalto 60 e foram analisadas três doses de radiação gama: 30, 40 e 50 Gray (Gy). O tempo de exposição dos grupos de 50 pupas/placa às diferentes doses variou de 39 a 50 segundos.

**Figura 16** – Distinção sexual entre pupas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Carvalho *et al.* (2014).

Nota: A fêmea (direita) apresenta um tamanho relativamente maior em relação ao macho (esquerda).

**Figura 17** - Acondicionamento de pupas para o procedimento de irradiação.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Placas de Petri forradas com papel de filtro e algodão umedecidos em água, contendo pupas de *Aedes aegypti*.

### 7.3 Avaliação das doses de radiação gama

Para avaliar o nível de esterilidade induzido nos mosquitos machos pelas doses de 30, 40 e 50 Gy, foram formados Dois grupos: **Grupo A (teste)** representado por casais de fêmeas não irradiadas (Fêmea-NI) com machos irradiados (Macho-I); e **Grupo B (controle)** composto por casais de fêmeas não irradiadas (Fêmea-NI) com machos não irradiados (Macho-NI).

A esterilidade foi avaliada de forma individual, em recipiente plástico transparente (16 X 8 cm) , telado, contendo apenas um casal e de forma coletiva em gaiola telada (15 X 20 cm), contendo 25 fêmeas e 25 machos (Figura 11). Machos e fêmeas foram alimentados com solução de açúcar a 10%, *ad libitum* e, adicionalmente, às fêmeas foi oferecido por um período de 20 minutos, um repasto com sangue de galinha (*Gallus gallus*), para a obtenção das progênes nos dois grupos.

Para o acompanhamento dos casais em compartimento individual foram formadas três réplicas de 20 casais (totalizando 60 fêmeas) para cada grupo e duas repetições do experimento. Cada casal de mosquitos foi acondicionado no recipiente e permaneceu sob esta condição por três dias consecutivos para permitir a cópula. Ao fim deste período, as fêmeas de cada grupo foram transferidas para uma gaiola comum para o repasto sanguíneo e posteriormente, as que atingiram as completamente engorgitadas foram novamente acondicionadas nos recipientes individuais, devidamente identificados. Este procedimento permitiu a recuperação dos ovos correspondentes a cada uma das 60 fêmeas analisadas.

Para o experimento coletivo, também foram formados dois grupos: **Grupo A (teste)** representado por casais de Fêmea-NI acasaladas com Macho I; e **Grupo B (controle)** casais compostos por Fêmea-NI e Macho-NI.

Foram observadas duas réplicas (totalizando 50 machos e 50 fêmeas) em duas repetições do experimento. O repasto sanguíneo foi ofertado uma ou até duas vezes na semana para ambos os grupos. Os ovos foram coletados utilizando um papel filtro ajustado a um copo descartável (50 ml), contendo 20 ml de água.

**Figura 18** - Objetos utilizados para acondicionamento e acompanhamentos de casais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Gaiola de experimento individual (esquerda) e experimento coletivo (direita)

Os ovos coletados dos dois testes (individual e coletivo) foram contados e postos para a eclosão das larvas, logo após a finalização da embriogênese (72 h) seguindo a metodologia descrita no item 7.1. Ovos que não eclodiram após o estímulo com a água, foram submetidos à técnica de clarificação para visualização do embrião. Uma amostra aleatória de 30 ovos foi tomada de cada grupo. A metodologia de Trips, adaptada por Hanson; Craig (1994), foi adotada para clarificação dos ovos. O método utiliza uma solução composta por 3 g de clorito de sódio, 2 ml de ácido acético glacial e 1000 ml de água destilada, por um período de aproximadamente 40 minutos, a qual leva a despigmentação do ovo. Após clarificação, os ovos foram submetidos à microscopia óptica convencional para verificação da presença ou não de embrião.

#### **7.4 Sobrevivência de pupas em placa de Petri**

A sobrevivência das pupas irradiadas e sua passagem para a fase adulta foi acompanhada quando além do acondicionamento em placas de Petri foram: 1) expostas as doses de 30, 40, 50 Gy; 2) submetidas a diferentes densidades 50, 100 e 300 pupas/placa e 3) permanência por períodos prolongados de tempo, 6 e 12 horas na placa de Petri, ou seja longe do contato direto com a água. Cada tratamento foi repetido duas vezes. Todas as placas foram mantidas nas mesmas

condições de temperatura, umidade e fotoperíodo, já referidos para a manutenção dos mosquitos em laboratório no item 7.1.

### **7.5 Verificação dos parâmetros biológicos de *Aedes aegypti* após processo de esterilização por radiação**

Os seguintes parâmetros biológicos foram observados nos grupos teste e controle: **a) longevidade**, estimada em dias, equivalente ao tempo de sobrevivência dos mosquitos adultos, machos e fêmeas, alimentados com solução açucarada a 10%; **b) fecundidade**, estimada pelo número de ovos/fêmea após um repasto sanguíneo, para os cruzamentos referidos no item 7.3; e **c) fertilidade**, estimada pelo número de L<sub>1</sub>/número de ovos/fêmea para os mesmos cruzamentos.

### **7.6 Efeito da radiação gama sobre a reprodução de fêmeas**

Os mesmos parâmetros biológicos foram avaliados apenas para as fêmeas irradiadas com 40 Gy. Para tanto as mesmas foram submetidas ao cruzamento com machos não irradiados (fêmea I x macho NI) e comparadas ao grupo controle (fêmea NI x macho NI), para a definição do sucesso reprodutivo.

Os parâmetros também foram avaliados de forma individual e coletiva, tal como referido no item 7.5, com exceção do número de casais individuais que ao invés de 20 foram 15. A avaliação individual foi realizada com três réplicas de 15 casais (fêmea I x macho NI) em dois experimentos independentes. Da mesma forma, a avaliação coletiva, utilizou duas réplicas com 20 fêmeas irradiadas e 20 machos não irradiados em duas repetições.

### **7.7 Competitividade para o acasalamento: testes em condições simuladas de campo (TCS)**

Para realizar os experimentos de competitividade, os mosquitos foram liberados em uma gaiola (compartimento) de madeira e tela, com grandes dimensões (2 x 2 metros), posicionada na área externa do CPqAM, em local protegido da chuva mas, exposto às demais variáveis ambientais (temperatura, umidade, exposição solar) (Figura 19). Assim, machos irradiados com 40 ou 50 Gy,

portanto machos estéreis (ME) foram liberados no interior da gaiola junto com machos não irradiados (MNI) e fêmeas virgens também não irradiadas (FNI), com idade de dois a três dias. As fêmeas foram alimentadas com sangue (*Gallus gallus*) por um período de 20 minutos, 24 h antes de serem liberadas na gaiola. As seguintes proporções foram testadas:

- a) 5 ME : 1 MNI : 1 FNI (125:25:25) N = 150
- b) 10 ME : 1 MNI : 1 FNI (250:25:25) N = 300
- c) 15 ME : 1 MNI: 1 FNI (300:20:20) N = 340

Simultaneamente, também foram selecionados da mesma amostra, 15 ME e 10 FV, os quais serviram como controle positivo para confirmação da esterilidade.

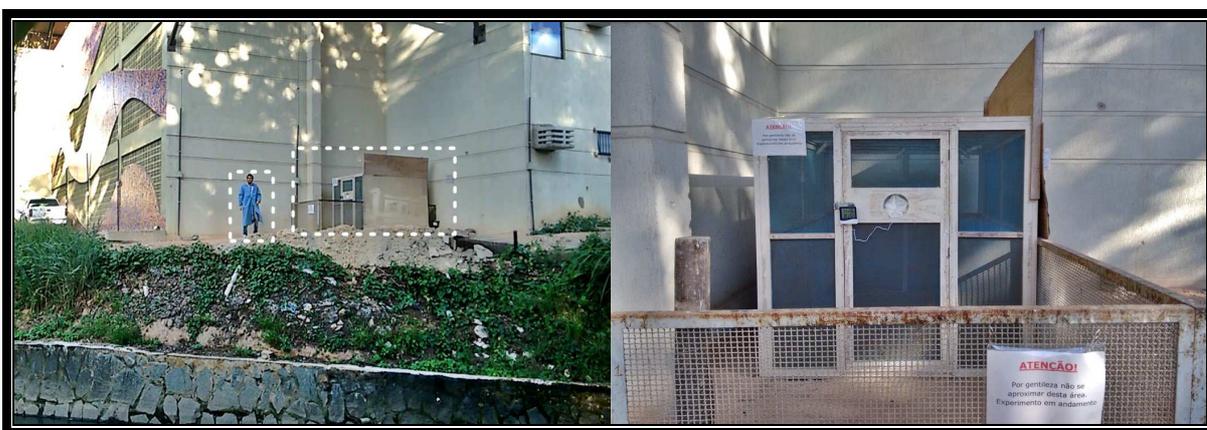
Os machos foram introduzidos na gaiola TCS 15 minutos antes das fêmeas. Como fonte de carboidrato para os mosquitos, cinco suportes contendo algodão embebido em solução açucarada a 10% foram afixados em diferentes pontos da gaiola, onde ficaram disponíveis durante todo o experimento e foram repostos por novos suportes a cada cinco dias (Figura 19 C,D).

Para potencializar o processo de oviposição, após o 5º dia da liberação dos mosquitos, foram instaladas na gaiola quatro armadilhas para coleta de ovos (ovitrapa). A armadilha seguiu o modelo descrito em REGIS *et al.*, (2008) e era um recipiente de cor preta, preenchido com 2,5 L de água potável, dois pedaços de madeira porosa (eucatex) de 10 x 15 cm, que serviram às fêmeas como suportes para deposição dos ovos (Figura 19 A). As ovitrapas foram distribuídas nos quatro ângulos da gaiola e instaladas a 1 m do chão (Figura 19 B). As armadilhas foram retiradas após dez dias da liberação dos mosquitos na gaiola de TCS e os mosquitos presentes na gaiola foram capturados por aspiração mecânica e armazenados para identificação e contagem.

Antes da contagem dos ovos, as palhetas ainda permaneceram em contato com a água por três dias para permitir a finalização da embriogênese dos ovos que, eventualmente, tivessem sido postos no dia de remoção das ovitrapas. Ovos íntegros e ovos já rompidos foram contados separadamente. Depois desta primeira contagem, as palhetas foram submersas em uma bandeja com água, com baixo teor de oxigênio dissolvido, para a eclosão das larvas, por dois dias consecutivos, com o intuito de verificar o percentual final de eclosão. Os experimentos de TCS foram

realizados por um período de cinco meses (dezembro de 2014 a abril de 2015), com duração de 15 dias para cada experimento. Para cada proporção testada foram realizadas duas repetições. Durante os testes as fêmeas receberam apenas uma alimentação sanguínea. Variáveis ambientais como temperatura, umidade relativa do ar, insolação (horas de sol/dia) e pluviometria foram registradas com base nas medições do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) na Estação Curado, em Recife, Pernambuco, Brasil.

**Figura 19** - Gaiola utilizada em teste de competitividade em ambiente simulado de campo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Esquerda: Relação de tamanho entre Gaiola TCS e uma pessoa de 1,70 m; Direita: Gaiola de teste em campo simulado.

**Figura 20** – Esquematização do ambiente interno do experimento de competitividade em campo simulado



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A) Ovitrapa e seus componentes; B) Disposição das ovitrapas na gaiola TCS; C) Dispositivo usado para acondicionar a solução de sacarose; D) Posicionamento dos dispositivos contendo a solução de sacarose.

## **7.8 Desenho experimental e análise de dados**

O delineamento experimental desse estudo foi inteiramente casualizado e a análise comparativa dos resultados referentes aos testes de longevidade e competitividade para o acasalamento dos machos irradiados com diferentes doses de radiação gama, bem como a fecundidade e fertilidade das fêmeas acasaladas com machos irradiados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), teste de Tukey a posteriori, teste de Shapiro – Wilk, teste de Bartlett e teste de Kruskal – Wallis. Todas as análises foram realizadas com o software STATISTICA 7.1, a um nível de significância de 5%.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Sobrevivência de pupas ao meio de acondicionamento para esterilização

Os resultados revelaram que as pupas sobreviveram às três doses de radiação gama testadas, 30, 40 e 50 Gy, independente do tempo de acondicionamento em placas de Petri antes da exposição, de seis ou doze horas, ou das densidades testadas (Tabela 1). Para os grupos 40 Gy e 50 Gy, foi observada uma mortalidade muito baixa de até 0,6%, nas placas com maior densidade de pupas (300) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Percentual de mortalidade de pupas acondicionadas em placas de Petri após o procedimento de irradiação em diferentes períodos de tempo e densidade.

Variáveis	tempo (h)	Dose de radiação gama (Gy)											
		Controle			30			40			50		
Densidade de pupas		50	100	300	50	100	300	50	100	300	50	100	300
Mortalidade	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5%
	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2%	0	0	0,6%

Fonte: Elaborado pelo autor.  
Legendas: Gy – Gray.

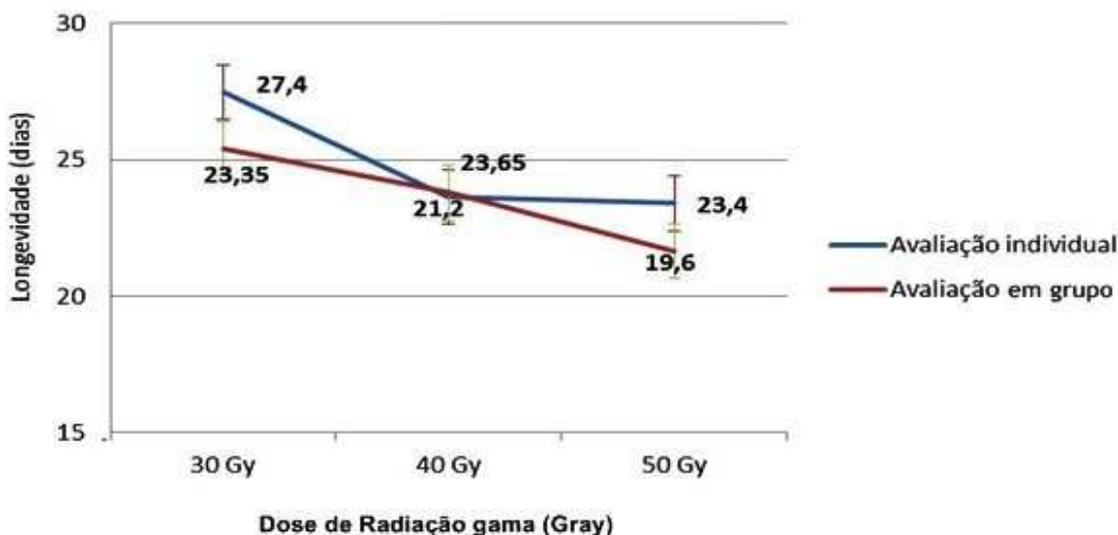
### 8.2 Desempenho biológico de machos de *Aedes aegypti* esterilizados por radiação gama

#### 8.2.1 Longevidade

A sobrevivência dos machos irradiados acondicionados individualmente com fêmeas virgens para as doses de 40 e 50 Gy foi significativamente menor ( $F=31,51$ ;  $GI=3,191$ ;  $p=0,009$ ) do que o grupo controle. A comparação entre as doses revelou ainda que a sobrevivência foi inversamente proporcional à quantidade de radiação usada para a exposição (Tabela 3), logo, os indivíduos do grupo 50 Gy foram os menos longevos (23,4 dias).

Da mesma forma, nas amostras de machos mantidos em grupo foi observada uma redução significativa ( $F= 31,54$ ;  $GI =3,195$ ;  $p = 0,007$ ) da sobrevivência dos indivíduos irradiados demonstrando que a presença de fêmeas e conseqüentemente a atividade de cópula influenciam a longevidade dos machos (Figura 21).

**Figura 21** - Longevidade de mosquitos irradiados em avaliação individual e em grupo



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Influência do tipo de acondicionamento (individual ou em grupo) em relação à longevidade machos irradiados.

### 8.2.2 Fecundidade e fertilidade

A análise da fecundidade e fertilidade das fêmeas acasaladas com machos irradiados revelou, de forma indireta o efeito de esterilização promovido pelas diferentes doses de radiação gama. Os parâmetros analisados estão dispostos na tabela 2.

**Tabela 2** - Fecundidade e fertilidade de fêmeas de *Aedes aegypti* acasaladas com machos submetidos à esterilização por radiação gama e longevidade dos machos irradiados ou não.

Dose de radiação	Amostras	Número de ovos	Número de larvas (L1)	Longevidade (machos)	Fecundidade	Fertilidade
30 Gy	Individual N = 120	5631	1953	27,4 dias ± 3,1 <sup>A</sup>	63,9% <sup>A</sup>	34,6% <sup>A</sup>
	Grupo N = 50	2745	1152	23,3 dias ± 2,8 <sup>B</sup>	*NA	42% <sup>A</sup>
40 Gy	Individual N = 120	6153	985	23,6 dias ± 3,2 <sup>B</sup>	56,2% <sup>A</sup>	16% <sup>B</sup>
	Grupo N = 50	2480	471	21,2 dias ± 2,7 <sup>B</sup>	*NA	19% <sup>B</sup>
50 Gy	Individual N = 120	5318	0	23,4 dias ± 1,3 <sup>B</sup>	59,4% <sup>A</sup>	0 <sup>C</sup>
	Grupo N = 50	2120	0	19,6 dias ± 2,2 <sup>C</sup>	*NA	0 <sup>C</sup>
Controle	Individual N = 120	6966	4527	27,5 dias ± 2,9 <sup>A</sup>	63,9% <sup>A</sup>	63% <sup>D</sup>
	Grupo N = 50	3127	2220	24,9 dias ± 2,5 <sup>B</sup>	*NA	71% <sup>D</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Análise do sucesso reprodutivo de fêmeas acasaladas com machos irradiados. Fecundidade: Percentual de fêmeas que realizaram oviposição; Fertilidade: Percentual de ovos viáveis (número de larvas L1). Legenda: Gy – Gray. NA – Não se aplica. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Kruskal – Wallis e Barlett ( $P < 0,05$ ).

Para a análise da fecundidade foi realizado inicialmente o teste de Barlett para verificar a homogeneidade das variâncias, cujo valor de p maior do que o nível de significância de 5% ( $p = 0.6955$ ) aceita a hipótese de igualdade das variâncias, permitindo o teste de análise de variância. O teste de ANOVA revelou que não foi observada diferença significativa entre os grupos, concluindo que os tratamentos 30, 40, 50 Gy e controle possuem o mesmo comportamento no que diz respeito ao número de fêmeas que realizaram a oviposição, bem como o número de ovos postos por grupo.

No entanto, para o parâmetro de fertilidade, não foi observado o mesmo resultado. O teste não paramétrico de Kruskal Wallis, por comparações múltiplas entre os tratamentos, revelou que o número de ovos embrionados, cujas larvas eclodiram em resposta ao contato com a água, foi reduzido em função do aumento da dose de radiação, até a completa inviabilidade, observada apenas na maior dose (50 Gy), que diferiu significativamente dos grupos expostos às doses menores de radiação ( $\text{dif} = 50 \text{ Gy} - 30\text{Gy} = 124.13599 / 50 \text{ Gy} - 40 \text{ Gy} = 93.48998$  ;  $p = 0,05$ ). Portanto, a esterilidade de todos os machos só foi alcançada com a dose de 50 Gy (Tabela 4).

A análise da clarificação dos ovos ainda íntegros, mesmo após o contato por dois dias consecutivos com a água, revelou que todos estavam inférteis, ou seja,

não estavam embrionados, inclusive os que pertenciam ao grupo controle. Além disso, estes ovos também apresentavam morfologia externa alongada, não elipsoide, com aspecto deformado diferentes do observado nos ovos férteis/embrionados do grupo controle (Figura 22). Os ovos inférteis, durante o procedimento de clarificação, se romperam deixando extravasar uma substância amorfa translúcida (Figura 22).

**Figura 22** - Morfologia de ovos viáveis (embrionados) e inviáveis (não fertilizados) submetidos à técnica de clarificação para detectar a presença de embrião.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: A e B) Ovos não fertilizados de aspecto deformado, não elipsoide, apresentando visível deterioração. C e D) Ovos fertilizados, apresentando forma elipsoide, sem deterioração da estrutura e com presença de embrião. Setas em vermelho destacando os segmentos abdominais do embrião.

### 8.3 Competitividade para o acasalamento: testes em condições simuladas de campo

Considerando que a análise da longevidade dos machos esterilizados com ambas as doses não diferiu significativamente, 50 Gy foi a dosagem escolhida para os testes de competitividade sexual. Foram observadas diferenças significativas para o parâmetro de fertilidade entre as proporções testadas (Tabela 3). A proporção

de 5:1 (ME:MNI) foi a que resultou no menor índice de esterilidade, inviabilizando apenas 24,5% dos ovos analisados.

Utilizando a proporções de 10:1 (ME:MNI) observou-se uma redução de cerca de 80% dos ovos viáveis e o percentual foi um pouco maior, 85% a 87%, na proporção de 15:1 (ME:MNI). Apesar disso, a eficiência de inviabilização de ovos não diferiu significativamente da proporção 10:1 (ME:MNI).

**Tabela 3** - Experimento de competitividade entre machos de *Aedes aegypti* irradiados (estéreis) e não irradiados para o acasalamento com fêmeas em condições simuladas de campo.

Proporção de mosquitos/ Densidade	Número de ovos/teste	Número de larvas	Percentual de ovos inviáveis	Número de mosquitos recapturados (após 15 dias)
5 ME : 1 MNI : 1 FV 125 : 25 : 25	1.264	955	24,5% <sup>A</sup>	31 Machos (21%) 17 Fêmeas (68%)
10 ME : 1 MNI : 1 FV 250 : 25 : 25	1.416	240	83,1% <sup>B</sup>	47 Machos (16%) 21 Fêmeas (84%)
250 : 25 : 25	860	175	79,6% <sup>B</sup>	55 Machos (18%) 16 Fêmeas (64%)
15 ME : 1 MNI : 1 FV 300 : 20 : 20	1 643	210	87,3% <sup>B</sup>	69 Machos (23%) 19 Fêmeas (76%)
300 : 20 : 20	879	128	85,4% <sup>B</sup>	65 Machos (20%) 17 Fêmeas (85%)

Fonte: Dados do autor

Nota: Dados dos testes de campo simulado para análise da competitividade entre machos estéreis e férteis; Percentual de ovos viáveis (número de larvas L1). Legenda: Gy – Gray; ME – Macho Estéril; MNI – Macho não irradiado; FV – Fêmea Virgem.

O acompanhamento das variáveis ambientais durante o período dos testes de campo simulado (TCS) revelou que em média a temperatura variou de  $27 \pm 1,4$  a  $29 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ , com  $70 \pm 1,2$  a  $80 \pm 1,6\%$  de umidade relativa do ar, 8h a 10h de sol/dia e  $2,9 \pm 1,1$  a  $9,3 \pm 3,1\text{mm}$  de chuva (Tabela 4). Estes dados demonstram que a variável ambiental que mais sofreu alteração foi a pluviometria e que os valores mais altos foram observados nos três últimos testes, realizados nos meses de fevereiro a abril/2015. Assumindo que os machos não irradiados apresentaram uma longevidade média de 25 dias, portanto, significativamente maior do que a estimada para os estéreis (19 dias) e que não houve marcação diferenciada para identificar os machos destes dois grupos, foi deduzida da quantidade de machos recapturados 15 dias após ser iniciado cada teste-TCS o número de machos não irradiados liberados.

Assim, teoricamente, o percentual de recaptura de machos estéreis nos testes de campo simulado variou de 4,8% a 16,3%. De um modo geral, estes valores revelam um baixo número de machos recapturados entre as diversas proporções, demonstrando que a maioria dos machos morre com menos de 20 dias de vida.

**Tabela 4** - Valores das variáveis ambientais inferidos ao longo dos experimentos de competitividade reprodutiva dos machos estéreis de *Aedes aegypti*, em testes simulados de campo.

Variáveis Ambientais	Valores	Teste em campo simulado/proporção macho estéril (ME): macho não irradiado (MNI) (Período)				
		5 <sub>ME</sub> :1 <sub>MNE</sub> (10/11/14 a 30/11/15)	10 <sub>ME</sub> :1 <sub>MNE</sub> (11/12/14 a 30/12/15)	10 <sub>ME</sub> :1 <sub>MNE</sub> (22/01 a 11/02/2015)	15 <sub>ME</sub> :1 <sub>MNE</sub> (12/02 a 02/03/2015)	15 <sub>ME</sub> :1 <sub>MNE</sub> (15/03 a 05/04/2015)
<b>Temperatura (°C)</b>	Mín	25 ± 2,2	23 ± 3,2	23 ± 5,2	24 ± 2,2	22 ± 3,2
	Méd	29 ± 0,4	27 ± 1,4	27 ± 1,7	27 ± 2,4	27 ± 1,4
	Máx	31 ± 4,0	31 ± 1,0	32 ± 1,2	31 ± 3,0	31 ± 1,0
<b>Umidade relativa (%)</b>	Mín	60 ± 0,5	60 ± 0,2	60 ± 0,3	60 ± 0,4	70 ± 3,2
	Méd	70 ± 1,7	70 ± 1,2	70 ± 2,4	80 ± 1,6	75 ± 4,2
	Máx	85 ± 0,2	80 ± 5,2	80 ± 4,2	90 ± 3,2	90 ± 3,2
<b>Insolação (horas/dia)</b>	Mín	3,0 ± 1,2	3 ± 2,2	1,5 ± 1,2	2,5 ± 2,2	4,0 ± 5,2
	Méd	8,0 ± 2,0	8 ± 3,4	10,0 ± 3,8	9,5 ± 2,4	9,5 ± 4,4
	Máx	12,0 ± 1,9	10 ± 1,6	10,5 ± 1,0	10,0 ± 3,6	10,0 ± 3,6
<b>Pluviometria (mm)</b>	Mín	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,4
	Méd	2,9 ± 1,1	2,3 ± 1,1	8,3 ± 3,1	5,3 ± 1,1	9,3 ± 3,1
	Máx	12,2 ± 4,8	11,0 ± 9,8	22 ± 2,1	37,0 ± 5,8	41,4 ± 7,8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Dados obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) em Recife, Pernambuco, Brasil – Estação Curado. Legendas: C° - Celsius; mm – Milímetros.

#### 8.4 Desempenho reprodutivo de fêmeas submetidas à radiação gama

As fêmeas irradiadas com 40 ou 50 Gy não realizaram postura, mesmo após dois repastos sanguíneos sucessivos. Em comparação, cerca de 70% das fêmeas do grupo controle ovipositaram neste mesmo período. Os resultados foram semelhantes nas avaliações de fêmeas mantidas individualmente ou em grupo (Tabela 5).

A longevidade das fêmeas irradiadas, mantidas em gaiolas individuais ou coletivas, não diferiu significativamente do grupo controle (Tabela 6).

**Tabela 5-** Longevidade, fecundidade e fertilidade de fêmeas irradiadas com 40 e 50 Gy.

Dose de radiação/Fêmea	Amostras	Longevidade	Fecundidade (%)	Fertilidade (%)
40 Gy	Individual N = 90	28,3 ± 3,2 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
	Grupo N = 40	27,4 ± 2,7 <sup>A</sup>	NA	0 <sup>A</sup>
50 Gy	Individual N = 90	26,2 ± 1,3 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
	Grupo N = 40	25,8 ± 2,2 <sup>A</sup>	NA	0 <sup>A</sup>
Controle	Individual N = 90	30,1 ± 2,9 <sup>A</sup>	72% <sup>B</sup>	77% <sup>B</sup>
	Grupo N = 40	30,4 ± 2,5 <sup>A</sup>	NA	81% <sup>B</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Análise do sucesso reprodutivo de fêmeas irradiadas acasaladas com machos não irradiados; Fecundidade: Percentual de fêmeas que realizaram oviposição; Fertilidade: Percentual de ovos viáveis (número de larvas L1). Legenda: Gy – Gray; NA = não se aplica.

## 9 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta evidências da elevada efetividade de doses de radiação gama, iguais a 40 e 50 Gy, para a esterilização de machos de *Aedes aegypti* de laboratório e, a indicação de um baixo custo biológico associado a seus efeitos sobre a competitividade reprodutiva destes mosquitos, revelando seu potencial para uso no controle genético de populações naturais desta espécie.

Estudos prévios demonstram que a exposição durante o estágio de pupa permite que sejam utilizadas doses menores de radiação para induzir esterilidade na fase adulta. Níveis de 95% de esterilidade em machos adultos seriam alcançados com dosagens superiores a 70 Gy, enquanto que o mesmo resultado seria observado com pupas expostas a apenas 40 Gy (BALESTRINO, HELINSKI *et al.*, 2009; DAME *et al.*, 2013).

Nossos resultados confirmaram que mais de 94% das pupas acondicionadas em papel de filtro umedecido em placa de Petri, mesmo em densidade de 300 pupas/placa mantidas sob esta condição por períodos de até 12h, sobreviveram ao processo e emergiram com sucesso. Resultados similares foram referidos para espécies de anofelinos, com densidades de 500 indivíduos/placa (HELINSKI *et al.*, 2009) e mais recentemente, para *A. albopictus*, cujas pupas foram irradiadas em dispositivos que albergavam cerca de 20.000 indivíduos, sem acarretar perdas elevadas associadas a mortalidade no processo de manipulação (BALESTRINO *et al.*, 2010). Assim, a manipulação na fase de pupa pode trazer vantagens operacionais especialmente relacionadas à liberação de machos estéreis em larga escala.

Durante o processo de esterilização dos machos em nosso estudo foi observado que as doses de 40 e 50 Gy induziram níveis bem diferenciados de inviabilidade de ovos, a primeira eliminou apenas 85% dos indivíduos e a segunda promoveu supressão total dos descendentes. Além disso, um percentual considerável de fêmeas acasaladas com machos estéreis 40 Gy conseguiram deixar descendentes viáveis. Considerando que a longevidade dos machos esterilizados com ambas as doses não diferiu significativamente, 50 Gy foi a dosagem escolhida para os testes de competitividade sexual. Uma base de dados internacional desenvolvida por Bakri *et al.*, (2005) sobre esterilização e desinfestação de insetos, a qual reúne cerca de 2.750 referências sobre estudos com doses radioativas e

programas de controle, demonstra que as doses utilizadas para induzir esterilidade na ordem dos dípteros variam de 20 a 160 Gy, e, entre as famílias de insetos deste grupo, mais precisamente a Culicidae, são geralmente utilizadas doses que variam entre 30 a 50 Gy (BAKRI *et al*, 2005).

Entre os parâmetros biológicos analisados, foi notado que a longevidade de machos estéreis foi diretamente influenciada pela radiação e também pela presença de fêmeas no mesmo ambiente. Neste estudo, mosquitos irradiados apresentaram uma média de sobrevivência menor (23,5 dias) em comparação ao grupo controle (27,4 dias). Mosquitos expostos a maior dose de radiação (50 Gy) em um ambiente sem a presença de fêmeas, apresentaram uma sobrevivência média de 23,5 dias, enquanto que, na presença delas a sobrevivência média dos machos caiu para 19,6 dias.

Informações recentes com populações de *A. albopictus*, demonstram que a esterilidade ideal foi alcançada com doses de 35 e 40 Gy, portanto, um pouco menores do que as encontradas em nosso estudo. Também foram referidos impactos negativos sobre a sobrevivência de machos estéreis relacionados à exposição à radiação e a atividade de cópula, devido ao gasto energético provocado por ambos (BALESTRINO *et al.*, 2010; OLIVA *et al.*, 2012; 2013).

Em relação ao teste de competitividade em campo simulado, foi demonstrado em nosso estudo, que apenas proporções equivalentes ou superiores a 10:1 (macho irradiado: macho não irradiado), levaram a reduções significativas e próximas a 80% na produção de ovos viáveis. Testes de competitividade com outras espécies, como *A. albopictus* em laboratório e em testes de campo simulado, revelaram que proporções de 5:1, podem ser praticadas, mas que uma redução expressiva de ovos viáveis somente é alcançada com o uso de proporções maiores (MADAKACHERRY *et al.*, 2013). Fatores como inseminação múltipla já verificada para esta espécie de *Aedes* (LACROIX *et al.*, 2012), alimentação, tipo de gaiola e manipulação humana, acabam sendo variáveis significativas no processo de análise em testes de competitividade (OLIVA, *et al.*, 2013).

Durante os testes de campo simulado, foi também observado um baixo número de machos recapturados entre as diversas proporções. Como demonstrado em estudos anteriores de soltura e recaptura de machos estéreis, fatores externos como baixa umidade relativa, alta temperatura e intensa atividade solar, influenciam diretamente em parâmetros como capacidade de dispersão, aumento do metabolismo energético e conseqüentemente maior procura por carboidratos

(BELLINI *et al.*, 2010; OLIVA *et al.*, 2012; PONLAWAT, 2009). Estes fatores aliados à presença de fêmeas e competitividade por acasalamento resultam em diminuição da longevidade dos machos em campo e em um baixo índice de recaptura, reafirmando a necessidade da utilização de proporções bem maiores de machos estéreis em campo (PUGGIOLI *et al.*, 2013; YAMADA, *et al.*, 2014).

A técnica do inseto estéril prevê, a princípio, apenas a liberação de machos estéreis, utilizando diversos tipos de mecanismos para separar pupas do sexo masculino e feminino (sexagem). No entanto, as limitações de alguns métodos de sexagem, sobretudo os baseados na separação mecânica dos indivíduos, pode levar a liberação de algumas fêmeas menores junto com os machos estéreis. Frequentemente, medidas adicionais de controle da qualidade do material produzido e pronto para liberação são tomadas para reduzir o risco de soltura de fêmeas. Nesta perspectiva, os estudos também buscam avaliar o efeito da radiação sobre as fêmeas e o custo biológico associado a este tipo de exposição (ROBINSON, 2005).

Em nosso estudo, pupas fêmeas expostas às doses de 40 e 50 Gy, não apresentaram mortalidade durante o procedimento, desenvolvendo-se de forma similar ao grupo não irradiado até a fase adulta. As fêmeas irradiadas não demonstravam alteração de comportamento durante o repasto sanguíneo ou a cópula. No entanto, após acasalarem com machos não irradiados apresentavam fecundidade e fertilidade completamente reprimida pela radiação, resultando em completa esterilidade. Estudos recentes com fêmeas de *A. albopictus* expostas à irradiação de 20 Gy demonstraram uma baixíssima viabilidade de ovos (1,8%) e completa esterilidade em doses de 30 e 40 Gy (BALESTRINO *et al.*, 2010). A sensibilidade de pupas fêmeas à radiação ionizante foi também detectada em outras espécies de inseto (BAKRY *et al.*, 2005). Tal fato é devido à maior radiosensibilidade dos tecidos compostos, principalmente, por células que se encontram em intensa atividade mitótica, como células germinativas (oócitos e ovócitos) presentes nos ovários (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Estudos anteriores envolvendo fêmeas expostas à radiação sugerem que a interrupção do ciclo reprodutivo, pode levar ao aumento do tempo de vida. Isso foi correlacionado ao fato de que, ovócitos estéreis levam a uma paralisação da oogênese, ocasionando um redirecionamento de energia e aumento da sobrevivência (HAFEZ; SHOUKRY, 1972). Em nosso estudo, observamos que a longevidade de

fêmeas irradiadas foi similar ao do controle, 30,1 e 30,4 dias, respectivamente, em gaiolas individuais, e não diferiu significativamente.

As informações geradas em nosso estudo revelam que os machos estéreis suportaram as condições ambientais do grande Recife e se mostraram capazes de competir pelas fêmeas com machos não irradiados, em campo simulado. Estes achados permitem sugerir que a técnica do inseto estéril tem grande potencial como ferramenta de controle populacional do mosquito *A. aegypti*. No entanto, testes pilotos em áreas urbanas serão necessários para avaliar o desempenho dos machos estéreis em condições reais de campo e, mais que isso será necessário conhecer o nível de infestação destas áreas para definir a viabilidade de produção massal dos estéreis.

## 10 CONCLUSÕES

- a) Doses equivalentes a 40 e 50 Gy levaram a esterilidade dos machos e não comprometeram seu potencial competitivo para o acasalamento;
- b) O custo biológico associado à exposição à radiação gama foi observado sobre a longevidade dos machos estéreis e o potencial reprodutivo de fêmeas, sobretudo, quando os indivíduos foram expostos às doses de 40 e 50 Gy;
- c) Doses a partir de 40 Gy promovem completa esterilidade das fêmeas, aspecto que tende a minimizar riscos associados ao aumento populacional da espécie-alvo, em caso de liberação conjunta com machos estéreis em campo;
- d) Efeitos de redução superiores a 80% na viabilidade de ovos só foram encontrados quando a proporção de machos estéreis de *A. aegypti* foi igual ou maior a 10 vezes do que a de machos não irradiados;
- e) Os resultados encontrados neste estudo trazem fortes evidências de que populações locais de *A. aegypti*, similares à RecL, podem ser utilizadas na produção de machos esterilizados por radiação gama;
- f) O conjunto de informações geradas neste estudo sobre: doses efetivas para a esterilização, tempo máximo de vida dos machos estéreis e melhor proporção destes indivíduos para que sejam mais competitivos do que os machos de campo, são de grande relevância para a aplicação da técnica do macho estéril para o controle local das populações de *A. aegypti*.

## REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Mosquito-Disseminated Pyriproxyfen Yields High Breeding-Site Coverage and Boosts Juvenile Mosquito Mortality at the Neighborhood Scale. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, California, v. 9, p. e0003702, 2015.

ACIOLI, R. D. **O uso de armadilhas de oviposição (ovitrapas) como ferramenta para monitoramento populacional do *Aedes* spp em bairros do Recife**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

ALPHEY, L. Re-engineering the steril insect technique. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, p. 1243-1247, 2002.

ALPHEY, L. et al. Insect population suppression using engineered insects. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Oxford, v. 627, p. 93-103, 2008.

ALPHEY, L. et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: An analysis. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Oxford, v.10, p. 295-311, 2009.

ARAUJO, A. P. et al. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, London, v. 41, p. 339-347, 2007.

ARAUJO, A. P. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, p. 297, 2013.

ARAUJO-COUTINHO, C. J. Biological control program against simuliids in the State of São Paulo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 131-133, 1995.

ASMAN, S. M. et al. Pilot release of a sex-linked multiple translocation into a *Culex tarsalis* field population in Kern County, **Mosquito News**, California. v. 39, p. 248–258, 1979.

AYRES, M. et al. **Bioestat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 5. ed. Belém: Ong Mamiraua, 2007. 364 p.

AYRES, C. E. et al. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 20, p. 350-356, 2004.

BAKRI, A. et al. Sterilizing insects with ionizing radiation. In: **Sterile Insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**.

DYCK, V. A.; HENDRICHS. J.; ROBINSON, A.S. (Eds), 233-269, Springer, Netherlands, 2005.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504–50, 2013.

BALESTRINO, F. et al. Mass Production cage for *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 51, p. 155-163, 2014.

BALESTRINO, F. et al. Gamma ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 47, p. 581–591, 2010.

BARRY, J. D. et al. Potential for Reducing Overflooding Ratios of Sterile Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) with the Use of Ginger Root Oil. **The Florida Entomologist**, California, v. 86, p. 29-33, 2003.

BATE, M.; ARIAS, A. M. **The development of *Drosophila melanogaster***. New York: Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1993. 564 p.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic: Plenum Publishers, 2003. 377 p.

BELLINI, R. et al. Sugar administration to newly emerged *Aedes albopictus* males increases their survival probability and mating performance. **Acta tropica**, Mexico, v. 132, p. 116-123, 2013.

BELLINI, R. et al. Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 50, p.317-325, 2013.

BELLINI, R. et al. Mating Competitiveness of *Aedes albopictus* Radio-Sterilized Males in Large Enclosures Exposed to Natural Conditions, **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 50, p. 94-102, 2013.

BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 19, p. 349-355, 2003.

BESERRA, E. B. et al. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p.847-852, 2009.

BIRAL, A. R. **Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos**. Florianópolis: Insular, 2002. 232 p.

BOGDANOV, A. P. et al. First Investigation of the Gamma-Gamma Coincidences in the Ca44 (n,  $\gamma$ ) Ca45 Reaction. **Soviet Journal of Nuclear Physics**, Yadern, v.10, p. 31, 1970.

BONATO, C. C.; ELNECAVE, R. H. Thyroid disorders associated with external radiation in children and adolescents. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, São Paulo, v. 55, p. 359-366, 2011.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.16, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Reunião técnica para a discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil**. Relatório final, 30 p. Brasília, 2004.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, p. 605-613, 1998.

BUSHLAND, R. C.; D. E. HOPKINS. Sterilization of screwworm flies with X-rays and gamma rays. **Journal of Economic Entomology**, College Park MD, v. 46, p.648–656, 1953.

BUSHLAND, R. C. Eradication program in the southwestern United States, Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. Miscellaneous **Publications of the Entomological Society of America**, College Park MD, v. 62, p.12-15, 1985.

CAPALBO, D. M. F. et al. Produção de bactérias entomopatogênicas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008.

CARVALHO, D. O. et al. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, v. 83, p 1-10, 2014.

CATERUCCIA, F. et al. Transgenic technologies to induce sterility. **Malaria Journal**, London, v. 8, p. 1475-2875, 2009.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (Estados Unidos). **DengueMap**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/Dengue/>>. Acesso em: 6 set. 2013.

CENTER FOR INFECTIOUS DISEASE RESEARCH POLICY ACADEMIC HEALTH CENTER. **Researchers identify fifth dengue subtype**. Minnesota, 2013. Disponível em: <<http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2013/10/researchers-identify-fifth-dengue-subtype>>. Acesso em: 6 set. 2013.

CHADEE, D. D.; GILLES, J. R. The diel copulation periodicity of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) at indoor and outdoor sites in Trinidad. West Indies, **Acta Tropica**, Basel, v. 132, p.91-95, 2013.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. London: CABI, 1992. 752 p. v. 1.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press, 1960. 738 p.

CRINNION, W. J. Environmental Medicine: Pesticides – Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins. **Alternative Medicine Review**, Saindpoint, v. 5, p. 432-447, 2000.

COQUEREL, C. Note sur une larve d'oestrideextrai tedubras d'um homme à Cayenne. **Revue et magasin de zoologie pure et appliquée**, Paris, v. 11, p. 356-361,1859.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.

COUCH T. L., et al. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In JF Charles, A Delécluse, C Nielsen-LeRoux (eds), **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 297-314. 2000.

DAME, A. D. et al. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. **Malaria Journal**, London, v. 8, p. 16-23, 2009.

DE BARJAC, H. Characterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: DE BARJAC, H.; SUTHERLAND, D. J. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**. New Jersey: Rutgers University Press, 1990, p. 10-15.

D'IPPOLITO, G.; MEDEIROS, R. B. Exames radiológicos na gestação. **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 447-450, 2005.

DONALD, S. et al. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Waltham, v. 84, p.200-207, 2011.

DONALISIO; M.R. et al. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores da Dengue. **Revista Brasileira Epidemiológica**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DYCK, V. et al. **History of the Sterile Insect Technique**. Sterile Insect Technique. The Netherlands: Springer Netherlands, 2005.

DUTRA, H. L. C. et al. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0003689, 2015.

ENKERLIN, W. Economics of area-wide SIT control programs. In: **Recent trends on sterile insect technique and area-wide integrated pest management: economic feasibility, control projects, farmer organization and *Bactrocera dorsalis* complex control study**. Okinawa: Research Institute for Subtropics, 2003. p. 1–10.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The economic significance of tobacco**. Rome, 1989. 29 p.

FAGOTTO, F, Yolk degradation in tick eggs: In Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Neuchatel, v. 14, p. 217-235. 1990.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EdUSP, 2002. 864 p.

FRANZ, G. Recombination between homologous autosomes in medfly (*Ceratitis capitata*) males: type-1 recombination and the implications for the stability of genetic sexing strains. **Genetica**, Seibersdorf, v.116, p. 73–84. 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil**. Brasília, 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, 1999. Edição especial.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, 2002.

GLASSER, C. M.; GOMES, A. C. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.36, p.166-172, 2002.

GUBLER, D. J.; CLARK G.G, Community-based integrated control of *Aedes aegypti*; a brief overview of current programs, **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oakbrook, v. 50, p. 50-60, 1994.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J. Development of sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. **Human Vaccines**, v.6, n.9, p 696-705, 2010.

HAMADY D, et al. Colonized *Aedes albopictus* and its sexual performance in the wild: implications for SIT technology and containment. **Parasite and Vectors**. Malasya, v. 6, p. 206, 2013.

HAFEZ, M.; SHOUKRY, A. Effect of irradiation on the adult fecundity and longevity of the Mediterranean fruit fly , *Ceratitis capitata* (Wied.) in Egypt (Diptera Tephritidae), **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 72, p. 59-66, 1972.

HELINSKI, M. E. H. et al. Radiation biology of mosquitoes, **Malaria Journal**, London, v. 8, p. 23-39, 2009.

HENDRICHS J.; ROBINSON, A. S. **Sterile insect technique**: principles and practice in area-wide integrated pest management. The Netherlands: Springer, 2005. p. 233-268.

HENDRICHS, J. et al. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only release for control of Mediterranean fruit-flies during fruiting seasons. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 119, p. 371-377, 1995.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. ***Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***: uma ameaça aos trópicos. Produção Aúdio Visual e tratamento de imagem do IOC, FIOCRUZ. Produzido por Genilton José Vieira e Autoração de Leonardo Perím. Rio de Janeiro, 2009. 1 DVD (21 min).

JOSHI, V. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 90, p. 643-644, 1996.

KHIN, M. M.; THAN, K. A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 32, p. 590-594, 1983.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F.; History of the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. The Netherlands: Springer, 2005. p. 3-36.

KOYAMA, J. H. et al. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behaviour, ecology, genetics and evolution. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 331–349, 2004.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 48, p.459–462, 1955.

LANCE, D. R.; MCINNIS, D. O. Biological Basis of the Sterile Insect Technique. In: DYCK V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management**. The Netherlands: Springer, 2005.

LACROIX, R. et al. Open Field Release of Genetically Engineered Sterile Male *Aedes aegypti* in Malaysia. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 120, p. 40-51, 2012.

LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature**, New York, v. 216, p. 383–384. 2007.

LASSY, C.; KARR, T. Cytological and biochemical analysis of male sterility in ms(3)K81. **Annual Drosophila Research Conference**, Bethesda, v. 37, p. 191, 1996.

LIMA, J. B. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 68, p. 329-333, 2003.

LOGULLO, C. J. et al, Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick *Boophilus microplus*, **Parasitology**, London, v.116, p. 525-532, 1998.

MACORIS, M. L. G. et al. Modificação da susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temefos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 24, n. 1, p. 31-40, 1995.

MASTRANGELO, T. A. **Metodologia de produção de moscas estéreis de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Díptera: Calliphoridae) no Brasil**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2011.

MASTRANGELO, T.; WALDER, J.; Use of Radiation and Isotopes in Insects, Radioisotopes. **Applications in Bio-Medical Science**, Yale, v.2, p. 67-92, 2011.

MARDINI, L. B. L. et al. *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, p. 211-214, 2000.

MELVIN, R.; R. C. BUSHLAND. A method of rearing *Cochliomyia hominivorax* on artificial diet, **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 106, p. 1927-1931, 1936.

MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. **Biological Control**, v. 49, p. 186-191, 2009.

MEYER, N.; SIMPSON, O. **History of the Mexico and United States screwworm eradication programme**. New York: Vantage, 1995. v.1, 367p.

MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Boston, v. 91, p. 2395-2400, 1994.

MORLAN, H. B. et al. Field tests with sexually sterile males for control of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, New York, v. 22, p. 295–300, 1962.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MOULD, R. F. **A century of X-rays and radioactivity in medicine**. Philadelphia: Institute of Physics Publishing, 1993. 234 p.

MULLER, H. J. Artificial transmutation of the gene. **Science**, New York, v. 66, p. 84-87, 1927.

NAVARRO, M. V. T. et al, Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. **Histórias, ciências, saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 4, 2008.

NOGUEIRA, R. M. R.; EPPINGHAUS, A. L. F. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 255-256, 2011.

OLIVEIRA, S. L. et al. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. **Revista da Biologia**, Lisboa, v. 6, p. 38-43, 2011.

OLIVA C. F. et al. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. **Acta Tropica**, Basel, v. 132, p. 12-19, 2013.

PAPATHANOS, P. A. et al. Sex separation strategies: past experience and new approaches. **Malaria Journal**, London, v. 8, p. 32-41, 2009.

PHUC, H. K. et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control, **Biomed central biology**, Oxford, v. 5, p.11, 2007.

PUGGIOLI, A. et al. Efficiency of three diets for larval development in mass rearing *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v.50, p. 819–825, 2013

PAL, R.; LACHANCE, L. E. The operational feasibility of genetic methods for control of insects of medical and veterinary importance. **Annual Revision of Entomology**, Palo Alto, v.19, p. 269-291, 1974.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **National Library of Medicine**, Bethesda, v.42, p.844-849, 2005.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S, Accumulation of yolk proteins in insect oocytes, **Annual Review of Entomology**, Michigan, v.37, p. 217-251, 1992.

RAMINANI, L. N.; CUPP E. W. Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). **Internacional Journal of Morphology and Embriology**, New York, v. 4, p. 517-528, 1975.

REGIS L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.17, p. 377-380, 2001.

REGIS, L. N. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, p. 50-59, 2008.

REGIS L. N. et al. Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities. **PLoS ONE**, New York, v. 8, p. 65-72, 2013.

REITER, P. et al. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of American Mosquitoes Control Association**, San Juan, v. 7, p. 52-55, 1991.

REISEN, W. K. et al. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. **Journal of Medical Entomology**, Bakersfield, v. 42, p. 367–375, 2005.

ROBINSON, A. S. Mutations and their use in insect control. **Mutation Research**, Seibersdorf, v. 511, p. 113–132, 2002.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control**: Methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization, 1997.

RUNNER, G. A. Effect of Roentgen rays on the tobacco, or cigarette, beetle, and the results of experiments with a new form of Roentgen tube. **Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 6, n. 2, p. 383-388, 1916.

SCHOFIELD, C. Vector population responses to control intervention. **Annual. Society Belgian of Tropical Medicine**, London, v. 71, p. 201-217, 1991.

SCHLEISSMAN D.J; CALHEIROS L.B. A review of the status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in the Americas. **Mosquitoes News**, New York, v. 34, p.1-9, 1974.

SEGRETO, H. R. C.; SEGRETO, R. A. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. **Folha Médica**, Rio de Janeiro, v. 119, n. 4, p. 9-27, 2000.

SEREBROVSKII, A. S. On the possibility of a new method for the control of insect pests [in Russian]. **Zoologicheskii Zhurnal**, Moscow, v. 19, p. 618–630, 1940.

SINKINS, S. P. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 723–729, 2004.

SHEPARD, D. S. et al. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 84, n. 2, p. 200 – 207, 2011.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de

laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 4, n. 95 p. 349-355, 1999.

SOPER, F. L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 14, p. 887-891, 1965.

TEXEIRA, M. G. et al. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, Brasília, v.8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TRPIS, M. A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology, **Canadian Journal of Zoology**, Montreal, v. 48, p. 892-893, 1970.

UCHIDA, K. et al. Follicular epithelial cell apoptosis of atretic follicles within developing ovaries of the mosquito *Culex pipiens pallens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, p. 903-912, 2004.

VREYSEN, M. J. B. et al. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, p. 123-135, 2000.

ZUG, R., HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PLoS One**, v. 7, p. e38544, 2012.

WALKER, T. et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, p. 450–453, 2011.

WILKE, A. B. B. et al. Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, Malaya, v.17, p. 65-74, 2009.

WHITE SM, ROHANI P, SAIT SM. Modelling pulsed releases for sterile insect techniques: fitness costs of sterile and transgenic males and the effects on mosquito dynamics. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, p. 1329–1339, 2010.

YAMADA, A. G. et al. X-Ray-Induced Sterility in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Male Longevity Following Irradiation, **Journal of Medical Entomology**, Vienna, v. 51, p. 811-816, 2014.

YAMAMOTO, S. Y. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: Role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.106, p. 35–45, 1993.