



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E  
NUCLEARES**

**SLOANA GIESTA LEMOS FLORÊNCIO**

**POTENCIAL DE USO DE MACHOS ESTERILIZADOS POR RADIAÇÃO GAMA  
(<sup>60</sup>CO) PARA O CONTROLE POPULACIONAL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA -  
CULICIDAE): UM CAMINHO BIOTECNOLÓGICO DO LABORATÓRIO PARA  
O CAMPO**

**RECIFE  
2017**

**SLOANA GIESTA LEMOS FLORÊNCIO**

**POTENCIAL DE USO DE MACHOS ESTERILIZADOS POR RADIAÇÃO GAMA  
(<sup>60</sup>CO) PARA O CONTROLE POPULACIONAL DE *Aedes aegypti* (DIPTERA -  
CULICIDAE): UM CAMINHO BIOTECNOLÓGICO DO LABORATÓRIO PARA  
O CAMPO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de  
Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco,  
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Radioecologia

**Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva**  
**Coorientadora: Profa. Dra. Maria Alice Varjal de Melo**  
**Santos**

**RECIFE**

**2017**

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

- F632p Florêncio, Sloana Giesta Lemos.  
Potencial de uso de machos esterilizados por radiação gama ( $^{60}\text{CO}$ ) para o controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera - Culicidae): um caminho biotecnológico do laboratório para o campo / Sloana Giesta Lemos Florêncio. - 2017.  
99 folhas, il., gráfs., tabs.
- Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva.  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2017. Inclui Referências.
1. Energia nuclear. 2. Técnica do inseto estéril. 3. Radiação ionizante. 4. Controle genético. 5. Ilha de Fernando de Noronha. I. Silva, Edvane Borges da. (Orientadora). II. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. (Coorientadora). III. Título.

UFPE

621.48 CDD (22. ed.)

BCTG/2018-01

Potencial de Uso de Machos Esterilizados por Radiação  
Gama ( $^{60}\text{Co}$ ) para o Controle Populacional de *Aedes  
Aegypti* (Diptera – Culicidae): Um Caminho Biotecnológico  
do Laboratório para o Campo

Sloana Giesta Lemos Florêncio

*APROVADA EM: 15.02.2017*

*ORIENTADORA: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva*

*CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos*

*COMISSÃO EXAMINADORA:*

---

**Profa. Dra. Edvane Borges da Silva – CAV/UFPE**

---

**Profa. Dra. Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio – IPEN/CNEN**

---

**Profa. Dra. Cláudia Rohde – CAV/UFPE**

---

**Profa. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes – FIOCRUZ**

---

**Profa. Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha – FIOCRUZ**

---

**Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão – CAV/UFPE**

*Visto e permitida a impressão*

---

*Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE*

*Dedico às minhas orientadoras,  
Edvane e Alice.*

## AGRADECIMENTOS

Gratidão, primeiramente, ao Criador, pela existência, pela proteção e livramentos, pelo Amor Incondicional, por tudo em minha vida. Gratidão a Espiritualidade amiga que sempre me amparou e conduziu na medida da minha limitada consciência, com atenção e amorosidade.

Gratidão á minha orientadora Edvane Borges por ter me apoiado por todos esses anos e embarcado comigo nesse projeto que, com toda certeza, marcou definitivamente nossas vidas. Além de ser uma orientadora arrojada, é um ser de grande sensibilidade e empatia, que insistentemente foi desafiada por minhas grandes limitações. Foi quem amparou meus passos das sombras para a Luz, segurando-me, quase literalmente, para que eu sempre retornasse depois das tempestades que me atingiram. Sua referência vai além da orientação, é um exemplo de dedicação e sacrifícios à família, tanto a sanguínea quanto a científica da qual faço parte. Gratidão sempre!

Gratidão à minha Coorientadora Maria Alice Varjal de Melo Santos por ter compartilhado comigo sua grandiosidade como pesquisadora, por meio de uma convivência rica em ensinamentos, disciplina e resolutividade. Sua força, sabedoria, generosidade, e resiliência são uma inspiração. Gratidão por tudo!

Gratidão ao André Luiz, do Laboratório de Proteção Radiológica/UFPE, por tanta consideração e engajamento com o projeto, e ao Carlos Mendonça, que executou de forma muito profissional um trabalho laborioso e muitas vezes exaustivo sendo sua participação de grande relevância para a realização desse projeto.

Gratidão à Clara Sidônia, o suporte logístico fundamental para interligar tantas ações, em sua pessoa sempre solícita, e disposta a ajudar, encontrei uma grande amiga e testemunha diária de minhas idas e vindas.

À toda a equipe técnica do Insetário do Departamento de Entomologia/Instituto Aggeu Magalhães, Elisângela Dias, Rose Barros, assim como do Laboratório de Entomologia, Andréa Neves, concentrando meus agradecimentos nas pessoas da Dra. Cláudia Fontes e Dra. Mônica Crespo, que com muito acolhimento e generosidade me receberam no departamento.

À Dra. Rosângela pelo suporte com os Testes em Condições Simuladas de campo.

À Dra. Ana Paula Araújo, pelo acompanhamento nos experimentos relacionados as análises bioquímicas, muito obrigada pela colaboração e discussão dos resultados.

Aos amigos queridos Morgana Xavier, Diego Diniz, Emanuel Holanda, Amanda Cabral, Marina Rodrigues e Conceição da Silva, incentivadores e grandes colaboradores do meu trabalho.

Aos funcionários do Instituto Aggeu Magalhães: Márcia Saturnino, Bete, Igor, Eliane, Jane e principalmente a equipe do transporte, em especial aos Senhores Marcos, Sérgio e Chirleno, que me conduziram diariamente com muita boa vontade e consideração, sempre muito amigos e companheiros.

À Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. I Gerência Regional de Saúde. Distrito de Fernando de Noronha: Dra. Fátima Souza, Yeda Araújo, Dr. Fernando Magalhães, Sandra Cadengue, Eduardo Guelfer, Carlos Diógenes, e sua atual administração Dr. Eduardo Luiz, Rebeca Dias, assim como a todos os agentes de endemias que participaram do projeto.

À Dra. Lêda Regis pelo legado científico que nos proporcionou o arcabouço para iniciarmos a execução deste estudo.

Aos membros das bancas, Dra. Ana Melo, Dra. Constância Ayres, Dr. Emerson Peter que, com valiosas observações e sugestões, colaboraram para o amadurecimento deste trabalho.

À atual banca examinadora da tese.

Às minhas amigas Laury Francis, Ana Carolina Siedschlag, Flávia Cavalcante, Andressa Costa e Zezé, eu precisava dessas flores para me lembrar da beleza da vida e da força avassaladora que as mulheres possuem, cada uma de vocês é um exemplo de força, trabalho e amor. Amo vocês minhas irmãs.

À minha família. Em especial à minha madrinha Lia, que representa junto com meu filho, Davi, o amor mais profundo que há em minha vida. À minha mãe Ana, ao meu marido, Natércio Brito, e aos avós do Davi, Antônio e Vilanir Pereira, que se esforçaram enormemente me ajudando a concluir este trabalho.

Ao Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE, pela infraestrutura que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que proporcionou minha participação neste projeto.

Ao Ministério da Saúde/CNPq/FACEPE/SES e ao Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS – REDE 3ª Rodada, APQ nº 0345-2.13/13 que juntos fomentaram o projeto que viabilizou a realização desta tese.

*O senhor mire, veja: o mais importante e bonito do mundo é isto – que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam, verdade maior. É o que a vida me ensinou.*

**Guimarães Rosa**

## RESUMO

*Aedes aegypti* tem assumido um papel relevante na expansão das áreas de transmissão de arboviroses como dengue, chikungunya e zika, especialmente nos países tropicais. A principal forma de controle destas doenças continua sendo a redução populacional dos mosquitos vetores, cujas estratégias de eliminação estão geralmente associadas ao uso de inseticidas químicos. Estudos realizados nos últimos anos demonstraram que populações de *A. aegypti*, inclusive do Brasil, estão resistentes a diversos compostos inseticidas. Assim, a avaliação de abordagens alternativas mais efetivas, seletivas e ambientalmente seguras é um componente necessário aos programas de controle. O presente estudo avaliou o uso da técnica do inseto estéril (TIE), em que os mosquitos machos de *A. aegypti* foram expostos à radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  em sua fase de pupa, antes de serem liberados na Ilha de Fernando de Noronha/PE, Brasil. Uma subpopulação da própria Ilha, vila da Praia da Conceição (*Aedes*-VPC) foi estabelecida e utilizada para a produção massal dos machos estéreis. Duas densidades para a criação de larvas foram testadas, 400 - 600 larvas/cuba e 601 - 1000 larvas/cuba, porém, não foram encontradas diferenças significativas no peso das pupas e tamanho dos adultos. A maior densidade passou a ser adotada na produção massal, embora apenas 63% das larvas atingissem a fase de pupa em até 12 dias após a eclosão. Ensaio em condições simuladas de campo avaliaram o desempenho dos machos VPC, irradiados com doses de 40 e 50 Gy, e confirmaram sua maior competitividade para o acasalamento na proporção de 10 machos estéreis (ME) para cada macho selvagem (MS), levando a inviabilidade de 80% dos ovos produzidos. Utilizando a proporção de 10ME:1MS foi iniciado, em dez/2015, o teste piloto na VPC, uma das 15 vilas da Ilha de Fernando Noronha. Nesta área de 2 ha e 23 imóveis foram estabelecidos quatro pontos peridomiciais de soltura. Com base nos indicadores entomológicos estimados pela presença e quantidade de ovos do mosquito em armadilhas, ovitrampas sentinelas (Ovt-S), de 2015, foi estimada uma quantidade inicial de 3.000 ME/semana para a VPC. Até dezembro de 2016 foram realizadas 51 solturas, semanais, liberando aproximadamente 234.000 ME. Nas primeiras 18 solturas os ME foram esterilizados com 40 Gy e nas demais com 50 Gy. A partir do número médio de ovos/Ovt-S/mês (NMO), da porcentagem de ovos inviáveis (POI) detectados na VPC<sub>TIE</sub> comparando 2015 e 2016 e da porcentagem de inviabilidade induzida de ovos na VPC<sub>TIE</sub>, comparada a área controle, vila do Trinta, observou-se uma diminuição da infestação por *A. aegypti* na área de liberação dos ME na ordem de 46%. No entanto, o POI variou grandemente (10,3% a 83,7%) e só quando a inviabilidade dos ovos foi  $\geq 40\%$  também foram registradas reduções significativas nos valores de NMO, ao longo dos 13 meses de uso da TIE. Tais oscilações pareceram estar relacionadas a rápida recomposição da população, fêmeas e machos selvagens na VPC, sobretudo em função da eclosão de larvas oriundas de ovos quiescentes, após os períodos de chuvas. Outros fatores relacionados a logística de liberação como, a intermitência entre as solturas dos ME em campo e o número ainda insuficiente de ME/soltura, também podem ter contribuído para a insustentabilidade de níveis elevados de inviabilidade de ovos e supressão populacional do mosquito. Os resultados, no entanto, confirmam a eficiência da TIE para o controle de *A. aegypti* na Ilha de Fernando de Noronha e sua viabilidade para uso, de forma integrada, no Programa nacional de controle das arboviroses.

Palavras-chave: Técnica do Inseto Estéril. Radiação ionizante. Controle genético. Ilha de Fernando de Noronha.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* has been playing an important role in the expansion of arbovirus transmission areas such as dengue, chikungunya and zika, especially in tropical countries. A major form of control of these diseases is the population reduction of mosquitoes vectors whose elimination strategies are generally associated with the use of chemical insecticides. Studies carried out in recent years have shown that populations of *A. aegypti*, including the Brazilian ones, are resistant to various insecticidal compounds. Therefore, an evaluation of more effective, selective and environmentally safe alternative approaches is a necessary component of the control programs. The present study has evaluated the use of the sterile insect technique (SIT), in which *A. aegypti* male mosquitoes have been exposed to gamma radiation ( $^{60}\text{Co}$ ) in their pupa phase before being released on the Fernando de Noronha Island, Brazil. A subpopulation from the Island, the Village of Praia da Conceição (Aedes-VPC) was created and used for mass production of the sterile males. Two densities for a larval rearing were tested, 400-600 larvae/tank and 601-1000 larvae/tank, however, no significant differences were found in pupae weight and adult size. The highest density was adopted for mass production, although only 63% of the larvae reached the pupal stage up to 12 days after hatching. Assays under simulated field conditions assessed the performance of VPC males irradiated with doses of 40 Gy and 50 Gy, and confirmed their greater competitiveness for mating in the proportion of 10 sterile males (SM) for each wild male (WM), leading to a non-viability of 80% of the eggs produced. Using the 10 SM: 1 WM ratio, the pilot test at VPC, one of the 15 villages on the Island of Fernando Noronha, was started in December 2015. Four peridomic points of release were established in this area of 2 ha and 23 buildings. Based on the entomological indicators estimated by the presence and quantity of mosquito eggs in traps, sentinel ovitraps (Ovt-S), from 2015, an initial amount of 3,000 SM/week was estimated for VPC. As of December 2016, 51 releases were made weekly, releasing approximately 234,000 SM. On the first 18 releases, the SMs were sterilized with 40 Gy and on the others releases, with 50 Gy. From the Mean Number of Eggs/Ovt-S/Month (MNE), the Percentage of Unviable Eggs (PUE) detected in VPC<sub>SIT</sub> comparing 2015 and 2016 and from the percentage of egg-induced non-viability in VPC<sub>SIT</sub>, compared to control area, Vila do Trinta, a decrease in *A. aegypti* infestation in the area of the SM release was observed on the order of 46%. However, the PUE varied greatly (10.3% to 83.7%) and only when egg infeasibility was  $\geq 40\%$ , significant reductions in NME values were observed during the 13 months of SIT use. These oscillations appeared to be related to the rapid recomposition of the population, females and wild males in the VPC, mainly due to the hatching of larvae from quiescent eggs after rainy periods.

Other factors related to logistic of release, such as the intermittence between SM releases in the field and the yet insufficient number of SM / release, may also have contributed to the unsustainability of high levels of egg infeasibility and mosquito suppression. The results, however, confirm the efficiency of the SIT for controlling *A. aegypti* on the Island of Fernando de Noronha and its feasibility to be used, in an integrated way, in the national Program of arbovirolosis control.

Keywords: Sterile insect technique (SIT). Ionizing radiation. Genetic control. Fernando de Noronha Island.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Adultos de <i>Aedes aegypti</i> , em destaque o dimorfismo sexual evidenciado pela antena plumosa do macho e pilosa da fêmea.....	21
Figura 2 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> com os quatro estágios de desenvolvimento do mosquito: (A) Ovo; (B) Larva; (C) Pupa; (D) Inseto adulto.....	23
Figura 3 - Esquema de transmissão do vírus dengue pelo <i>Aedes aegypti</i> .....	26
Figura 4 - Distribuição global prevista de <i>Aedes aegypti</i> , indicando a probabilidade de ocorrência de arboviroses associadas a este vetor (vermelho, indica probabilidade de 100%; azul, probabilidade de 0) .....	27
Figura 5 - Ilustração de resíduos sólidos presentes em áreas peridomiciliares de Fernando de Noronha/PE.....	34
Figura 6 - Ação da <i>Wolbachia</i> em mosquitos.....	36
Figura 7 - Mecanismos de ação da radiação ionizante e seu efeito no DNA da célula: A) direto; B) indireto.....	48
Figura 8 - Esquema da distribuição das vilas na Ilha de Fernando de Noronha/PE.....	52
Figura 9 - Mapa da distribuição de imóveis (formas quadradas e retangulares em vermelho e alaranjado) da Vila da Praia da Conceição e da Vila do Trinta, unidades territoriais da Ilha Fernando de Noronha, distrito do estado de Pernambuco.....	53
Figura 10 - Processos de criação massiva, triagem e sexagem de larvas e pupas da subpopulação de campo de <i>Aedes aegypti</i> proveniente da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE. A) Cubas de criação de larvas; B) Separador de pupas de mosquitos, aparelho composto por placas de vidro superpostas e um sistema de prensas para ajuste da distância entre elas; C) Padrão de separação das pupas por tamanho em diferentes faixas, sendo a 1ª de fêmeas/maiores, a 2ª de machos e fêmeas menores e a 3ª de larvas.....	59
Figura 11 - Processo de irradiação de <i>Aedes aegypti</i> proveniente da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE. A) Pupas acondicionadas em placa de Petri de polietileno para exposição à radiação gama de <sup>60</sup> Co; B) Irradiador do tipo Gammacell <sup>60</sup> Co, modelo 220 Excel-MDS Nordion, onde as amostras foram irradiadas; C) Transporte de mosquitos irradiados para a soltura na Praia da Conceição/ Fernando de Noronha. Foram colocados em recipientes plásticos e mantidos em bolsa térmica (D).....	60
Figura 12 - Instalações e instrumentos utilizados nos Testes sob Condições Simuladas no Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE; (A) gaiola em madeira e tela (2 x 2 metros); (B) ovitrampas usadas para a coleta de ovos de <i>A. aegypti</i> ; (C) aspirador manual para recaptura dos mosquitos adultos.....	62

Figura 13 - Proporção de pupas-machos e pupas-fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> da subpopulação de campo da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE, observada em diferentes densidades larvais, em laboratório.....	67
Figura 14 - Distribuição espaço-temporal da infestação por <i>Aedes aegypti</i> na Ilha de Fernando de Noronha, estimada pela coleta de ovos do mosquito por 103 armadilhas, em 2015 e 2016.....	70
Figura 15 - Índices pluviométricos observados na Ilha de Fernando de Noronha/PE em 2015 e 2016.....	71
Figura 16 - Índice de Positividade de Ovitrapas nos períodos de 2015 e 2016 nas vilas da Praia da Conceição e do Trinta, Fernando de Noronha/PE.....	74
Figura 17 - Densidade de ovos de <i>Aedes aegypti</i> observada nos anos de 2015 e 2016, nas vilas da Praia da Conceição e do Trinta, Fernando de Noronha/PE.....	75
Figura 18 - Flutuação da densidade populacional de <i>Aedes aegypti</i> nas vilas da Praia da Conceição e do Trinta, Ilha de Fernando de Noronha, estimada pela coleta de ovos do mosquito por 25 ovitrapas-sentinelas, em 2015 e 2016.....	76
Figura 19 - Porcentagem de ovos de <i>Aedes aegypti</i> inviáveis coletados nas vilas da Praia da Conceição (Conceição) e do Trinta, Ilha de Fernando de Noronha/PE, ao longo de 52 solturas de machos estéreis, no período de dezembro/2015 a dezembro/2016.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos confirmados de Dengue, Zika e Chikungunya, em Fernando de Noronha, entre janeiro de 2015 e dezembro de 2016.....	32
Tabela 2 - Breve histórico da utilização da Técnica do Inseto Estéril (TIE) para controle de espécies de culicídeos, no período de 1962 a 2012.....	45
Tabela 3 - Toxicidade de diferentes inseticidas da classe dos piretroides para fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> provenientes da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE e da linhagem Rockefeller, estimada pelo Tempo letal para 95% (TL <sub>95</sub> ) dos indivíduos expostos às doses diagnósticas dos diferentes inseticidas.....	65
Tabela 4 - Atividade das Glutathione S-Transferases (GSTs) em indivíduos da população de <i>Aedes aegypti</i> da Praia da Conceição, Fernando de Noronha/PE, em sua terceira geração filial (F <sub>3</sub> ), expostos ou não à radiação gama.....	66
Tabela 5 - Experimentos de competitividade entre machos de <i>Aedes aegypti</i> da população de campo da Vila da Praia de Conceição/Fernando de Noronha/PE, estéreis (ME) e selvagens (MS), para o acasalamento com fêmeas em condições simuladas de campo.....	69
Tabela 6 - Número total e número médio de ovos de <i>Aedes aegypti</i> por ovitrampa sentinela (Ovt-S) coletados nos anos de 2014, 2015 e 2016 nas vilas da Praia da Conceição (VPC) e Trinta, Fernando de Noronha-PE.....	77
Tabela 7 - Número total de ovos de <i>Aedes aegypti</i> , número médio de ovos/ovitrampa/mês, numero de solturas, quantidade de machos estéreis liberados/mês, inviabilidade induzida de ovos pela Técnica do Inseto Esteril (TIE) e reducao comparativa da densidade de ovos entre a Vila da Praia da Conceição/ VPC (area TIE) e a do Trinta (controle), Fernando de Noronha-PE, em 2016.....	79

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

**Aedes-VPC** - *Aedes aegypti* da vila da Praia da Conceição

**APA** - Área de Proteção Ambiental

**AW-IPM** - *Area-wide Integrated Pest Management* – Área de Campo de Controle Integrado de Pestes

**Bti** - *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis*

<sup>60</sup>**Co** – Cobalto 60

**CPqAM** - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

**DDT** - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

**DENV-1, 2, 3 e 4** - Vírus Dengue sorotipo 1, 2, 3 e 4

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**FHD** - Febre Hemorrágica da Dengue

**FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz

**FN** – Fernando de Noronha

**FS** - fêmeas selvagens

**FUNASA** - Fundação Nacional de Saúde

**GST** - Glutathione-S-transferase

**Gy** - Gray

**INMET** - Instituto Nacional de Meteorologia

**ICMBio** - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

**IPO** - Índice de Positividade de Ovitrapas

**L1, L2, L3, L4** – Larvas dos 1º, 2º, 3º e 4º estádios

**ME** - Machos estéreis

**MI** – Machos irradiados

**MNI** - Machos não irradiados

**MS** - Ministério da Saúde

**NMO** – Número Médio de Ovos

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OPAS** – Organização Panamericana de Saúde

**OVT-S** - Ovitrapa Sentinela

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

**PI** - Piretróide

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

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

**RecL** - Recife-Laboratório

**RIDL** - *Release of Insect carrying a Dominant Lethal gene* – Liberação de Insetos Carreando um Gene Letal Dominante

**SIT** - *Sterile Insect Technique* – Técnica do Inseto Estéril

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**TCS** - Teste de Campo Simulado

**TIE** - Técnica do Inseto Estéril

**TL** - Tempo Letal

**WHO** - World Health Organization

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
2.1	CARACTERÍSTICAS DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> , Linnaeus, 1762.....	21
2.1.1	<b>Bioecologia</b> .....	21
2.1.2	<b>Importância epidemiológica na transmissão de arbovírus</b> .....	24
2.1.3	<b>Controle no Brasil</b> .....	28
2.1.3.1	Controle em Fernando de Noronha.....	31
2.2	NOVAS ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i> ...	35
2.2.1	<i>Wolbachia pipientis</i> .....	35
2.2.2	<b>Mosquito Transgênico</b> .....	39
2.2.3	<b>Técnica do Inseto Estéril (TIE)</b> .....	40
2.2.3.1	TIE aplicada aos culicídeos.....	43
2.3	EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM MOSQUITOS.....	47
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	51
3.2	ESTABELECIMENTO DA SUBPOPULAÇÃO DE <i>Aedes aegypti</i> DA VILA DA PRAIA DA CONCEIÇÃO.....	54
3.2.1	<b>Avaliação da susceptibilidade da subpopulação <i>Aedes</i>-VPC aos piretroides</b> .....	55
3.2.2	<b>Ensaio da atividade das Glutathione S-Transferases</b> .....	57
3.2.3	<b>Produção de <i>Aedes aegypti</i> em pequena escala</b> .....	58
3.2.4	<b>Irradiação de <i>Aedes</i>-VPC utilizando radiação gama <sup>60</sup>Co</b> .....	58
3.2.5	<b>Teste em condições Simuladas de Campo (TCS) para avaliar o desempenho dos machos <i>Aedes</i>-VPC irradiados</b> .....	60
3.3	TESTE PILOTO DE CAMPO: NÍVEL DE INFESTAÇÃO POR <i>Aedes aegypti</i> EM FERNANDO DE NORONHA.....	61
3.3.1	<b>Teste Piloto: liberação de machos estéreis em campo real (VPC)</b> .....	63
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
4	<b>RESULTADOS</b> .....	65

4.1	SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Aedes</i> -VPC AOS INSETICIDAS PIRETRÓIDES.....	65
4.2	ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM <i>Aedes</i> -VPC.....	65
4.3	PRODUÇÃO MASSAL DE MOSQUITOS DA VILA DA PRAIA DA CONCEIÇÃO (VPC).....	66
4.4	COMPETITIVIDADE DE ACASALAMENTO <i>Aedes</i> -VPC: ESTÉREIS X SELVAGENS.....	68
4.5	DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE <i>Aedes aegypti</i> EM FERNANDO DE NORONHA.....	69
4.6	IMPACTO DA LIBERAÇÃO DOS MACHOS ESTÉREIS <i>Aedes</i> -VPC SOBRE A DENSIDADE DE POPULACIONAL DE <i>A. aegypti</i> NA VILA DA PRAIA DA CONCEIÇÃO.....	72
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	85
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

A epidemiologia de arboviroses como dengue, zika e chikungunya é influenciada por diversos fatores, entre eles os que são inerentes aos vírus, às espécies de mosquitos implicadas na transmissão e às populações humanas expostas, bem como seus processos de ocupação dos espaços urbanos (MONATH; HEINZ, 1996). *Aedes aegypti* é considerada uma das espécies de mosquito de maior importância epidemiológica por estar envolvido com os ciclos de transmissão destas e de outros arboviroses, como da febre amarela urbana.

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2016), vivenciamos até o final de 2016 um estado de emergência internacional em Saúde Pública. Em 2015, o Brasil sofreu o seu primeiro surto conjunto de dengue, chikungunya e zika. Nesse mesmo ano, foram registrados mais de 1,5 milhão de casos prováveis de dengue no país, 20.662 casos de chikungunya em 12 unidades da Federação e os primeiros casos, confirmados laboratorialmente, de transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika, a partir de abril de 2015, em 18 estados (BRASIL, 2015; 2016; ZANLUCA et al., 2015).

Desde 1996 existe no Brasil um Programa estruturado para o controle populacional de *A. aegypti* baseado em ações para a eliminação mecânica de criadouros do mosquito ou o tratamento daqueles de caráter permanente, como caixas d'água, tonéis e cisternas, com inseticidas químicos, como: o larvicida organofosforado temephos e reguladores de crescimento de insetos como os inibidores da síntese de quitina, diflubenzuron e novaluron e análogos do hormônio juvenil como o pyriproxyfen (BRASIL, 2002). Adulticidas da classe dos piretróides e organofosforados também vem sendo utilizados (BRASIL, 2002). No entanto, o programa não tem alcançado a eficiência esperada para evitar a expansão territorial do mosquito, bem como situações epidêmicas de dengue e mais recentemente de chikungunya e zika (BRASIL, 2016). Entre os fatores que contribuem para tal situação dois se destacam, a permanência de microcriadouros produtivos nas áreas tratadas e a resistência das populações de campo do mosquito a muitos dos inseticidas químicos empregados para seu controle (MONTELLA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2013). Tendo isso em vista, outras metodologias de controle vetorial passaram a ser avaliadas (ARAÚJO et al., 2015), entre elas, o uso de armadilhas para coleta massiva e eliminação de ovos do mosquito (REGIS et al., 2013), mosquitos transgênicos portadores de genes letais (CARVALHO, 2012; CARVALHO et al., 2014) e mosquitos estéreis (LIMA, 2015), que não produzem

descendentes viáveis, todas voltadas a eliminação do mosquito em sua fase inicial de desenvolvimento.

A utilização de mosquitos estéreis empregada atualmente está baseada na técnica desenvolvida na década de 1950 (KNIPLING, 1955), a qual propõe a liberação de machos estéreis irradiados para reduzir a densidade populacional, que foi denominada Técnica do Inseto Estéril (TIE, ou SIT, sigla em inglês para *Sterile Insect Technique*) (KLASSEN; CURTIS, 2005).

A TIE é considerada um método espécie-específico, e tem sido usada com sucesso para o controle de pragas agrícolas (MALAVASI, 2000). Baseia-se na esterilização de machos, geralmente por radiação ionizante, que na dose adequada, induz mutações nos espermatozoides, provocando esterilização, visando reduzir o potencial reprodutivo dos machos e a diminuição populacional nas gerações subsequentes (ALPHEY, 2014).

Diversos estudos têm comprovado o potencial da TIE para uso efetivo em programas integrados de manejo de espécies de mosquitos, entre elas *A. aegypti* (Tabela 2). Estudos de laboratório e campo para o controle de mosquitos baseado nesta tecnologia foram retomado depois dos anos 2000, com testes-piloto bem-sucedidos na Itália e nas Ilhas Cayman (HARRIS et al., 2012; BELLINI et al., 2013). No Brasil, a TIE para o controle do *A. aegypti* baseada em tecnologias nucleares está em fase experimental, em estudos desenvolvidos em colaborações entre instituições de ensino e pesquisa como a UFPE/FIOCRUZ/PE e USP-IPEN/CRCN.

Com base no exposto, o presente estudo, resultado da Cooperação FIOCRUZ/PE-UFPE, em parceria com a Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (Distrito de Fernando de Noronha), teve por objetivo geral avaliar o potencial de uso da TIE para o controle de *A. aegypti*, com vista a gerar informações relevantes para a difusão da técnica em larga escala, utilizando a radiação ionizante de  $^{60}\text{Co}$  como método para a esterilização de machos de *A. aegypti*, e contribuir para a implementação de novas estratégias para o controle integrado desse vetor, no Brasil.

Os objetivos específicos do estudo descritos abaixo foram desenvolvidos em três etapas:

**Etapa I – Fase de Laboratório:** estabelecimento de uma subpopulação de *A. aegypti* de campo, para avaliação do desempenho biológico de indivíduos produzidos em massa e submetidos à esterilização para uso no programa TIE em FN.

**Etapa II – Teste de Campo Simulado (TCS):** avaliar a competitividade de acasalamento dos machos estéreis com relação aos machos selvagens, em experimentos em condições ambientais similares às encontradas em campo real.

**Etapa III - Liberação dos Mosquitos Estéreis em Campo:** avaliar a viabilidade da TIE em condições reais de campo, em teste piloto, através de indicadores entomológicos e de genética de populações, antes e ao longo da liberação dos machos estéreis.

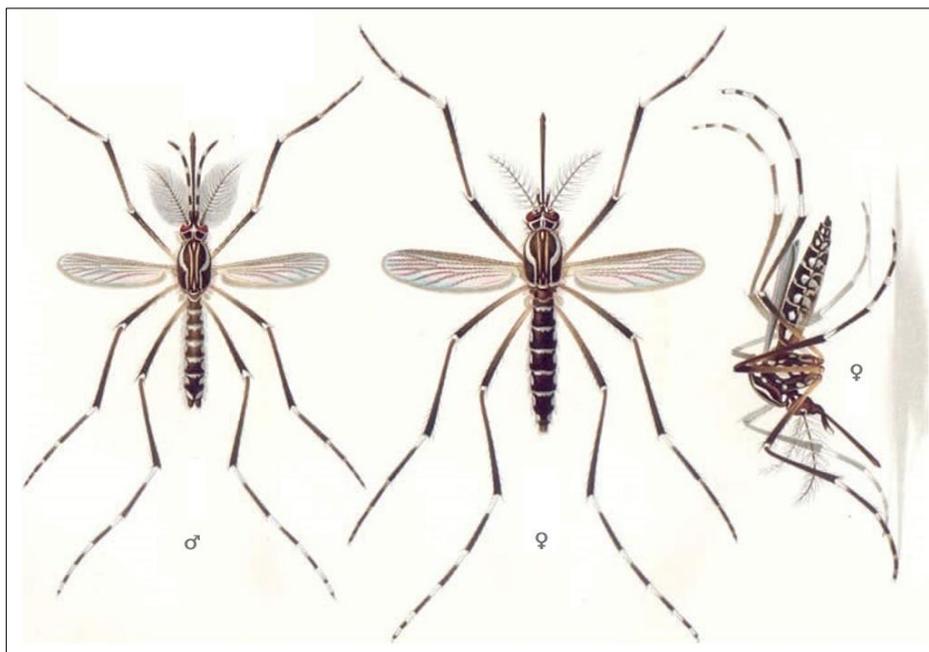
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

#### 2.1.1 Bioecologia

*Aedes aegypti* é um inseto que taxonomicamente pertence ao filo Arthropoda, o qual se caracteriza pela presença de patas articuladas; classe Insecta, apresentando o corpo segmentado em três tagmas, possui três pares de patas (Figura 1); ordem Diptera, cujo par anterior de asas é funcional e o posterior é uma estrutura adaptada em forma de halteres, que confere estabilidade ao voo; família Culicidae e gênero *Aedes* (FORATTINI, 1962).

**Figura 1 - Adultos de *Aedes aegypti*: dimorfismo sexual evidenciado pela antena plumosa do macho e pilosa da fêmea.**



Fonte: Adaptado de GOELDI (1905).

Morfologicamente o mosquito adulto apresenta coloração marrom-escura com listras brancas no corpo e nas patas, e mede cerca de seis centímetros de comprimento. No mesonoto possui listras brancas que forma um desenho de uma lira, sendo que tal característica o distingue de outras espécies do mesmo gênero, como exemplo do *Aedes albopictus* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994).

A espécie *A. aegypti* é originário da África subsaariana, e acredita-se que sua chegada às Américas esteja associada aos navios que traficavam escravos, na época da colonização. Este culicídeo, ainda no continente africano, se adaptou ao ambiente criado pelo homem, tornando uma espécie extremamente antropofílica. Suas fêmeas necessitam se alimentar do sangue de vertebrados (hematofagia), tendo preferência pelo sangue humano, para que haja a maturação dos ovos (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994, JANSEN; BEEBE, 2010).

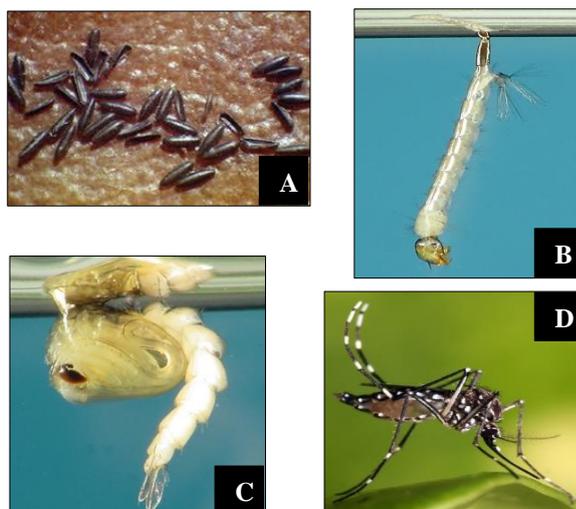
De forma geral, é uma espécie sinantrópica de fácil adaptabilidade, que encontrou no mundo moderno condições favoráveis para uma rápida expansão, em função da urbanização acelerada e desordenada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana, e intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro (TAUIL, 2001; BRASIL, 2002; FORATTINI, 2002), que no ambiente podem atuar como potenciais criadouros para essa espécie.

Além desses fatores que propiciam a proliferação do *A. aegypti*, mudanças climáticas e ambientais globais também influenciam na dinâmica da transmissão de doenças transmitidas por esse vetor. O aumento da longevidade e a redução dos intervalos do repasto sanguíneo para *A. aegypti* podem ser detectados em ambientes de elevadas temperaturas e de baixa umidade. Portanto, o aquecimento global poderá expandir as áreas de dispersão desta espécie (BARCELLOS et al., 2009; MESSINA et al., 2016). Contudo, Barcellos et al. (2009), ressaltam que a associação entre doenças infecciosas transmitidas por vetores e mudanças climáticas globais, não devem ser analisadas independente da precarização do sistema de governo, no que diz respeito a promoção da saúde para a população, assim como do contexto de globalização.

O ciclo de vida de *A. aegypti* é holometabólico, ou seja, apresenta metamorfose completa e está dividido em quatro fases: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 2). As fases jovens são aquáticas, enquanto a adulta é terrestre.

Os ovos podem permanecer viáveis no ambiente por até 450 dias, aguardando condições ideais para o desenvolvimento embrionário, característica conhecida como quiescência (SOTA; MOGI, 1992; SILVA; SILVA, 1999). Os ovos possuem um formato elíptico e medem cerca de um milímetro de comprimento, e apresentam coloração escura, no entanto no momento da postura são brancos, e após algumas horas adquirem a coloração escura (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

**Figura 2 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* com os quatro estágios de desenvolvimento: (A) Ovo; (B) Larva; (C) Pupa; (D) Inseto adulto.**



Fonte: <http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mosquitphotos.htm>

Com o aumento da umidade e da disponibilidade de água nos criadouros as larvas eclodem e passam por quatro estádios de desenvolvimento (L1 a L4), por aproximadamente oito dias, dependendo da oferta de alimento, densidade no criadouro e condições de temperatura e fotoperíodo. As larvas são filtradoras e se alimentam de partículas em suspensão, bactérias, fungos e outros microorganismos, importantes para a reserva energética necessária às fases seguintes do desenvolvimento (BESERRA, et al., 2009; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

As larvas se desenvolvem, preferencialmente, em recipientes que têm o potencial de acumular água com baixa concentração de matéria orgânica. Concluído o quarto estágio de desenvolvimento, elas passam para a fase pupa, quando ocorre a metamorfose do mosquito, havendo uma reestruturação da morfologia do inseto para o desenvolvimento do adulto. Ainda que a pupa não se alimente, ela apresenta grande motilidade, deslocando-se na coluna d'água com facilidade, devido à fotossensibilidade ou a detecção de movimentação na água. Esta fase, assim como as outras, é dependente da temperatura, e tem duração de dois a três dias, após os quais ocorre a mudança para a forma adulta ou alada da espécie (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Quando na fase adulta, fase reprodutiva da espécie, tanto o macho quanto a fêmea se alimentam de substâncias que contêm carboidratos (néctar, seiva, entre outros), porém apenas as fêmeas são hematófagas, visto que o repasto sanguíneo é necessário para o

desenvolvimento dos ovos (FORATINNI, 2002). Geralmente, uma fêmea de *A. aegypti*, realiza cinco ciclos de oviposição, sendo que, em cada ciclo, libera cerca de 50 a 70 ovos, colocando em média 250 a 350 ovos durante todo o seu ciclo de vida (CLEMETS, 1992; CHRISTOPHE, 1960), distribuídos em pequenos grupos, em diferentes criadouros. Esse comportamento de oviposição em salto aumenta as chances de sobrevivência dos seus descendentes, potencializando sua capacidade dispersiva e o seu sucesso reprodutivo (BENTLEY; DAY 1989).

Nas 24h após a emergência do macho, ocorre o giro da genitália em 180° graus, que o deixa preparado para a cópula. Esse período também é necessário para produção da quantidade suficiente de esperma, completando o ciclo de desenvolvimento sexual. Por outro lado, a fêmea emerge pronta para realizar o acasalamento e após a cópula ela armazena quantidade suficiente de espermatozoides nas espermatecas que podem ser utilizados por todo o seu período reprodutivo (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). O acasalamento poderá ocorrer durante o voo ou também em superfícies horizontais ou verticais. Frequentemente, as fêmeas realizam o repasto sanguíneo após a cópula, com o intuito de completar a maturação dos seus ovos (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

### **2.1.2 Importância epidemiológica na transmissão de arbovirose**

O mosquito *A. aegypti* é considerado um vetor eficiente de arbovírus por diferentes razões: é susceptível aos vírus da febre amarela urbana (COSTA et al., 2011), dengue (BRASIL, 2016), zika (PINTO-JUNIOR et al., 2015; FANTINATO et al., 2016) e chikungunya (BRASIL, 2015); suas fêmeas se alimentam preferencialmente de sangue humano, o que favorece a transmissão de patógenos; e, procriam próximo a habitações humanas. Por apresentarem um hábito antropofílico, as fêmeas desenvolveram a capacidade de reagir rapidamente a reação do hospedeiro, uma vez que pequenos movimentos as fazem partir para outra fonte de alimento, tornando-as capazes de se alimentar por curtos períodos em diferentes fontes (GIBBONS; VAUGHN, 2002; CAMPANELLI, 2007). Associado a isso, a alta capacidade reprodutiva da espécie dificulta as ações de controle de *A. aegypti* e contribui para a manutenção da circulação de patógenos. Diante deste cenário, a redução populacional de *A. aegypti* torna-se necessária para garantir a redução do contato do

patógeno com o homem e conseqüentemente, o controle das diferentes arboviroses veiculadas por este mosquito (OLIVEIRA et al., 2011).

A capacidade do vetor se infectar por um agente patogênico, permitir a sua multiplicação/diferenciação para forma infectiva e transmiti-lo a outro hospedeiro é denominada de competência vetorial. Esta característica é determinada geneticamente, mas pode ser influenciada por fatores bióticos tais como a competição interespecífica na fase larval do inseto, que pode afetar características do inseto adulto, como seu desempenho biológico. Globalmente, as populações de *A. aegypti* mostram variações na competência vetorial aos vírus da dengue e chikungunya (COX; BROWN; RICO-HESSE, 2011; LAMBRECHTS et al., 2011; MERCADO-CURIEL, BLACK; MUNOZ, 2008; BENNETT et al., 2002).

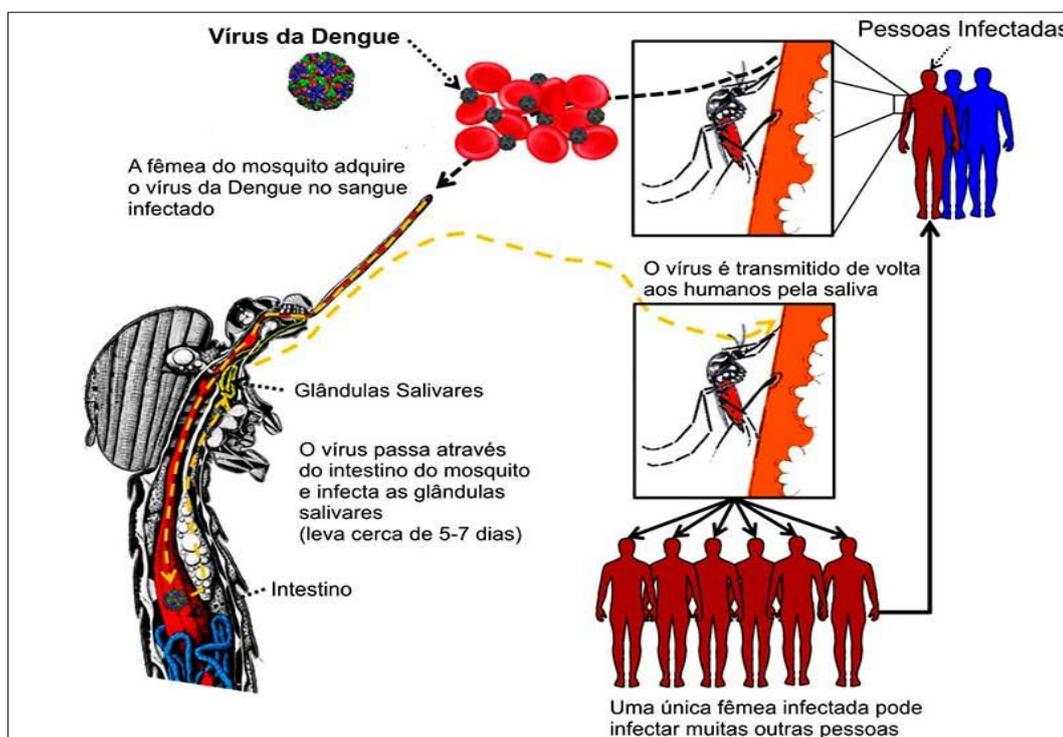
A competência vetorial está associada a certos obstáculos à infecção no mosquito, que incluem a barreira de infecção do intestino (*Midgut Infection Barrier*, MIB), barreira de escape do intestino (*Midgut Escape Barrier*, MEB), e a barreira de infecção da glândula salivar (*Salivary Gland Infection Barrier*, SGIB). Em insetos com MIB, o vírus não pode replicar nas células do intestino, enquanto que aqueles com MEB podem permitir a replicação do vírus no intestino, mesmo em concentrações elevadas, mas o vírus não é capaz de sair desse tecido e causar uma infecção disseminada. A barreira da glândula salivar é a última e impede a replicação do vírus neste tecido, mesmo quando este se encontra disseminado no corpo do mosquito (BLACK et al., 2002; BOSIO, BEATY, BLACK, 1998; COX, BROWN; RICO-HESSE, 2011).

Convém ressaltar que, uma barreira de escape das glândulas salivares (*Salivary Glands Escape Barrier*, SGEB) para *Aedes brelandi* e *Aedes hendersoni* infectados com o vírus La Crosse, já foi avaliada. Nesse caso, embora o vírus se encontre nas glândulas salivares, ele não é liberado na saliva. Tal mecanismo, ainda não foi totalmente elucidado, mas tem como hipótese que ocorra uma mudança no modo de replicação viral nas células da glândula salivar do inseto, em função da polarização das células epiteliais, impedindo assim, a liberação do vírus para cavidade apical, e desse modo o inseto não transmite o vírus (PAULSON et al., 1992; PAULSON et al., 1989; GRIMSTAD et al., 1985).

A infecção pelos vírus da dengue, zika e chikungunya no mosquito vetor ocorre no período que vai desde o repasto infectante até a capacidade de transmissão do vírus pelo mosquito e é designado como período de incubação extrínseco (GONÇALVES, 2010). Durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro já infectado as fêmeas se

infectam com um patógeno, estando aptas a transmiti-lo ao próximo hospedeiro no período de 07 a 14 dias (TRAVANTY et al., 2004; SALAZAR et al., 2007). Após a ingestão de sangue contaminado com o vírus dengue, as partículas virais precisam se ligar a receptores específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, se replicar nas células epiteliais intestinais para poderem então deixar o intestino (CAMPANELLI, 2007), como pode ser visto na Figura 3.

**Figura 3 - Esquema de transmissão do vírus dengue pelo *Aedes aegypti*.**



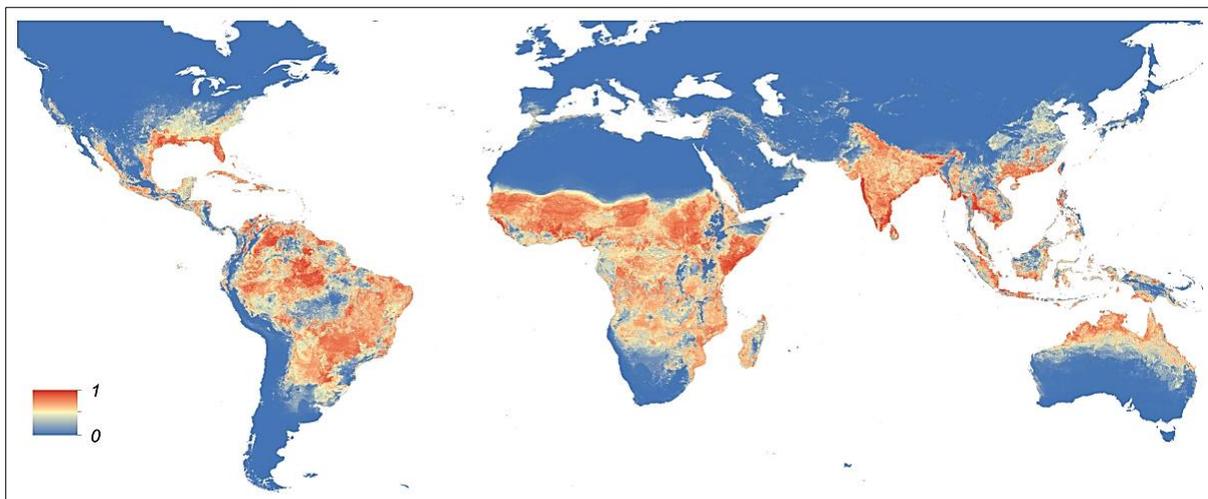
Fonte: [www.lersaude.com.br/dengue](http://www.lersaude.com.br/dengue).

Uma vez que o vírus consegue deixar o intestino, ele passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). Por fim, é necessário estabelecer a infecção na glândula salivar. Para que esse mosquito seja considerado apto a transmitir o vírus, partículas virais ativas precisam ser eliminadas juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (BLACK et al., 2002).

Estima-se que o número de pessoas que se infectam, todo ano, com o vírus da Dengue esteja entre 50 e 100 milhões, nos países endêmicos (Figura 4). No Brasil, até setembro de 2016, foram registrados 1.438.624 casos prováveis de dengue, dos quais, 762 foram notificados como graves (BRASIL, 2016). A dengue apresenta um padrão sazonal,

com maior incidência de casos no primeiro semestre de cada ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais (BRASIL, 1999).

**Figura 4 - Distribuição global prevista de *Aedes aegypti*, indicando a probabilidade de ocorrência de arboviroses associada a este vetor (vermelho, indica probabilidade de 100%; azul, probabilidade de 0).**



Fonte: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347.004>, em 28.11.2016. Kraemer et al., 2015.

A manutenção dessas arboviroses é promovida, também, por fatores que favorecem a ocorrência do culicídeo vetor, tais como: a inexistência de ações de controle adequados do mosquito na maioria dos países endêmicos, o crescimento populacional, a urbanização não planejada e descontrolada, que gera mudanças demográficas, a facilitação do deslocamento de pessoas promovendo o transporte de patógenos, a incubação de diferentes vírus em centros urbanos, condições precárias de saneamento básico, e finalmente a escassez de programas de Saúde Pública adequados (TAUIL, 2001; WHO, 2006).

A OMS informou que em 2015, chegou a 1 milhão e 30 mil os casos registrados de chikungunya na América Latina, desses, 2 mil estavam no Brasil. Já em 2016, o país registrou 236.287 casos prováveis de febre de chikungunya (OPAS, 2016; BRASIL, 2016). Ainda segundo a OMS, entre 3 e 4 milhões de pessoas podem ter contraído o vírus zika, em 2016, no continente americano. No Brasil, foram registrados 200.465 casos prováveis de febre pelo vírus zika até setembro de 2016 (BRASIL, 2016).

### 2.1.3 Controle no Brasil

No Brasil, as condições sócio-ambientais favoráveis à expansão do *Aedes aegypti* propiciaram sua dispersão desde sua reintrodução em 1976, após a exitosa campanha de erradicação do mosquito nas décadas de 40 e 50 para o controle da febre amarela nas Américas (BRAGA; VALLE, 2007). A partir de 1982, quando ocorreu a primeira epidemia de dengue em Roraima, o controle de *A. aegypti* passou a ser realizado de forma irregular e pontual. Mais tarde, em 1986 com a introdução do sorotipo 1 do vírus (DENV-1) no Rio de Janeiro e sua rápida disseminação para outros estados, e a tendência de aumento da incidência verificada nos últimos anos daquela década e a introdução de um novo sorotipo (DENV-2) que prenunciava uma epidemia de dengue e o aumento nos casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) nos estados, teve então a necessidade de fortificar um programa de controle com vistas a redução do número de casos da dengue. Nesse sentido, teve início a estruturação do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), em 1996 (BRAGA; VALLE, 2007).

Em junho de 2001 o Ministério da Saúde, em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde, realizou um Seminário Internacional para reavaliar as experiências do PEAa e elaborar um Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD). Este plano avançou com o desenvolvimento do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) e seu lançamento em julho de 2002, vigente até hoje (BRASIL, 2002).

Algumas mudanças implementadas pelo PNCD ampliaram as ações dos modelos anteriores inclusive em alguns pontos essenciais, como:

1. A elaboração de programas permanentes, uma vez que não existe nenhuma evidência técnica de que a erradicação do mosquito seja possível, a curto prazo;
2. O desenvolvimento de campanhas de informação e mobilização social, de maneira a se criar o envolvimento da sociedade na manutenção do ambiente doméstico livre de potenciais criadouros do vetor;
3. Fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para ampliar a capacidade de predição e de detecção precoce de surtos da doença;
4. Melhoria da qualidade do trabalho de campo de combate ao vetor;
5. Integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização dos Programas de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e Programas de Saúde da Família (PSF);

6. Utilização de instrumentos legais que facilitem o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas etc;

7. Atuação multissetorial por meio do fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e a utilização de recursos seguros para armazenagem de água;

8. Desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios.

(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002.)

Segundo o Procedimento de Segurança de Controle de Vetores da Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2002), e Oliveira et al., (2011) o controle de *A. aegypti* pode ser realizado através de ações com o enfoque ecológico para o controle de pragas, assim como o uso integrado e racional de várias técnicas disponíveis unificando o programa, visando diminuir os custos e gerando o mínimo de efeitos adversos adicionais ao ecossistema. O manejo integrado é a estratégia de combate ao vetor que apresenta os melhores resultados, pois compreende o uso de múltiplas atividades com diferentes focos para impedir a proliferação desses mosquitos nas áreas afetadas.

Entre as seguintes estratégias que podem ser empregadas, se tem a vigilância sanitária (manejo ambiental), a comunicação e mobilização social, o controle biológico, o controle químico, o controle genético, bem como outras estratégias alternativas como o uso inundativo de armadilhas.

Na vigilância sanitária ou manejo ambiental, os órgãos governamentais desenvolvem programas junto à comunidade com atividades preventivas, como a conscientização da população, e o mais importante à eliminação de possíveis criadouros, mediante drenagem, coleta e destino adequado de lixo, e também instalações de telas em janelas ou portas, ou o uso de repelentes, impedindo assim o contato do homem com o vetor (BRAGA; VALLE, 2007).

Quanto à comunicação e mobilização social, se inclui práticas educacionais com informações sobre os vírus transmitidos pelo *A. aegypti*, com vistas à redução da população desse vetor. Entre as medidas de prevenção divulgadas recomenda-se a eliminação de potenciais criadouros, informações sobre a biologia e ecologia do vetor, principais sintomas das doenças e recomendações para que, em casos de doença, recorra-se aos serviços de saúde.

Uma ação de controle de baixo impacto ambiental é o controle biológico, o qual por definição utiliza as relações ecológicas entre os organismos para o controle populacional da espécie-alvo, envolvendo, por exemplo, o parasitismo, competição e a predação. Exemplos são a utilização de peixes larvófagos como a *Poecilia reticulata*, e a bactéria entomopatígena *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti), entre outros que possam se alimentar ou impedir o desenvolvimento do vetor.

O controle químico baseia-se na aplicação de inseticidas químicos tanto para o controle de larvas, larvicidas a exemplo do organofosforado temephos, quanto no controle de adultos, adulticida como o piretroide deltramina. Essa estratégia de controle, infelizmente é a mais utilizada nas ações de controle, sendo na maioria das vezes a única empregada, assim a seleção de populações de mosquitos resistentes aos inseticidas químicos é crescente em diversas regiões do Brasil (ARAÚJO et al., 2013; LIMA et al., 2011; MELO-SANTOS et al., 2010).

A redução da população do vetor através da manipulação genética é o controle genético. Como exemplo dessa ação, se tem a liberação de machos *A. aegypti* geneticamente modificados, os quais transportam genes letais que ao acasalarem com fêmeas selvagens, irá gerar uma prole portadora desse gene, assim as larvas não atingirão a fase adulta (OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, alguns autores chamam a atenção para os riscos oriundos da liberação de mosquitos transgênicos, o que poderá acarretar impactos negativos à biodiversidade.

Há alternativas de controle para o *A. aegypti*, tendo como exemplo o uso de armadilhas para a captura de ovos, as ovitrampas, que quando utilizadas em grandes quantidades, pode reduzir o tamanho da população de adultos, e assim diminuir os riscos de transmissão de doenças transmitida por esse vetor numa dada área (REGIS et al., 2008). O uso de tais armadilhas pode ser potencializado com uso de larvicidas, como o Bti, que já foi avaliado e mostrou-se eficaz no controle da população de *A. aegypti* (REGIS et al., 2008; REGIS et al., 2013).

Diante das diversas estratégias de controle para reduzir população de *A. aegypti*, Valle et al. (2016), adverte que outras áreas do conhecimento, dentro desse contexto, começam a se destacar. Iniciativas que buscam referências nas ciências humanas e sociais concentram a atenção para as comunidades, cidadania e o ambiente, o que reflete a maturidade do país no reconhecimento que o combate a doenças transmitidas por vetores transcende a esfera da Saúde e exigem ações intersetoriais.

Ações educativas adotadas na comunicação e mobilização social são de fundamental importância para o controle de doenças transmitidas por vetores. Quando devidamente informada e capacitada, a sociedade torna-se um dos principais instrumentos na resolução dos desafios associados a estas ações. Mesmo para que outros métodos alternativos tenham sucesso, o envolvimento e a participação da comunidade são sempre essenciais (VALLE et al., 2016).

No período de 2013 a 2016 teve início um dos momentos mais desafiadores para a saúde pública, no Brasil e em alguns outros países do mundo, caracterizado pela tríplice epidemia, causada pela circulação simultânea dos vírus dengue, chikungunya e zika. Neste cenário, a introdução do zika vírus no Brasil revelou novos agravos associados a este vírus, como a síndrome congênita neurológica do zika vírus (recém-nascidos), e a síndrome de Guillain-Barré (adultos). Essa última, também está associada à infecção pelo vírus chikungunya (OPAS, 2011; ZANLUCA, et al., 2015; OPAS, 2016; WHO, 2016; VALLE et al. 2016).

#### 2.1.3.1 Controle em Fernando de Noronha

O Distrito de Fernando de Noronha localizado no arquipélago que recebe o mesmo nome é um dos principais pontos turísticos do estado de Pernambuco, Brasil, onde as ações do PNCD para o controle do mosquito *A. aegypti* foram intensificadas desde 2000. Apesar disso, em 2001 foram notificados os primeiros casos de dengue na Ilha (CORDEIRO, 2008) e até 2012, um total de 687 novos casos foram relatados no arquipélago (REGIS et al., 2014). Segundo a Secretaria Distrital de Saúde, entre os períodos de 2015 e 2016, foram confirmados novos casos de Dengue e Chikungunya, (dados não publicados) (Tabela 1).

Estudos têm demonstrado a competência da população local de *A. aegypti* ao vírus Dengue (BARBOSA et al., 2016) e mais recentemente ao vírus Zika (GUEDES et al., 2017 *impress*), apesar de não ter sido confirmada a circulação deste último na Ilha. Esta população está bem estabelecida e adaptadas a este ambiente insular (MARROQUIM, 2015).

**Tabela 1 - Número de casos confirmados de Dengue, Zika e Chikungunya, em Fernando de Noronha, entre janeiro de 2015 e dezembro de 2016.**

ANO	ARBOVIROSE	MESES												TOTAL
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
2015	Dengue	-	-	2	-	0	4	2	-	-	-	-	1	<b>9</b>
	Zika	0	0	-	0	0	-	-	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	Chikungunya	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0</b>
2016	Dengue	3	12	35	13	0	0	1	-	-	-	-	-	<b>64</b>
	Zika	0	0	-	0	0	-	-	0	0	0	0	0	<b>0</b>
	Chikungunya	11	39	62	23	2	1	-	-	-	-	-	-	<b>138</b>

Fonte: Secretaria Distrital de Saúde de Fernando de Noronha/PE.

Araújo et al. (2013) ao analisar o perfil de susceptibilidade de populações de *A. aegypti* do estado de Pernambuco aos inseticidas utilizados no PNCD, demonstraram que a população local da ilha era susceptível aos larvicidas químicos e biológicos, embora fosse resistente a cipermetrina, um adulticida da classe dos piretroides. Convém ressaltar, que o uso de inseticidas químicos não é preconizado para esta localidade, visto que se trata de uma Área de Proteção Ambiental (APA), portanto, apenas o biolarvicida Bti é utilizado no Programa local desde 2002.

Ainda neste estudo, foi comprovado que aquela população apresentava modificações expressivas na atividade das Glutathione-S-transferases (GST), enzimas envolvidas com o mecanismo de resistência metabólico aos inseticidas, especialmente aos piretroides (MARTINS et al., 2009; 2012).

A manutenção do mecanismo de resistência metabólica em populações de *A. aegypti* pode levar a um custo adaptativo elevado, que por sua vez, poderá resultar em desvantagens para as populações resistentes quando cessada a pressão de seleção ao inseticida. Frequentemente, o custo biológico (*fitness cost*) pode comprometer o tempo de desenvolvimento larval, o número de fêmeas reprodutivamente ativas, a fecundidade e a longevidade dos indivíduos resistentes (BELINATO; MARTINS; VALLE, 2012; DINIZ et al., 2014 e 2015; MARTINS et al., 2012).

Apesar das ações desenvolvidas no âmbito do PNCD, a exemplo da eliminação de criadouros potenciais representados por resíduos sólidos e tratamento dos reservatórios de água potável com o biolarvicida Bti, a Ilha permanece infestada por *A. aegypti*. A vigilância entomológica das áreas urbanas da Ilha de Fernando de Noronha realizada pelo Sistema de Monitoramento e Controle Populacional de *Aedes aegypti* (SMCP-*Aedes*), desde 2011, tem auxiliado a direcionar as ações de combate ao vetor, especialmente nas áreas de maior infestação (MONTEIRO, 2014). O SMCP-*Aedes* está baseado na coleta regular de ovos do mosquito através de armadilhas de oviposição (ovitampas) (REGIS et al., 2014).

Considerando o fato de Fernando de Noronha/PE ser uma APA, infestada pelo mosquito *A. aegypti* e com um cenário epidemiológico atual favorável à introdução de novos arbovírus, é de fundamental importância o uso de estratégias alternativas para o controle vetorial diferentes das já executadas pelo PNCD. Uma peculiaridade da Ilha que certamente contribui para sua infestação pelo mosquito é o acúmulo de resíduos sólidos, representados em sua maioria por objetos em desuso, em áreas peridomiciliares, em função da ausência de um sistema regular de coleta e remoção destes resíduos para fora da Ilha (Figura 5). Esta característica dificulta as ações de controle pois amplia as possibilidades de criadouros temporários nas áreas tratadas.

**Figura 5 - Ilustração de resíduos sólidos presentes em áreas peridomiciliares de Fernando de Noronha/PE.**



Fonte: Do autor.

## 2.2 NOVAS ALTERNATIVAS PARA O CONTROLE DE *Aedes aegypti*

As principais inovações tecnológicas na área de combate de *Aedes aegypti* tem se desenvolvido a partir de estratégias de controle genético e autocidas. Tendo em vista a saturação, em termos de possibilidades, que o uso indiscriminado de inseticidas químicos provocou, na maioria das vezes sendo a única ação de controle aplicada, e durante décadas, torna-se essencial a busca por alternativas de controle para esse vetor.

O enfoque em releituras da técnica do inseto estéril, por exemplo, tem se mostrado promissor e, sobretudo alinhado com uma tendência, inclusive preconizada pela OMS, que é o manejo integrado de técnicas de controle. Convém ressaltar que algumas dessas alternativas de controle ainda têm algumas questões a serem respondidas, por exemplo, quais tipos de alterações genéticas, o macho que carrega o gene letal, podem ser produzidas pelas interações com indivíduos selvagens; o impacto em termos de expressões gênicas associadas, assim como possíveis alterações da competência vetorial destes insetos.

Outros aspectos demandam estudos, disponibilidade de arcar com custos de montagem de biofábricas e avaliação de eficácia da implementação dessas estratégias complementares associadas às ações já preconizadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Dentre as técnicas que se mostram mais promissoras podemos citar as estratégias de controle biológico do vetor por meio do uso da *Wolbachia*; Mosquitos Transgênicos e a Técnica do Inseto Estéril (TIE) por meio de radiação ionizante.

### 2.2.1 *Wolbachia pipientis*

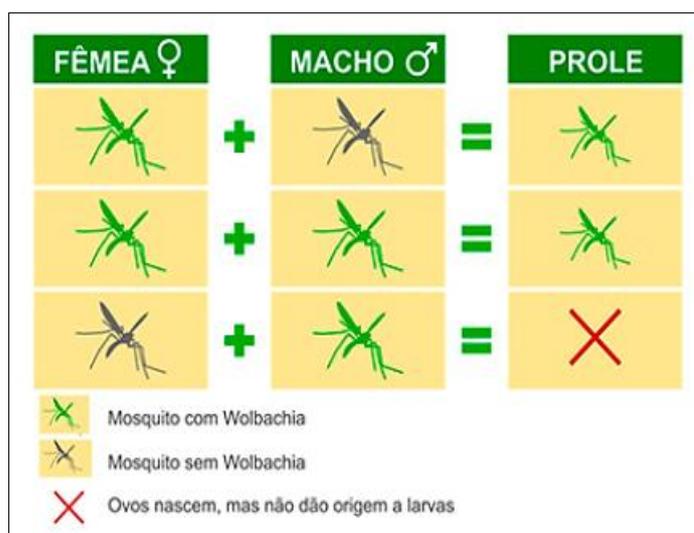
*Wolbachia pipientis* é uma bactéria gram-negativa endossimbionte, descrita pela primeira vez em 1926, em mosquitos da espécie *Culex pipiens*. Posteriormente, foi detectada em mais de 60% dos insetos já descritos (HILGENBOECKER et al., 2008), o que a faz a bactéria intracelular mais abundante do mundo Werren et al. (2000). Apesar da ampla gama de hospedeiros, essa bactéria não é infecciosa e não é capaz de infectar vertebrados, incluindo os humanos (WALKER et al., 2011).

O emprego dessa bactéria como agente de controle populacional de mosquitos, atualmente classificada pela Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection*

Agency, EPA) dos Estados Unidos, como controle biológico, se deve principalmente a vantagem reprodutiva que apresenta, sendo capaz de se disseminar rapidamente para população hospedeira não infectada, ao induzir incompatibilidade citoplasmática (IC) (HOFFMAN, 2015; TURELLI, 2013).

Esse fenômeno pode ser uma alternativa de esterilização, onde machos infectados com esse organismo simbiote, ao acasalarem com fêmeas selvagens inviabilizarão suas proles. Enquanto que machos e fêmeas, ambos infectados terão suas proles viáveis, tendo em vista que a *Wolbachia* é maternalmente transmitida, fornecendo uma vantagem de transmissão para o simbiote, sendo assim rapidamente disseminada na população. Por sua vez, as fêmeas infectadas pela *Wolbachia*, acasaladas com machos selvagens, produzirão descendência também infectada (Figura 6) (HOFFMAN, 2015; TURELLI, 2013; BECKER et al., 2003).

**Figura 6 - Ação da *Wolbachia* em mosquitos.**



Fonte: extraído de <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=1591&sid=32>.

Dessa forma, a população original é progressivamente substituída por uma infectada com *Wolbachia*, acarretando também ao longo do tempo, sua supressão (HOFFMAN, 2015; TURELLI, 2013;). Devido à similaridade com a Técnica do Inseto Estéril (TIE), a IC é estrategicamente referida como Técnica do Inseto Incompatível (BOURTZIS et al., 2014).

Outro mecanismo de ação da *Wolbachia*, detectada pela primeira vez em *Drosophilla melanogaster* com a cepa *Wolbachia pipietins* wMelPop, a qual é altamente virulenta, foi sua capacidade em acarretar mortalidade precoce nesse inseto. Assim, com o

intuito de controlar populações de insetos vetores, essa cepa e outras variações dela foram transfectadas para outros insetos, incluindo o mosquito *A. aegypti*, reduzindo assim, a longevidade, e desse modo, os riscos de transmissão de doenças (MCMENIMAN et al., 2009; MIN; BENZER, 1997).

A bactéria *Wolbachia* em insetos, também estimula o sistema imune protegendo-o de infecções, a exemplo do vírus Dengue em mosquitos *A. aegypti*, de modo que não mais o transmite a seus hospedeiros. Estudos de imunoflorescência demonstraram que em *A. aegypti* infectados por essa bactéria, cepa *Wolbachia pipitiens* wMelPop-CLA, o vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2) não conseguiu se estabelecer, provavelmente por competição metabólica entre o simbiote e o patógeno (MOREIRA et al., 2009; YE et al., 2015).

Além do efeito inibitório na transmissão por *A. aegypti* dessa cepa bacteriana para o DENV-2, também já foi verificado a não transmissão de outros patógenos, como o vírus chikungunya e o protozoário causador da malária *Plasmodium sp.* e, mais recentemente o Zika vírus (DUTRA et al., 2016; MOREIRA et al., 2009).

Nesse sentido, a liberação de *A. aegypti* infectados com *Wolbachia pipitiens* wMelPop visando reduzir a capacidade desses mosquitos de transmitir a dengue, é a principal meta do programa “Eliminar a Dengue” (*Eliminate Dengue Program*). Esse programa, que envolve vários projetos, é organizado por diversas colaborações internacionais, formado por pesquisadores, agências governamentais, universidades e apoiado por uma rede de financiadores. Seis países fazem parte desse programa, Austrália, onde os estudos iniciaram a partir dos anos 1980, Brasil, Colômbia, Indonésia, Vietnã e a Índia. No Brasil, experimentos com *A. aegypti* infectado com *Wolbachia* ocorrem desde 2014 ([www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org); HOFFMAN et al., 2011).

Tendo em vista que, o *A. aegypti* não é naturalmente infectado por *Wolbachia*, o processo de infecção para essa espécie ocorre de forma artificial, através da técnica de microinjeção em embriões do mosquito (MCMENIMAN et al., 2009).

Contudo, o uso da *Wolbachia* poderá estar relacionada à redução do *fitness* do inseto (DEAN, 2006), embora, densidades elevadas de larvas nos criadouros também possam gerar custo biológico para *A. aegypti* (DUTRA et al., 2016).

Além disso, o uso da *Wolbachia*, sobretudo em grande escala, com vistas na redução da população do inseto, tem apresentado algumas dificuldades, quanto à liberação dos insetos infectados, diferenças nas condições ambientais e antrópicas, que poderão limitar o

potencial de dispersão dos insetos nos locais de soltura, além de outros fatores, como a aceitação por parte da população local (ARAÚJO et al., 2015).

Dentro desse contexto, Loreto e Wallau (2016), chamam a atenção de que muito enfoque tem sido dado à eficácia que o *A. aegypti* infectado com *Wolbachia* possui em não transmitir vírus Dengue, contudo pouco se tem investigado sobre o efeito que a liberação desses mosquitos infectados tem sobre a fauna e outros impactos no ambiente e na economia. Além disso, a relação desse mosquito infectado com outros insetos de complexa relação ecológica pode resultar em sérios distúrbios ecológicos.

Portanto, o conhecimento de possíveis impactos sobre a biodiversidade no que diz respeito à liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*, deve ser previamente e devidamente realizado, a fim de evitar o surgimento de grandes problemas (LORETTO; WALLAU 2016).

### 2.2.2 Mosquitos Transgênicos

O uso de mosquitos transgênicos para o controle de espécies vetoras, embora tenha iniciado na década de 1960, quando machos foram modificados geneticamente a fim de se tornarem estéreis (Técnica do Inseto Estéril, TIE) (ALPHEY et al., 2010), tem recentemente, sido considerada uma das alternativas promissoras para controle de *A. aegypti*.

A técnica pode ser empregada utilizando insetos modificados geneticamente para se tornarem refratários ao patógeno/parasita, ou seja, incapazes de transmiti-los, chamados de mosquitos transgênicos de primeira geração, cujo objetivo é substituir a população selvagem ou insetos cuja alteração genética, resulta no carreamento de genes letais, de modo que ao acasalarem com fêmeas selvagens, não haverá produção de novas proles, suprimindo assim a população. Essa última é chamada de liberação de insetos que carregam gene letal (*Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene*, RIDL). São os chamados mosquitos transgênicos de segunda geração (CARVALHO et al., 2015).

Na técnica de mosquitos transgênicos de primeira geração, ocorre a substituição da população selvagem a partir de insetos refratários a agentes patogênicos, por meio de estirpes transgênicas, utilizando transposons, proteínas fluorescentes e promotores específicos de

tecido ou de fase, tendo sido várias espécies de mosquitos transformados (MASSONNET-BRUNEEL et al., 2013).

Quanto aos mosquitos transgênicos de segunda geração, a técnica RIDL baseia-se no princípio da TIE, empregando uma nova abordagem para supressão de populações com a liberação de machos portadores de um gene letal condicionado, o qual só se expressa em uma determinada condição (CARVALHO, 2012; DYCK et al., 2005; THOMAS et al., 2000).

Uma estirpe particular de *A. aegypti*, a OX513A, desenvolvida pela empresa britânica *Oxitec*, é constituída pela inserção de um gene letal que se expressa principalmente no estágio de pupa. A liberação desta em teste de campo simulado, inicialmente ocorreu na Malásia e em lançamentos de campo em pequena escala nas Ilhas Cayman, Malásia e Brasil, porém com liberações suficientemente grandes para demonstrar supressão da população-alvo nas Ilhas Cayman e no Brasil (CARVALHO et al., 2015; HARRIS et al., 2012; LACROIX et al., 2012; ALPHEY, 2014; BURT, 2014).

A principal limitação atual da técnica no Brasil é a dependência de uma produção em larga escala por indústria privada, que detém a tecnologia e patente da estirpe utilizada para modificar o inseto geneticamente.

Outra limitação da técnica também encontrada aqui no Brasil, no município de Juazeiro, do estado da Bahia, região nordeste do país, foi a competição entre machos selvagens e machos modificados geneticamente (OX513 A), pelo acasalamento com fêmeas selvagens. Houve uma grande demanda de liberação dos machos que carregavam gene letal, dada a elevada densidade de machos selvagens, para alcançar o resultado esperado de supressão da população (CARVALHO et al., 2015).

É importante destacar que a liberação de tais machos geneticamente modificados (OXI513 A) em Juazeiro, foi desenvolvida como parte do Projeto *Aedes* Transgênico (PAT), o qual envolveu diferentes segmentos da sociedade local, a fim de lhes esclarecer sobre prevenção da dengue e outras arboviroses pelo transmitidas pelo *A. aegypti*, e principalmente informação de que no meio estariam sendo liberados mosquitos transgênicos (CARVALHO et al., 2015).

### 2.2.3 Técnica do Inseto Estéril (TIE)

A ideia da introdução da esterilidade em uma população selvagem a partir da liberação em massa de insetos (Técnica do Inseto Estéril – TIE ou, em inglês, *Sterile Insect Technique* – SIT) foi proposta de forma independente, entre 1930 e 1940, por três pesquisadores: A.S. Serebrovskii, na Universidade Estadual de Moscou, F.L. Vanderplank em uma estação de pesquisa da mosca *Glossina wiedmanni*, popularmente conhecida como mosca tsé-tsé, na zona rural de Tanganyika (atual Tanzânia) e E.F. Knipling, entomologista do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Serebrovskii e Vanderplank procuraram alcançar o controle de pragas através da esterilidade que surge quando diferentes espécies ou linhagens genéticas são cruzadas. No entanto, a abordagem mais conhecida foi aquela proposta por Edward F. Knipling, em 1937, o qual estabeleceu o princípio que caracteriza a TIE, com o objetivo de erradicar a mosca varejeira, *Cochliomyia hominivorax*, praga considerada um sério problema, na década de 1930, para a bovinocultura e animais silvestres da região sudoeste dos Estados Unidos (MALAVASI; ZUCCHI, 2000; DIAS; GARCIA, 2014).

A TIE é caracterizada por intervenções de esterilização ou radiação ionizante, que impede a produção viável da prole sendo, portanto uma intervenção genética. A TIE é um sistema espécie-específico de supressão populacional através do qual os insetos machos esterilizados são liberados para acasalarem com os seus pares selvagens, reduzindo assim o potencial reprodutivo da população-alvo. É necessário, portanto, conhecimento previo sobre a bioecologia da espécie-alvo ajustar a logística para o manejo integrado e a sua viabilidade nos contextos locais (KNIPLING, 1955; ROBINSON, 2002).

A esterilização de pupas-macho pode ser alcançada a partir de várias técnicas, sendo elas a quimioesterilização, a radiação ionizante e a incompatibilidade citoplasmática (BECKER et al., 2003).

Na quimioesterilização, as pupas-macho são imersas por um período pré-determinado em uma solução alcalina padrão, a exemplo de lufenuron (Macth), abamectin (Vertimec 18 CE), pyriproxyfen (Cordial 100 CE) e diflubenzuron (Dimilin) (TIBA, 2008). Quando aplicada na forma de iscas, a esterilização química difere da técnica do macho estéril clássica, por radiação ionizante, pois visa esterilizar os indivíduos no campo, sem a necessidade da multiplicação do culicídeo em laboratório. Esse método pode ser

integrado com outros métodos de controle, a exemplo do químico, biológico e culturais no contexto do manejo integrado de pragas ou insetos vetores (SAZAKI, 2006).

Seawright et al. (1978) relatam que foram alcançados altos níveis de esterilidade em insetos, com o mínimo de perda do *fitness*. No entanto, o uso em larga escala de quimioesterilizantes pode comprometer a saúde dos manipuladores dessas substâncias, as quais são potencialmente mutagênicas para o homem.

Além de ser considerada a TIE clássica, o uso de radiação ionizante para esterilização de pupas-macho apresenta vantagens sobre o uso de químicos e organismos modificados, uma vez que não deixa resíduos tóxicos e nem envolve o uso de outros organismos. Além disso, é compatível com a utilização concomitante de compostos com ação larvicida e/ou ovicida (CARVALHO et al., 2014).

A TIE clássica é considerada um tipo de controle genético, na qual o próprio inseto é utilizado para seu controle e baseia-se na exposição dos insetos à radiação ionizante, a qual danificará permanentemente seu material genético, provocando esterilidade nesses indivíduos (PHUC et al., 2007; WALDER, 2000).

Características dessa técnica envolvem a criação em massa de insetos machos, seguida da esterilização pela radiação ionizante e liberação em massa em uma área alvo. Por estar relacionada às questões reprodutivas, esta é uma técnica espécie-específica, uma vez que o macho não acasala com fêmeas de outras espécies (ALPHEY, 2002; BENEDICT; ROBINSON, 2003; DYCK et al., 2005).

Relatos encontrados na literatura mostram que o uso da radiação ionizante como agente esterilizante teve início bem antes de 1937. Um dos primeiros estudos envolvendo o uso da radiação ionizante esterilizar e reduzir níveis de população de insetos foi publicado em 1916, por Runner, o qual descobriu que altas doses de raios-X aplicada à cigarra *Lasioderma serricorne* tornou-a incapaz de se reproduzir, sem, no entanto, haver prejuízos à sua longevidade e viabilidade (RUNNER, 1916).

Em 1927, Muller demonstrou que a radiação ionizante induziu mutações visíveis em *Drosophila*, e também um grande número de mutações dominantes, que foram expressas por meio de uma redução da eclosão dos ovos postos por fêmeas irradiadas (MULLER, 1950).

Apesar do pioneirismo de Runner (1916) no uso da radiação ionizante, foi Muller, em 1946, que recebeu o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da mutagênese induzida,

em 1927. Entretanto, somente após 1950, quando Muller fez um esforço especial para divulgar os efeitos biológicos da radiação, que alguns entomologistas se tornaram conscientes de que, através de irradiação, a esterilidade sexual em insetos machos poderia ser facilmente alcançada (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Em 1954, meses após liberações semanais e inundativas de moscas varejeiras estéreis na Ilha de Curaçao, o autor Knipling relatou que a erradicação dessa praga tinha sido alcançada (KNIPLING, 1955; KLASSEN; CURTIS, 2005).

Em 1955, Knipling propôs o conceito de liberação de insetos estéreis para controlar pragas agrícolas, e, a partir daí a técnica foi utilizada para a erradicação de várias outras pragas a exemplo de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) no sudoeste da Califórnia, em 1954; *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) na Austrália, em 1962; *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), nas ilhas sudoestes do Japão (RENDÓN et al., 2004; KUBA et al., 1996, KOYAMA et al., 2004; SMALLRIDGE et al. 2002; ENKERLIN, 2005).

Bushland et al. (1953) incorporaram a TIE em um programa integrado para o manejo de pragas em área extensa (originalmente, em inglês, “Area-wide Integrated Pest Management” ou AW-IPM), com a implementação de projetos de eliminação da *Cochliomyia hominivorax* em outras regiões do mundo. Os locais que se tornaram livres desta praga foram: Flórida, em 1958; Sudoeste dos Estados Unidos e México, em 1962; Porto Rico e Ilhas Virgens, em 1975; América central, em 1984; África do Norte, em 1989, Belize e Guatemala, em 1994, El Salvador, em 1995, Honduras, em 1996, Nicarágua, em 1999, Costa Rica, em 2000 e Panamá, no ano de 2001 (HENDRICHS, 2002; DYCK et al., 2005; KNIPLING, 1955).

Outro exemplo de bastante sucesso de controle de insetos empregando a TIE é o controle da *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), a mosca-das-frutas. No Brasil, na região nordeste, em Juazeiro, cuja região é ricamente conhecida pela exportação de manga e uva, o emprego da TIE faz parte do programa de Manejo Integrado de mosca-das-frutas, e para tal, culminou com a implantação da biofábrica Mosamed (HENDRICHS et al., 2002).

A esterilização de insetos pode promover a infertilidade das fêmeas, aspermia ou inativação espermática em machos, inabilidade de acasalar ou a mutação letal dominante em células reprodutivas de machos e fêmeas. Tais condições podem ser induzidas nos insetos pela ação da radiação ionizante, porém, nem todas podem ser utilizadas para controle de pragas. Apenas a esterilidade devido à mutação letal dominante no esperma, no caso dos machos, e a infertilidade das fêmeas são os tipos utilizados com sucesso. O sucesso da

técnica ocorre devido à combinação de fatores, como por exemplo, fêmeas irradiadas poderem inicialmente produzir ovos com mutação letal dominante e depois tornarem-se inférteis (DIAS; GARCIA, 2014).

A princípio, a técnica do inseto estéril é aplicável para controlar uma grande variedade de pragas, mas fatores biológicos, interagindo com fatores sócio-econômicos e políticos, limitaram seu uso prático a um conjunto mais restrito de espécies e situações. A esterilização por radiação é um processo com etapas de controle de qualidade simples e confiáveis. A ação da radiação é imediata, de modo que não existe exigência para realizar a manutenção dos insetos estéreis após o tratamento. Outra vantagem, é que a radiação passa através do material da embalagem de confinamento dos insetos, permitindo que sejam tratados após o fechamento da embalagem, reforçando assim a biossegurança e reduzindo os riscos do manuseio dos insetos (ALPHEY 2002; DYCK et al., 2005; PHUC et al., 2007; PAPATHANOS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

No caso de algumas espécies, como *A. aegypti* e *A. albopictus*, o uso da esterilização por radiação ionizante também pode interromper a reprodução livre de populações selvagens, porém é um processo gradativo, sendo necessárias várias solturas de machos irradiados para se atingir o objetivo. Isso é consequência, principalmente, do fato de que podem existir na natureza uma grande quantidade de ovos, que, após um longo período de quiescência (de até 450 dias, no caso do *A. aegypti*) (SILVA; SILVA, 1999), podem eclodir e originar insetos viáveis.

#### 2.2.3.1 TIE aplicada aos culicídeos

A abordagem da TIE também já foi empregada para o controle de algumas espécies de culicídeos, as quais têm grande importância em saúde pública, visto que são vetores de doenças, tais como dengue, zika, chikungunya, malária, filarioses, entre outras. As espécies alvos da TIE tem sido: *A. aegypti* e *A. albopictus*, *Cx. pipiens*, *Cx. Tritaeniorhynchus*, *Cx quinquefasciatus*, *An. albimanus*, *An. culicifacies* e *An. gambiae* (BENEDICT; ROBINSON, 2003; BECKER et al., 2003).

Alphey (2010) relata que os primeiros experimentos empregando a TIE para o controle de *Aedes aegypti* foram realizados por Harvey e colaboradores na cidade de Pensacola, Flórida/USA, no período de 1960 a 1961, com o objetivo de reduzir a população

desses insetos. Esses autores utilizaram uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , e uma dose de 180 Gy. No entanto, o objetivo não foi alcançado, uma vez que a alta dose utilizada promoveu uma considerável diminuição da competitividade dos mosquitos.

Os primeiros resultados promissores surgiram apenas em 1967, em Myanmar (sul da Ásia continental) quando Laven utilizou a incompatibilidade citoplasmática provocada pela bactéria *Wolbachia pipientis*, para esterilizar mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* (LAVEN, 1967; BENEDICT; ROBINSON, 2003).

Pal; LaChance (1974) relatou os resultados obtidos em um projeto em que a TIE foi utilizada associada a outras abordagens de controle populacional das espécies de *Cx. quinquefasciatus*, *A. aegypti* e *An. stephensi* na Índia. Apesar dos esforços que empregavam vários enfoques operacionais e científicos, foram observados efeitos modestos de supressão populacional. Tal fato ocorreu devido principalmente à inesperada migração de fêmeas ao longo de vários quilômetros adentro às áreas de controle (BENEDICT; ROBINSON, 2003). Nesse sentido é importante considerar alguns fatores que contribuam para a obtenção de melhores resultados. São eles: aspectos topográficos, que dificultem a migração; uso da TIE após o uso de um método convencional de controle, reduzindo com isso o número de insetos selvagens, e liberações em uma estação apropriada do ano, quando ocorra a diminuição natural de insetos selvagens (BECKER et al., 2003).

Na Tabela 2, representados alguns trabalhos que empregaram a TIE, na tentativa de controle populacional de *A. aegypti* e outras espécies de culicídeos. De modo geral os insucessos se deveram à baixa competitividade dos mosquitos esterilizados ou migração desses mosquitos para outras áreas, ou mesmo a migração de selvagens para a área de estudo.

**Tabela 2 – Breve histórico da utilização da Técnica do Inseto Estéril (TIE) para controle de espécies de culicídeos, no período de 1962 a 2015.**

Espécie Alvo	Local/Pais	Método de esterilização	Referências
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Flórida - EUA	Radiação ionizante	Wiedhaas et al., 1962; Dame et al., 2009
<i>Culex pipiens</i>	Okypo - Myanmar	Incompatibilidade citoplasmática	Laven, 1967
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Flórida - EUA	Quimioesterilização	Paterson, 1970
<i>Culex pipien</i>	Montpellier, França	Translocação cromossômica	Laven, 1972; Cousserans & Guille, 1974
<i>Culex pipiens</i>	Deli, Índia	Incompatibilidade citoplasmática Translocação cromossômica	Curtis et al., 1982
<i>Aedes aegypti</i>	Mombasa, Quênia	Translocação cromossômica	McDonald et al., 1977
<i>Anopheles albimanus</i>	Lago Apastapeque - El Salvador	Quimioesterilização	Wiedhaas et al., 1974
<i>Anopheles albimanus</i>	Costa Pacífica - El Salvador	Quimioesterilização Translocação cromossômica	Seawright et al., 1978; Dame et al., 1981
<i>Anopheles culicifacies</i>	Lahore - Paquistão	Quimioesterilização Translocação cromossômica	Reisen et al., 1981
<i>Culex tarsalis</i>	Campo Kern - Califórnia	Radiação ionizante	Asman et. al, 1982
<i>Aedes aegypti</i>	Ilhas Cayman	Mosquito transgênico - OX513A	Harris et al., 2012
<i>Aedes aegypti</i>	Brasil	Mosquito transgênico - OX513A	Carvalho et al., 2014; 2015
<i>Aedes albopictus</i>	Saint Benoit - Ilhas Reunion	Radiação ionizante	Oliva et al., 2012
<i>Aedes albopictus</i>	Norte da Itália	Radiação ionizante	Bellini et al., 2013

Fontes: Adaptado de Alphey, 2014; Oliva et al., 2012.

Os testes com TIE química, ou quimioesterilização, de maior escala foram realizados em El Salvador e na Índia na década de 1970 (OMS, 1976).

Em El Salvador, o alvo foi o vetor da malária *Anopheles albimanus*, considerado multirresistente a inseticidas (em parte devido à utilização agrícola de inseticidas), e, portanto, difícil de controlar, por estes meios. No estudo inicial, durante cinco meses, os mosquitos foram liberados ao redor do Lago Apastapeque, sendo o teste bem sucedido ao induzir 100% de esterilidade em ovos postos pelas fêmeas selvagens (LOFGREN et al., 1974).

A história de uso da TIE demonstra que a técnica teve uma redução de utilização a partir dos anos 80, com o surgimento de outros meios de controle mais acessíveis e práticos e também da aplicação de inseticidas químicos (BECKER et al., 2003). No entanto, com o advento de novas tecnologias e um melhor entendimento da bioecologia das espécies-alvo,

a incorporação da TIE em programas de controle vetorial passou a ser novamente considerada, a partir de 2009. Com isso, foram obtidos, entre 2009 e 2015, resultados expressivos de supressão populacional de mosquitos das espécies *A. albopictus* e *A. aegypti* (BENEDICT et al., 2009; BALESTRINO et al., 2010; 2014; CARVALHO et al., 2014; 2015).

Balestrino et al. (2010), na Itália, obteve índices maiores que 70 e 80% de esterilidade de pupas machos de *A. albopictus*, irradiados na dose de 40 Gy de raios gama provenientes de uma fonte de  $^{137}\text{Cs}$ . Mais tarde, em 2013, esses mesmos autores atingiram 99% de esterilidade para o mesmo vetor.

A movimentação e a distribuição dos insetos são considerados fatores que influenciam a viabilidade e elaboração de projetos baseados na TIE, incluindo a necessidade de gerenciamento de toda a área de alcance da população. Características biológicas da espécie, que podem afetar a capacidade dos indivíduos estéreis interagirem com as populações selvagens, como: a natureza dos sistemas de acasalamento, conseqüências comportamentais e fisiológicas da produção em massa e esterilização por radiação ionizante, assim como os mecanismos que os machos usam para bloquear a aquisição de uma fêmea e/ou o uso de esperma de outros machos, demandam estudos detalhados que atrasam o uso da técnica.

Dessa forma, essas informações são necessárias na tomada de decisões acertadas sobre a integração da TIE, em uma área ampla, o manejo integrado de pragas apropriado e para a eficiente e efetiva aplicação da técnica (PARKER et al., 2007; HELINSK et al., 2008; OLIVA et al., 2012).

Portanto Vreysen (1995) sugere que o estabelecimento da TIE como um componente bem sucedido em um programa de controle de vetores, demandaria alguns pré-requisitos como: 1) a colonização, isto é, o estabelecimento da espécie no laboratório deve ser viável e a produção em massa possível a um custo razoável para fornecer o número necessário de insetos estéreis; 2) a competitividade do macho estéril, da população alvo, precisa ser adequada e não devem haver diferenças comportamentais importantes entre a população estéril e selvagem; 3) a densidade populacional da espécie-alvo precisa ser baixa ou reduzida antes da libertação para tornar economicamente viável a obtenção da proporção desejada de macho estéril para selvagem; 4) caracterização detalhada sobre a população-alvo, como dinâmica espacial e temporal, comportamento de acasalamento, locais de reprodução; 5) o método deve ser aplicado sobre uma população alvo em uma área total ou

parte da população, a qual pode estar isolada por barreiras naturais ou artificiais para excluir a imigração de indivíduos de locais vizinhos; 6) escolha preferencial de apenas uma espécie por intervenção, e 7) a liberação de fêmeas estéreis deve ser excluída para aquelas espécies em que as fêmeas são vetores de doença e/ou causam mordedura incômoda.

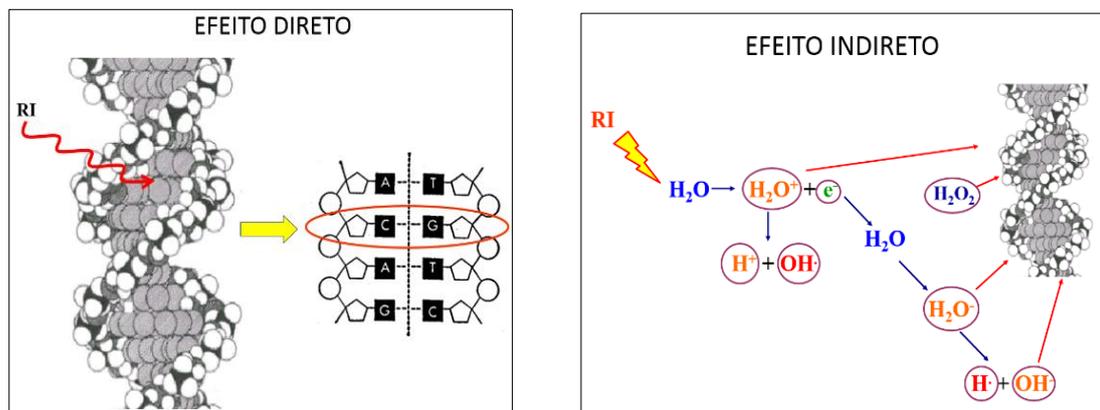
### 2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM MOSQUITOS

A fonte de radiação gama normalmente utilizada na TIE para controle de vetores é a de  $^{60}\text{Co}$ , em faixas de doses que variam de 70 a 120 Gy. A exposição, em fase de pupa, induz a mutações letais dominantes no esperma dos mosquitos machos (THOMAS et al., 2000).

A radiação ionizante pode interagir com o meio biológico de duas formas: diretamente ou indiretamente. Quando interage de forma direta, a radiação ionizante atingirá os componentes celulares, como DNA e proteínas. Já no efeito indireto, a radiação atingirá o meio em que as células estão suspensas, produzindo os radicais livres, por meio da radiólise da água, os quais podem provocar alterações moleculares e celulares em outras moléculas e células (Figura 7). A resposta biológica é diferente para os diferentes tecidos dependendo principalmente da capacidade de reparo das lesões radioinduzidas (SEGRETO; SEGRETO, 2000; OKUNO, 2013).

Sabe-se que vários produtos químicos (pesticidas, drogas, metais pesados, concentrações anormais de oxigênio, etc.), físicos (radiação, temperatura, ruído, vibração, etc.) e fisiológicos (doenças, lesões, envelhecimento, inflamação, etc) são agentes deletérios, os quais podem resultar em uma situação de estresse que pode perturbar a homeostase funcional. Uma dessas situações é descrita como estresse oxidativo (EO), e é caracterizada por uma maior produção de formas reativas de oxigênio, ou em inglês *reactive oxygen species* (ROS) com a deterioração simultânea de seus sistemas de eliminação. O aumento das concentrações de ROS resultam em danos oxidativos às proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, funções celulares, órgãos ou todo o organismo podem ser seriamente comprometido, podendo levar à morte (KODRÍK et al., 2015).

**Figura 7 - Mecanismos de ação da radiação ionizante e seu efeito no DNA da célula: A) direto; B) indireto.**



Fonte: adaptado de (TAUHATA et al., 2013).

Quando a radiação e/ou os radicais livres atingem o material biológico, danificando o DNA, podendo provocar mutações letais dominantes nas células germinativas e, também danos às células somáticas, especialmente em células que estão em mitose (LaCHANCE, 1967; CURTIS, 1969).

O DNA é um dos alvos mais importantes para os efeitos genotóxicos da radiação. A quebra da dupla hélice do DNA é a mais prejudicial, podendo levar à morte celular. A célula mitótica é extremamente sensível à radiação, pois existe grande possibilidade de fixação da lesão radioinduzida. A lei de Bergonie e Tribondeau afirma que “o efeito das radiações é maior nas células menos diferenciadas e com maior capacidade proliferativa”. Nesta perspectiva, pode-se dizer ainda que a radiosensibilidade é inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular, salvo algumas exceções, como os linfócitos (BITELLI, 2006).

Quanto maior a dose, maior será o dano às células germinativas e somáticas, porém, quanto mais avançado estiver o inseto em seu estágio de desenvolvimento, menor será o efeito somático da dose (HELINSK et al., 2009). Por isso, a irradiação no estágio de pupa é o mais indicado, uma vez que os órgãos sexuais já se encontram formados (CLEMENTS, 1992).

Em baixas doses, pode ocorrer a esterilização parcial, enquanto que em altas doses, apesar de ocorrer a esterilização mais completa, ocorre associado a isso, danos a outras células, o que se traduz na diminuição do desempenho biológico e competitividade dos machos irradiados (HELINSKI et al., 2006; 2009).

A competitividade em campo entre machos estéreis e selvagens é um parâmetro crucial, para garantir o emprego do método em questão. Portanto, é importante minimizar os efeitos adversos da radiação. Embora seja geralmente condicionado que os machos libertados precisam estar totalmente estéreis, foi sugerido que mais esterilidade pode ser introduzida à população de campo utilizando-se doses mais baixas de radiação, porém com insetos mais competitivos. Além disso, a reduzida competitividade pode ser parcialmente superada pelo aumento da proporção de insetos estéreis para selvagens (HELINSKI et al., 2006; 2009).

As modificações celulares podem ser reparadas através de vários mecanismos incluindo a ação das enzimas; porém, caso isso não ocorra, surgirão lesões bioquímicas que podem causar danos como morte prematura, alteração no processo de divisão celular e alterações genéticas (NAVARRO et al., 2008). Neste sentido as Glutathionas-S-transferases (GSTs) constituem uma família complexa de proteínas que desempenham papéis tanto no metabolismo celular como na desintoxicação de uma grande variedade de compostos xenobióticos e agentes genotóxicos (CRUPKIN; MENONE, 2013). O papel das GSTs no estresse oxidativo é de defesa predominantemente citosólica, sendo também responsável pela proteção dos componentes celulares contra vários efeitos tóxicos (SEN; SEMIZ, 2007). Em modelos experimentais, o uso de Butionina SulfOximina (BSO) resulta na supressão das concentrações intracelulares de GSH, o qual age inibindo a reação catalisada pela GST, e observa-se o aumento da sensibilidade das células à radiação ionizante e a certas drogas citostáticas (HUBER et al., 2008).

Mutações letais dominantes induzidas por radiação surgem como resultado de lesões cromossômicas nas células irradiadas. Uma mutação letal dominante que ocorre em uma célula germinativa não afeta a maturação da célula em um gameta ou a participação do gameta para formar o zigoto, porém provoca a morte do embrião em desenvolvimento. Em geral, as fases iniciais da espermatogênese (espermatócitos e espermatogônias) são as mais sensíveis à radiação do que fases posteriores (espermatídeos e espermatozóides) em termos de danos irreversíveis, resultando na morte da célula em desenvolvimento (LaCHANCE, 1967; HELINSKI, 2009).

Devido à variedade de efeitos biológicos causados pela radiação ionizante, estes podem ser classificados quanto à sua natureza em efeitos determinísticos (reações teciduais) e efeitos estocásticos. As reações teciduais resultam de dose alta e somente surgem acima de certa dose, chamada dose limiar, cujo valor depende do tipo de radiação e do tecido

irradiado; um dos principais efeitos é a morte celular e, quanto maior a dose, mais grave é o efeito. Efeitos estocásticos são alterações que surgem em células normais, sendo os principais o câncer e o efeito hereditário; pode ser induzido por qualquer dose, inclusive dose devido a radiação natural, são sempre tardios, e a gravidade do efeito não depende da dose, mas a probabilidade de sua ocorrência aumenta com a dose; os efeitos hereditários ocorrem nas células sexuais e podem ser repassadas aos descendentes (HALL; GIACCIA, 2006; OKUNO, 2013).

Segundo Collis, Schwaninger e Ntambi (2004), baixas taxas de dose de irradiação (1mGy/min) podem danificar o DNA sem a ativação do sistema de reparo, acarretando a morte das células lesadas e explicando o efeito reverso da taxa de dose. Entretanto, baixas taxas de dose ativam mais a morte celular em algumas linhagens do que em outras caracterizando o efeito tecidual. As células mais radiosensíveis são aquelas dos ovários, dos testículos, da medula óssea e do cristalino. A perda de células em quantidade considerável pode causar prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão. Contudo, o aumento da taxa de perda pode às vezes ser compensado com o aumento da taxa de reposição, justificando seu emprego para fins clínicos. Neste caso, haverá um período de transição em que a função do tecido ou órgão foi parcialmente comprometida e posteriormente reposta (TAUHATA et al., 2013).

A radiação pode provocar efeitos somáticos, os quais podem ser classificados como imediatos e tardios. Os eventos imediatos são consequência de uma exposição aguda à radiação em um curto intervalo de tempo. Os eventos tardios, por sua vez, são aqueles que apresentam um período de latência relativamente longo após exposição aguda ou crônica (OKUNO, 2010).

Os insetos adultos e em suas diferentes fases de desenvolvimento diferem na sensibilidade para a indução de mutações letais dominantes, por isso cuidados devem ser tomados na identificação da dose mais apropriada de radiação, para que esta produza o nível pretendido de esterilidade sem contudo prejudicar a condição física geral do inseto libertado (ROBINSON, 2002). Visto que os danos às células, somáticas ou germinativas, aumentam com a dose, porém o dano somático diminui quando a irradiação ocorre em uma fase mais avançada do desenvolvimento do inseto, quando o número de células em divisão diminui (HELINSKI et al., 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

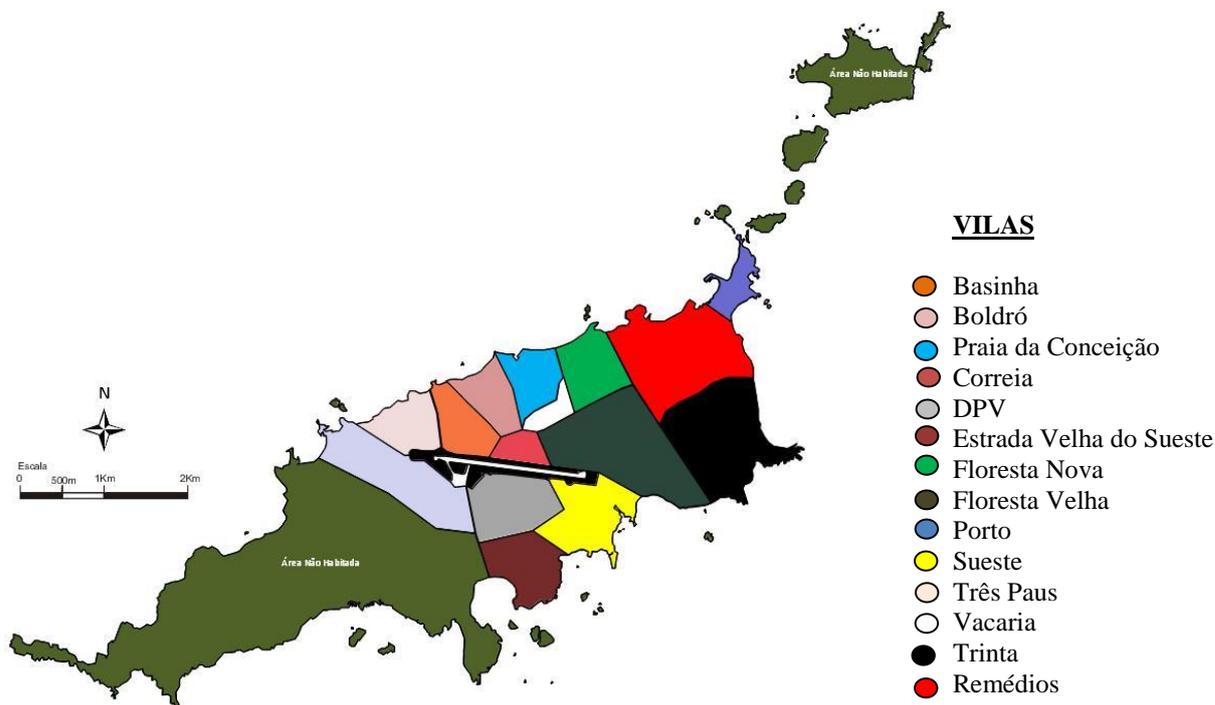
O território selecionado para testar a Técnica do Inseto Estéril (TIE) para controle de *Aedes aegypti* foi o arquipélago de Fernando de Noronha (03°54'S e 32°25'W), distrito do estado de Pernambuco, localizado a 545 Km do município do Recife, no oceano Atlântico. A área foi selecionada, a princípio, por representar um ambiente insular, característica que favorece a avaliação da técnica, pois o oceano atua como barreira geográfica natural, que reduz os efeitos de migração na área de estudo. O arquipélago está composto por 21 ilhas, ilhotas ou rochedos, perfazendo uma área total de 26 km<sup>2</sup>.

O estudo foi realizado na ilha principal, que leva o nome do arquipélago, Fernando de Noronha, a qual representa cerca de 90% de seu território e é a única ilha habitada. O acesso à ilha é feito por via aérea, a partir das cidades de Recife-PE ou Natal-RN, ou por via marítima (WILDEN; FERREIRA, 2011). O clima é tropical quente, com duas estações bem definidas, a chuvosa, com precipitações de fevereiro a agosto e a seca, que corresponde aos meses de setembro a janeiro. A temperatura pode variar de 24 a 31 °C, com umidade relativa de 81% e índice pluviométrico médio anual de aproximadamente 1.300 mm (REGIS et al., 2014).

A superfície da ilha é de 17,017 km<sup>2</sup> e está subdividida em 15 vilas: Estrada Velha do Sueste, DPV, Coréia, Sueste, Quixaba, Basinha, Boldró, Três Paus, Vacaria, Floresta Nova, Floresta Velha, Vila dos Remédios, Vila do Trinta, Praia da Conceição e Porto (Figura 8). A população residente estimada em 2017 é de aproximadamente 3.016 habitantes (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/fernando-de-noronha/panorama>). Trata-se de um dos pontos turísticos mais visitados em Pernambuco, chegando a receber anualmente mais de 60.000 turistas (REGIS et al., 2014).

O Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), ligado ao Ministério do Meio Ambiente, é o órgão responsável pela gestão e proteção dos recursos naturais do arquipélago, o qual está inserido integralmente nas áreas do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha desde 1988, e é classificado como uma Área de Proteção Ambiental (APA).

**Figura 8 - Esquema da distribuição das vilas na Ilha de Fernando de Noronha/PE.**



Fonte: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. I Gerência Regional de Saúde. Distrito de Fernando de Noronha.

A vigilância entomológica do mosquito *Aedes aegypti* em Fernando de Noronha, desde 2011, é realizada tanto pelo levantamento de índices baseados na pesquisa larvária, como preconizado pelo PNCD, quanto pelos estimados pela presença e quantidade de ovos do mosquito, através de armadilhas de oviposição. O Sistema de Monitoramento e Controle Populacional do *Aedes aegypti* (SMCP-*Aedes*) está representado por uma rede de 103 armadilhas de oviposição sentinelas (OVT-S), instaladas em pontos fixos como referido em Regis et al. (2014), o qual permite acompanhar a flutuação da densidade populacional de *A. aegypti* na ilha como um todo e individualmente nas 15 vilas, através do registro do número de ovos coletados nas OVT-S.

A Vila da Praia da Conceição (VPC) foi selecionada como área piloto para a implantação da TIE. Esta área possui dois hectares, 23 imóveis, perfazendo uma densidade de 11,5 imóveis/ha, distribuídos de forma agrupada (Figura 9). A VPC está flanqueada em um dos lados pelo oceano e no outro por uma faixa de vegetação ( $\cong$  200 m) que faz intersecção com a Vila da Floresta Velha.



Nas extremidades a VPC entra em contato com a vila dos Remédios e do Boldró e não apresenta contiguidade com as áreas do porto e aeroporto de Fernando de Noronha (Figura 9). De acordo com informações do SMCP-*Aedes* de 2014 apresenta um nível de infestação dos imóveis pelo mosquito  $\geq 60\%$ , com uma densidade anual  $\geq 70$  ovos/Ovt-S.

A Vila do Trinta, adotada como área controle para a avaliação da TIE, tem 29 ha, onde estão distribuídos 223 imóveis, perfazendo uma densidade de 7,7 imóveis/há um pouco menor do que a da VPC, embora represente uma das quatro vilas mais povoadas da ilha, também flanqueada pelas vilas da Floresta Velha e Remédios e sem contiguidade com o porto e o aeroporto. Os índices de infestação nesta vila são similares aos da VPC, como pode ser observado na figura 18, sobretudo em e 2104.

### 3.2 ESTABELECIMENTO DA SUBPOPULAÇÃO DE *Aedes aegypti* DA VILA DA PRAIA DA CONCEIÇÃO

Uma subpopulação de *Aedes aegypti* representativa da ilha de Fernando de Noronha, mais especificamente da Vila da Praia da Conceição, *Aedes*-VPC, foi estabelecida em laboratório para ser utilizada na aplicação da Técnica do Inseto Estéril em campo. A escolha desta população partiu do pressuposto que o seu *background* genético conferia vantagens adaptativas em relação às condições ambientais da Ilha comparado ao de uma colônia mantida em laboratório há anos. Entretanto, para seu uso efetivo se fez necessária à investigação do seu *fitness*, uma vez que um dos requisitos desejáveis para a TIE é ausência ou presença reduzida de custos biológicos, além daqueles condicionados ao processo de esterilização.

Amostras de ovos da VPC foram coletadas em 25 ovitrampas modelo descrito em Regis et al. (2008). As ovitrampas foram instaladas durante uma semana nas áreas peridomiciliares dos imóveis da VPC, em setembro de 2014. Os ovos foram contados antes de serem submetidos à eclosão larvária em laboratório. A eclosão teve início com a submersão das palhetas em água potável à temperatura ambiente, após seu processo de fervura para a redução do teor de oxigênio dissolvido, considerado um estímulo à eclosão sincrônica das larvas, tal como descrito em Carvalho et al. (2014). As larvas de primeiro estágio (L1) foram removidas e contadas, para determinar o percentual de eclosão, ou seja,

a viabilidade, e transferidas para cubas plásticas de criação contendo água potável e ração para gatos (Whiskas®) autoclavada e macerada.

Ao final do desenvolvimento, as pupas, machos e fêmeas, foram separadas e transferidas para gaiolas de alumínio teladas até a emergência dos mosquitos para verificação e triagem da espécie-alvo e o estabelecimento da subpopulação parental *Aedes-VPC*. Esta subpopulação foi composta por mais de 1.500 indivíduos (machos e fêmeas) e passou a ser alimentada, continuamente, com uma solução de sacarose a 10%, e, adicionalmente, foram oferecidos repastos sanguíneos semanais às fêmeas, com sangue de coelho desfibrinado, em sistema artificial de alimentação, para obtenção das progênes (GUEDES et al., 2017).

Para a coleta das gerações filiais, foram colocados recipientes contendo água e papel de filtro umedecido como substrato para a oviposição, trocados semanalmente. Após o período de embriogênese, os ovos foram submetidos à dessecação e armazenados por até três meses consecutivos, até a sua utilização para a produção em maior escala de machos estéreis. Os indivíduos foram mantidos em salas climatizadas com condições controladas de temperatura ( $26\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ), umidade relativa ( $85 \pm 10\%$ ), fotoperíodo de 12:12 horas (claro: escuro). Ao longo do estudo foram utilizados indivíduos das primeiras três gerações filiais ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $F_3$ ).

### **3.2.1. Avaliação da susceptibilidade da subpopulação *Aedes-VPC* aos Piretróides**

Após o estabelecimento da subpopulação *Aedes-VPC* seu status de susceptibilidade aos inseticidas da classe dos piretróides foi avaliado, uma vez que Araújo et al. (2013) reportou que a população de Fernando de Noronha, em 2011, estava resistente à cipermetrina, um dos inseticidas adulticidas mais utilizados no âmbito de PNCD, embora seu uso por este Programa não tenha ocorrido na Ilha, por ser uma APA. De acordo com Lima e colaboradores (2011) piretróides são frequentemente encontrados na composição dos sprays inseticidas vendidos em supermercados e utilizados pela população (LIMA et al., 2003).

A colônia *Aedes aegypti*-Rockefeller foi utilizada nos ensaios como referência mundial de susceptibilidade aos inseticidas químicos. Esta colônia tem sido mantida no

Insetário do Departamento de Entomologia (CPqAM/FIOCRUZ) há mais de 10 anos (MELO-SANTOS et al., 2010)

Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde (1998), com papéis-filtro (Whatman® N° 1), 15 X 12 cm, impregnados com a dose diagnóstica (DD) dos inseticidas: cipermetrina (Sigma, código: SZBC047XV), na concentração de 146 mg i.a./m<sup>2</sup> (0,4%); deltametrina (Sigma, código: SZBC059XV), 18 mg i.a./m<sup>2</sup> (0,05%) e lambda-cialotrina (Sigma, código: SZBB332XV), 19,4 mg i.a./m<sup>2</sup> (0,05%). O clorofórmio foi utilizado como solvente dos inseticidas e o óleo mineral como agente de dispersão do composto para impregnação nos papéis. Os papeis impregnados com os inseticidas foram produzidos na SUCEM/Marília-SP e gentilmente cedidos para este estudo.

Neste ensaio foram utilizadas fêmeas da Rockefeller e da *Aedes-VPC*, não alimentadas com sangue, com três a cinco dias de idade. Estas fêmeas foram inicialmente aclimatadas por 60 minutos em tubos de acrílico (kit WHO) de recuperação. Após esse procedimento, 20 a 25 fêmeas foram transferidas para tubos de exposição (quatro réplicas por inseticida) além do tubo controle (duas réplicas), contendo apenas o papel impregnado com o óleo mineral. Os testes foram repetidos três vezes por população de mosquito.

Inicialmente, a mortalidade das fêmeas Rockefeller à DD de cada inseticida foi inferida a cada três minutos, durante 30 a 60 minutos consecutivos de exposição, com o objetivo de definir o tempo necessário para promover 100% de mortalidade dos indivíduos susceptíveis. Para a população de campo a exposição aos inseticidas foi acompanhada por até 120 minutos, com registro da mortalidade a cada 15 minutos. Após este período todas as fêmeas foram transferidas para o tubo de recuperação, com o papel filtro sem o inseticida, para que após 24 horas da realização do teste, fosse registrada a mortalidade final, classificando os indivíduos capazes de voar como resistentes e os mortos ou moribundos como susceptíveis, excluindo assim o efeito *knockdown resistance* (MARTINS et al., 2009; 2012). A população seria classificada como “resistente” quando < 80% das fêmeas morressem e “susceptível” quando ≥ 98% delas morressem, após o período de 24 horas. Os ensaios para cada inseticida foram repetidos em três momentos distintos seguindo a metodologia de Brogdon e McAllister (1998b) e Da Cunha et al. (2005). Os resultados encontrados foram comparados aos observados para a Rockefeller.

### 3.2.2 Ensaio da atividade das Glutathione S-Transferase

Como parte complementar da avaliação do perfil de susceptibilidade da subpopulação *Aedes*-VPC aos piretróides foi realizado o teste para determinar a atividade das enzimas glutathione S-transferases (GST), relacionadas com a resistência metabólica a estes inseticidas, as quais também se mostraram alteradas na avaliação de Araújo et al. (2013). Considerando que a atividade de tais enzimas também pode ser modificada em função da exposição à radiação ionizante de  $^{60}\text{Co}$ , o teste enzimático foi realizado com fêmeas e machos, cujas pupas foram expostas as doses de 40 e 50 Gy, além dos indivíduos não expostos.

Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde, com modificações (BRASIL, 2006). Os insetos selecionados foram provenientes da terceira geração filial ( $F_3$ ) da *Aedes*-VPC. Foram avaliados mosquitos adultos, machos e fêmeas, com um dia de idade, alimentados apenas com solução de sacarose a 10%. Os indivíduos foram anestesiados por resfriamento, separados por sexo, acondicionados em grupos de 45 mosquitos em microtubos e armazenados a ( $-80^\circ\text{C}$ ) até o ensaio. A atividade das GSTs foi avaliada utilizando os substratos 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) e L-glutathione reduzida (GSH). A quantificação de proteínas totais das amostras foi feita com o Reagente Biorad protein assay (Biorad) usando uma curva padrão de albumina do soro bovino.

Amostras individuais de fêmeas ou de machos foram maceradas e os homogenatos distribuídos em microplacas de 96 poços com os reagentes específicos para a detecção enzimática. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro com leitor de microplacas (ELX808/Biosystem), utilizando 340 nm (GST).

O perfil enzimático da subpopulação *Aedes*-VPC foi classificado de acordo com o percentual de indivíduos que apresentava atividade superior ao percentil 99 de Rockefeller para a enzima. A população foi classificada como “inalterada” (I), quando menos de 15% dos indivíduos mostrassem alteração na atividade GST; “alterada” (A), para 15% a 50%; ou “muito alterada” (MA), quando superior a 50% (BRASIL, 2006). Para a análise do perfil populacional foi utilizado o programa GEN 5 e o GraphPad Prism 4.

### 3.2.3 Produção massal de *Aedes*-VPC em pequena escala

A produção massal da subpopulação de campo *Aedes*-VPC foi realizada no Insetário do Departamento de Entomologia/Instituto Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE), a partir da padronização do desenvolvimento das formas jovens.

Para avaliar os parâmetros de criação e obtenção das pupas-macho com qualidade os seguintes intervalos de densidade foram testados: 400 - 600 larvas/cuba e 601 - 1000 larvas/cuba. As cubas de criação eram recipientes em plástico, medindo 34 x 23 x 7 cm, contendo 2 litros de água potável, dispostas em estantes (Figura 10), em salas com condições controladas de temperatura e fotoperíodo, segundo descrito no item 3.2. As larvas foram alimentadas com 297 mg/cuba/dia de ração para gatos, da marca Whiskas®, esterilizada, triturada e distribuída de forma homogênea na superfície da água. A duração do período de desenvolvimento das larvas e pupas, o peso das pupas, bem como a proporção de machos e fêmeas observados em cada densidade foram avaliadas para as duas condições de densidades testadas.

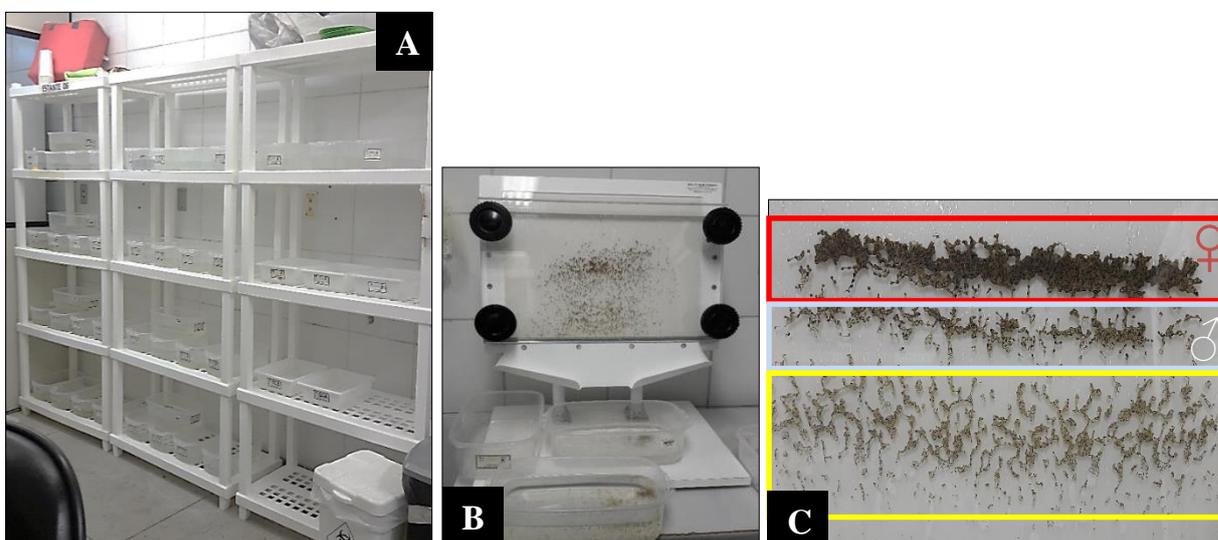
A sexagem foi realizada por meio de um separador mecânico de larvas e pupas (John W. Hock®, modelo 5412), aparelho composto por duas placas de vidro superpostas e dotadas de um sistema de prensa para ajustar o espaço entre as mesmas, e permitir a separação das pupas por tamanho. O uso deste equipamento leva à separação de um grande número de pupas em faixas, sendo a primeira predominantemente de pupas maiores e fêmeas (maior tamanho), a segunda de pupas machos e/ou fêmeas (menor tamanho) e a terceira de larvas (L3 e L4). A separação dos diferentes grupos foi feita com um fluxo de água na parte superior do vidro, e os exemplares foram recuperados em uma cuba de criação adaptada à parte inferior do aparato (Figura 10B). Para padronizar o processo de esterilização as pupas-macho com idade entre seis e 24 horas foram recolhidas de todas as cubas diariamente, após o início da pupação.

### 3.2.4 Irradiação de *Aedes*-VPC utilizando radiação gama ( $\text{Co}^{60}$ )

Após a triagem por sexo, as pupas-macho foram transferidas em grupos de até 500 indivíduos para placas de Petri (90 x 15 mm) revestidas com papel toalha umedecido (Figura

11A), para garantir o contato com a umidade e ao mesmo tempo reduzir a mobilidade das pupas durante a irradiação. As placas com as pupas foram transportadas em caixa de isopor até o Departamento de Energia Nuclear/UFPE (DEN/UFPE). As amostras foram imediatamente levadas para o irradiador Gammacell de  $\text{Co}^{60}$ , modelo 220 Excel-MDS Nordion (Figura 11B), para exposição.

**Figura 10: Processos de criação massiva, triagem e sexagem de larvas e pupas da subpopulação de campo de *Aedes aegypti* proveniente da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE. A) Cubas de criação de larvas em estantes; B) Separador de pupas de mosquitos, aparelho composto por placas de vidro superpostas e um sistema de prensas para ajuste da distância entre elas; C) Padrão de separação das pupas por tamanho em diferentes faixas, sendo a 1ª de fêmeas maiores, a 2ª de machos e fêmeas menores e a 3ª de larvas.**



Fonte: Do autor.

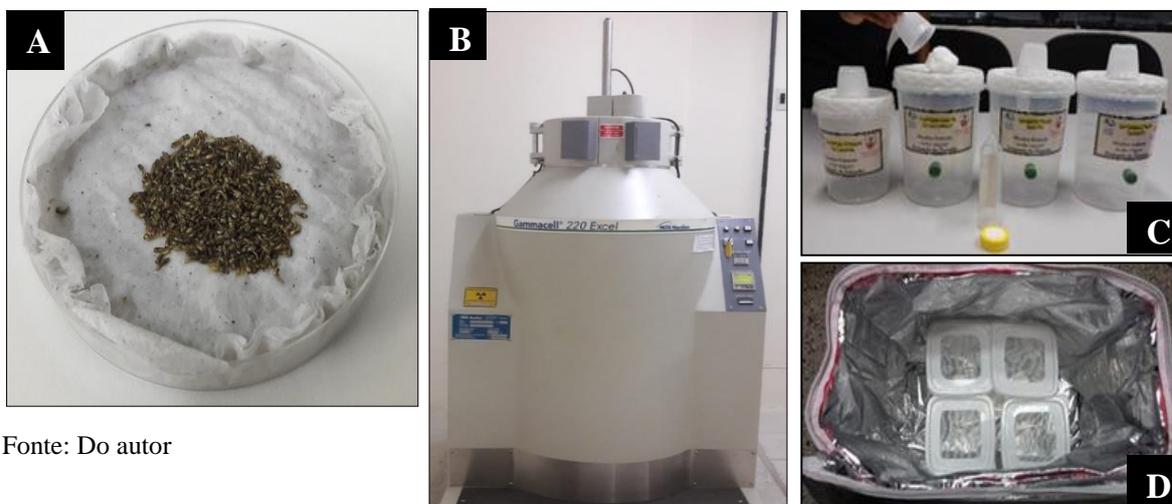
A partir de informações sobre as doses mais efetivas para a esterilização de machos de *A. aegypti* da colônia Recife-Laboratório (RecL), bem como a melhor proporção entre machos não irradiados (MNI) e machos estéreis (ME), obtidas por Lima (2015), as doses de 40 e 50 Gy de  $^{60}\text{Co}$  foram adotadas para a esterilização dos machos da subpopulação *Aedes*-VPC, em taxas de dose do irradiador em diferentes períodos.

Após a irradiação, as pupas-macho eram trazidas para o insetário, transferidas para recipientes com água e mantidas em gaiolas até a passagem para a fase adulta. Solução de sacarose a 10% era disponibilizada na gaiola de contenção para alimentação *ad libitum* dos machos estéreis (ME), até quando eram transferidos para os recipientes plásticos e bolsas térmicas (Figura 11C e D), adaptados ao traslado aéreo até a ilha uma vez por semana.

Para o transporte dos mosquitos por via aérea foi firmada uma colaboração com as empresas Azul e GOL, após a disponibilização de um documento esclarecendo riscos e

responsabilidades assumidos pelo IAM/Fiocruz-PE sobre o envio dos machos estéreis de *A. aegypti* para a Ilha de Fernando de Noronha, em concordância com a Gerencia de Saúde do Distrito de Fernando de Noronha.

**Figura 11: Processo de irradiação de *Aedes aegypti* proveniente da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE. A) Pupas acondicionadas em placa de Petri de polietileno para exposição à radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ ; B) Irradiador do tipo Gammacell  $^{60}\text{Co}$ , modelo 220 Excel-MDS Nordion, onde as amostras foram irradiadas; C) Transporte de mosquitos irradiados para a soltura na Praia da Conceição/ Fernando de Noronha. Foram colocados em recipientes plásticos e mantidos em bolsa térmica (D).**



Fonte: Do autor

### 3.2.5 Teste em condições Simuladas de Campo (TCS) para avaliar o desempenho dos machos *Aedes*-VPC irradiados

A competitividade reprodutiva dos ME *Aedes*-VPC antes da soltura em campo foi verificada em testes sob condições simuladas de campo (TCS), seguindo a metodologia descrita por Lima (2015), que visa basicamente avaliar o percentual de inviabilidade da progênie resultante do acasalamento de machos estéreis (ME) e dos machos selvagens (MS) com fêmeas selvagens (FS) da mesma subpopulação. Os testes ocorreram em um compartimento telado de grandes dimensões (2 x 2 metros), denominado gaiola-TCS (Figura 12A), localizada na área externa do IAM/Fiocruz-PE, em local protegido da chuva. Para cada um dos três testes realizados com as duas doses 40 e 50 Gys foram liberados na gaiola-TCS grupos de mosquitos seguindo a proporção de 10ME:1MS:1FS, em números reais 500ME: 50MS: 50FS. Uma fonte de carboidrato (solução açucarada a 10%) foi

disponibilizada na gaiola durante um período de 10 dias de avaliação, tal como referido por Lima (2015).

Três parâmetros foram analisados após cada soltura na gaiola-TCS: 1) o percentual de mosquitos adultos, machos e fêmeas, sobreviventes; 2) a fecundidade, estimada pelo número de ovos para um grupo de 50 fêmeas, após um único repasto sanguíneo e 3) a fertilidade/viabilidade de ovos, estimada pelo número de L1 obtido a partir dos ovos coletados em cada teste.

Quatro ovitrampas (Figura 12B) foram inseridas na Gaiola-TCS a 1 m do solo, para a coleta de ovos durante o período de avaliação. Após 10 dias da soltura, os mosquitos sobreviventes presentes na gaiola foram capturados com aspirador manual com bateria (modelo: Horst® 34) (Figura 12 C) e armazenados para sexagem e contagem. O número de ovos presentes nas palhetas foi registrado e categorizado em íntegro e aberto. Depois desta primeira contagem, as palhetas foram submersas em água tal como descrito no item 3.2 para promover a eclosão das larvas provenientes dos ovos ainda íntegros, com o intuito de verificar o percentual final de eclosão. Os registros de temperatura, umidade relativa do ar e pluviometria realizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), na Estação Curado em Recife, Pernambuco, Brasil, foram usados neste estudo.

### 3.3 TESTE PILOTO DE CAMPO: NÍVEL DE INFESTAÇÃO POR *A. aegypti* EM FERNANDO DE NORONHA

Para estimar a quantidade de machos estéreis por soltura foi necessário inicialmente avaliar a densidade de ovos da população selvagem de *A. aegypti* na Ilha como um todo, e em particular na Vila da Praia da Conceição, localidade selecionada para a implantação da TIE.

**Figura 12: Instalações e instrumentos utilizados nos Testes sob Condições Simuladas no Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE; (A) gaiola em madeira e tela (2 x 2 metros); (B) ovitrampas usadas para a coleta de ovos de *A. aegypti*; (C) aspirador manual para recaptura dos mosquitos adultos.**



Fonte: Do autor. Fig. C fonte: <http://www.horstarmadilhas.com.br/>

Assim, a distribuição espaço-temporal da população local foi acompanhada nos anos de 2014, 2015 e 2016 através dos índices entomológicos estimados pelo SMCP-*Aedes*, sistema de monitoramento composto por uma rede de 103 armadilhas sentinelas (Ovitrampas-sentinelas/Ovt-S), distribuídas nas 15 vilas da ilha, tal como descrito em Regis et al. (2014).

Os seguintes índices foram estimados: Positividade de Ovitrampas (IPO), o qual reflete o percentual de Ovt-S positiva a cada ciclo de 30 dias, e corresponde a distribuição espacial do mosquito; Número Médio de Ovos/OVT-S (NMO), o qual revela a densidade populacional da espécie e a intensidade da infestação em cada vila.

Para verificar a eficácia e a efetividade de controle promovidos pelo uso dos ME foram estimados a porcentagem de inviabilidade dos ovos (PIO) para cada área, a porcentagem de diminuição da densidade de ovos (D) e a inviabilidade induzida de ovos (I), calculados respectivamente pelas equações abaixo (BELLINI et al., 2013):

$$PIO = (NO_I / NO_T) * 100 \quad \text{Eq. (01)}$$

$$D = (NMO_{TIE} - NMO_{CON}) / NMO_{CON} \quad \text{Eq. (02)}$$

$$I = \{1 - [(NO_{VTIE}/NMO_{TIE}) * (NMO_{CON}/NO_{VCON})]\} * 100 \quad \text{Eq. (03)}$$

Onde  $NO_I$  é o número de ovos íntegros;  $NO_T$  é o número total de ovos;  $NMO_{TIE}$  e  $NMO_{CON}$  são o número médio de ovos da área TIE e da área controle, respectivamente e o  $NO_{VTIE}$  e  $NO_{VCON}$  que correspondem ao número médio de ovos viáveis da área TIE e da

área controle, respectivamente. De um modo geral, o procedimento consistiu na contagem dos ovos abertos ou viáveis que correspondiam aqueles cujas larvas eclodiram ainda em campo somados àqueles cuja eclosão foi induzida em laboratório, além dos ovos que permaneceram íntegros, tal como referido no item 3.2, perfazendo assim o total de ovos coletado/Ovt-S/mês. Os índices foram estimados para a VPC (Área-TIE) e para a Vila do Trinta (Área-Controle), onde estavam instaladas 05 e 10 Ovt-S monitoradas pelo SMCP-*Aedes*, respectivamente, além de mais 10 ovitrampas na VPC para estimar o PIO.

### **3.3.1 Teste Piloto: liberação de machos estéreis em campo real (VPC)**

Antes do processo de liberação dos machos estéreis na Vila da Praia da Conceição as autoridades da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco e do Distrito de Fernando de Noronha, do ICMBio, do Conselho de Saúde da ilha e os cidadãos da vila, foram informadas sobre o projeto, seus objetivos, benefícios e riscos, através de documentos, palestras, reuniões e comunicação via rádio e televisão. Panfletos explicativos também foram distribuídos para a comunidade local, em visitas domiciliares, com o intuito de prestar os esclarecimentos necessários sobre os mosquitos esterilizados por radiação gama quanto a: 1) inexistência de riscos de contaminação ambiental por radiação; 2) autolimitação da técnica e a necessidade da liberação semanal contínua dos ME para a obtenção de resultados de controle; 3) diferença entre ME e mosquitos transgênicos e 4) a possibilidade de liberação de um pequeno número de fêmeas do mosquito, também estéreis, durante as solturas dos machos e de sua implicação na transmissão de arboviroses como dengue, zika e chikungunya na Ilha.

O número inicial de machos estéreis por soltura foi calculado a partir do número médio de ovos coletados pelas Ovt-S nos meses de setembro, outubro e novembro de 2015 na VPC X a probabilidade do embrião ser um macho X o número de imóveis X 10 (correspondente a proporção desejada de ME:MS 10:01). De acordo com tais valores foi estimada a soltura de aproximadamente 3.000 ME/semana, para o mês de dezembro de 2015 e valores iguais ou superiores nos meses seguintes. Outros modelos já descritos na literatura, como Carrieri et al. (2011), consideram também o número de machos adultos coletados por armadilhas ou aspiração.

O processo de liberação dos machos estéreis na Ilha teve início em dezembro de 2015 e envolveu dois esquemas de liberação, o primeiro utilizando ME esterilizados com 40 Gy, por 16 eventos consecutivos, no período de dezembro/2015 a março/2016 e o segundo com ME esterilizados com 50 Gy de abril a dezembro de 2016. O quantitativo de ME/liberação aumentou em alguns momentos em função do período de chuvas, quando é esperado um aumento natural na densidade populacional do mosquito na área de estudo (REGIS et al., 2014). Na VPC foram estabelecidos quatro pontos de soltura dos ME, todos próximos às áreas peridomiciliares dos imóveis. Os mosquitos eram liberados nestas áreas quase sempre no mesmo dia em que chegavam à Ilha, no período da tarde. Frequentemente os ME liberados na Ilha tinham de três a cinco dias de idade.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como valores de média e desvio padrão e como valores de frequência. Para testar as diferenças entre as médias utilizou o teste t-Student. Para a análise das variâncias dos dados, foi utilizado teste ANOVA, seguida de teste de Tukey. Para avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Lilliefors. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando um nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes*-VPC AOS INSETICIDAS PIRETRÓIDES

Os valores de tempo letal (TL<sub>95</sub>) estimados para as doses diagnósticas dos piretróides analisados demonstram que a população *Aedes*-VPC está susceptível a estes compostos e, que todas as fêmeas expostas morreram com menos de 30 minutos de exposição aos inseticidas (Tabela 3).

**Tabela 3 - Toxicidade de diferentes inseticidas da classe dos piretroides para fêmeas de *Aedes aegypti* provenientes da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE e da linhagem Rockefeller, estimada pelo Tempo letal para 95% (TL<sub>95</sub>) dos indivíduos expostos às doses diagnósticas dos diferentes inseticidas.**

População	Tempo letal 95% (TL <sub>95</sub> ) em minutos (Intervalo de Confiança 95%)		
	Cipermetrina	Deltametrina	Lambda-cialotrina
Rockefeller	26,2 (25,2 - 27,4)	18,6 (17,9 - 19,5)	14,2 (13,7 - 15,2)
<i>Aedes</i> -VPC	17,8 (16,5 - 19,1)	21,6 (20,7 - 22,6)	15,2 (14,5 - 16,1)

Legenda: N= número de fêmeas avaliadas; TL<sub>95</sub>: Tempo letal para 95% das fêmeas adultas expostas.

### 4.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTATIONA S-TRANSFERASES EM *Aedes*-VPC

Os ensaios bioquímicos revelaram modificações no perfil de atividade das GST para as fêmeas da população *Aedes*-VPC quando comparadas a Rockefeller, as quais classificaram essa população de campo como muito alterada, uma vez que mais de 50% dos mosquitos testados apresentaram valores acima do percentil 99 de Rockefeller. Este percentual foi ainda maior (71%) quando as fêmeas foram irradiadas ainda em sua fase de pupa (Tabela 4). Um comportamento similar foi observado para os machos, o que revela que à exposição à dose de 50 Gy de radiação gama induziu alteração destas enzimas nos indivíduos *Aedes*-VPC, independente do sexo.

**Tabela 4 - Atividade das Glutathione S-Transferase (GST) em adultos, fêmeas (F) e machos (M) da população de *Aedes aegypti* da Vila da Praia da Conceição, Fernando de Noronha/PE, em sua terceira geração filial (F3), expostos ou não à radiação gama.**

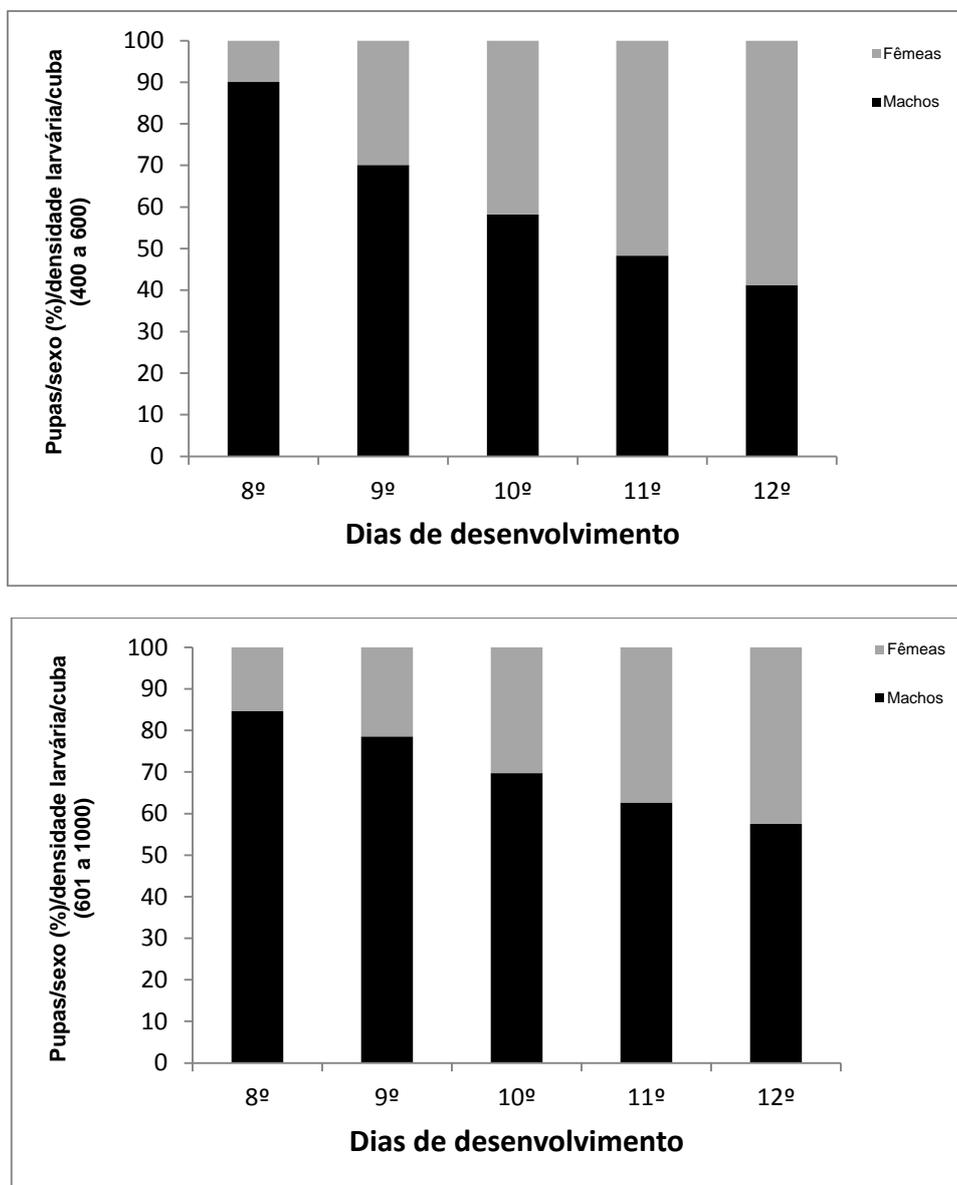
Grupo	Glutathione S-transferase (GST) (mmol/mg ptn/min)			Classificação
	N adultos	p99	% >p99 <sup>1</sup>	
Rockefeller (F)	166	2,2	-	-
<i>Aedes</i> -VPC- NI (F)	90	4,1	54	MA
<i>Aedes</i> -VPC – I (F)	140	3,7	71	MA
<i>Aedes</i> -VPC – NI (M)	135	3,2	35	A
<i>Aedes</i> -VPC – I (M)	132	3,9	52	MA

<sup>1</sup>Número de indivíduos testados; <sup>2</sup>p99 = Percentil 99 para as populações; % > Taxa da população com atividade superior ao Percentil 99 de Rockefeller; *Aedes*-VPC-NI= indivíduos não irradiados; *Aedes*-VPC-I = indivíduos irradiados; M= macho e F= fêmea.

#### 4.3 PRODUÇÃO MASSAL DE MOSQUITOS DA VILA DA PRAIA DA CONCEIÇÃO (VPC)

Para a densidade mais baixa, cada cuba de criação continha em média  $545,0 \pm 52,2$  larvas/cuba e para a mais alta  $740,8 \pm 96,7$  larvas/cuba. A sobrevivência dos indivíduos até a fase de pupa foi de 89,1% e de 76,9% na menor e maior densidade, respectivamente, mantendo a proporção de 1:1 (macho:fêmea). O aumento da densidade larval nas cubas gerou uma pequena diminuição do peso das pupas, cujos valores médios para os machos decaíram de  $0,0022 \pm 0,0008$  para  $0,0019 \pm 0,0004$  e para as fêmeas de  $0,0033 \pm 0,0008$  para  $0,00296 \pm 0,0008$ , entretanto, os mesmos não diferiram estatisticamente. Em ambas as situações, as primeiras pupas foram encontradas oito dias após a eclosão das L<sub>1</sub>, cuja frequência relativa de sexo diferiu entre as densidades (Figura 13A). Até o 12º dia do desenvolvimento foi recuperado cerca de 90% das pupas-machos na densidade mais baixa, enquanto para a densidade mais alta este valor foi de 63,3%. Portanto, o aumento na densidade larval prolongou o tempo necessário para obtenção da maioria dos machos, aspecto importante para a logística de produção na criação massal (Figura 13).

**Figura 13 - Proporção de pupas-machos e pupas-fêmeas de *Aedes aegypti* da subpopulação de campo da Vila da Praia da Conceição/Fernando de Noronha/PE, observada em diferentes densidades larvais, em laboratório.**



Fonte: Do autor

No período de dezembro/2015 a dezembro/2016 foram produzidos e liberados 233.767 machos estéreis, em 52 eventos de soltura (Tabela 5). Estima-se que cerca de 1% destes indivíduos eram fêmeas de pequeno tamanho, as quais corresponderam ao erro de separação mecânica do aparelho. Apesar disso, todas as fêmeas irradiadas com 40 ou 50 Gy também eram estéreis e não produziam ovos, mesmo quando alimentadas com sangue, corroborando os achados de Lima (2015). Tomando por base a proporção natural de machos e fêmeas dos mosquitos de 1:1 e que na densidade de 601-1000 larvas/cuba apenas 63% das pupas, independente do sexo, era recuperado a cada semana, aproximadamente 25 cubas

eram abertas para garantir uma produção mínima de 4.000 machos/semana. As pupas-machos eram encaminhadas para a esterilização com idade entre seis e 24 horas de passagem para esta fase, portanto, o procedimento de triagem para a esterilização era iniciado no 8º dia e finalizado no 12º dia de desenvolvimento das formas jovens.

#### 4.4 COMPETITIVIDADE DE ACASALAMENTO *Aedes*-VPC: ESTÉREIS X SELVAGENS

Nos experimentos com o grupo controle apenas 8,0% dos ovos provenientes do acasalamento das fêmeas selvagens com os machos selvagens (MS), ou seja, aqueles que não foram submetidos ao processo de irradiação para a esterilização, as larvas não eclodiram, sugerindo que os mesmos não estavam embrionados. No entanto, nos experimentos utilizando os machos-VPC esterilizados com 40 Gy ou 50 Gy, na proporção de 10:1 (ME:MS), cerca de 80% dos ovos produzidos por diferentes fêmeas estavam inviáveis (Tabela 5).

A análise revelou, como esperado, que a inviabilidade dos ovos do grupo controle foi estatisticamente menor do que a dos grupos tratados com 40 Gy ( $\chi^2= 59,542$ , p-valor < 0,0001) e 50 Gy ( $\chi^2= 63,587$ , p-valor < 0,0001). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos de 40 e 50 Gy ( $\chi^2= 0,221$ , p-valor = 0,9742). Ao término do ensaio na gaiola-TCS, com duração de 15 dias, foi observado que pouco mais de 20% dos machos (estéreis ou não) sobreviveu, este resultado sugere uma redução de cerca de 80% no número de machos no período compreendido entre a emergência e a recaptura dos indivíduos por aspiração.

#### 4.5 DISTRIBUIÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE *Aedes aegypti* EM FERNANDO DE NORONHA

O monitoramento da infestação por *A. aegypti* na Ilha de Fernando de Noronha, realizado pelo SMCP-*Aedes* ao longo dos anos de 2015 e 2016, registrou a flutuação espaço-temporal da população do mosquito (Figura 14). É possível observar que os valores do IPO foram quase sempre maiores do que 70% e similares nos dois anos, exceto em fevereiro de 2015, quando foi menor do que 56%. Estes resultados revelam que o mosquito está amplamente distribuído nos espaços urbanizados da Ilha.

**Tabela 5: Experimentos de competitividade entre machos de *Aedes aegypti* da população de campo da Vila da Praia de Conceição/Fernando de Noronha/PE, estéreis (ME) e selvagens (MS), para o acasalamento com fêmeas em condições simuladas de campo.**

Proporção de mosquitos (N)	Número total		Ovos inviáveis (%)	Nº mosquitos Sobreviventes (%)	
	Ovos	Larvas		Machos	Fêmeas
1 MS: 1 FS (50 : 50)	19.637	18.138	7,6 <sup>A</sup>	123 (24,6)	22 (44)
10 ME <sub>40Gy</sub> : 1 MS: FS	2.291	523	77,2 <sup>B</sup>	159 (28,9)	27 (54)
(500 : 50 : 50)	3.096	722	76,7 <sup>B</sup>	183 (33,3)	32 (64)
10 ME <sub>50Gy</sub> : 1 MS: 1 FS	713	148	80,6 <sup>B</sup>	NA	NA
(500 : 50 : 50)	2414	448	81,4 <sup>B</sup>	112 (21,8)	19 (38)

Gy – Gray; ME- Macho estéril; ME-FN – Macho estéril-Fernando de Noronha; MS– Macho selvagem; FS – Fêmea selvagem. Valores seguidos da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). NA = não avaliado.

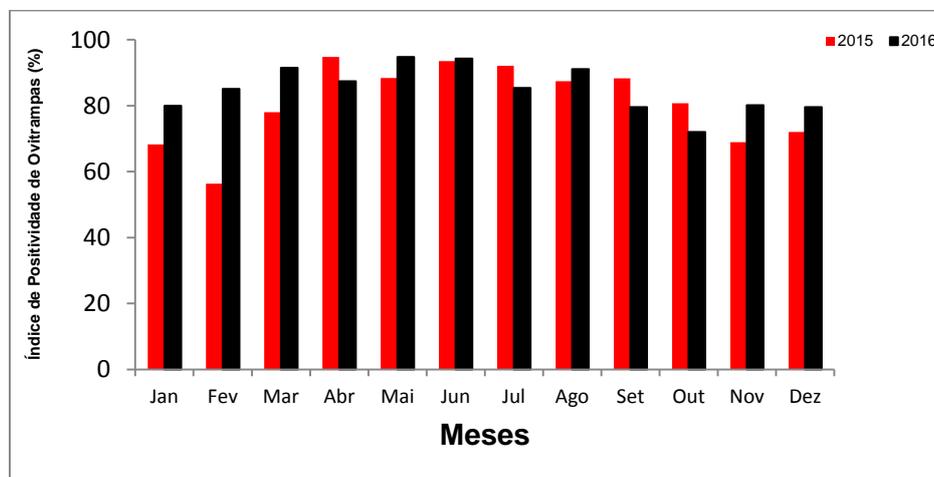
O número médio de ovos do mosquito em Fernando de Noronha variou mais em 2015 (40 a 150 ovos/Ovt-S/mês) do que em 2016 (64 a 85 ovos/Ovt-S/mês). Cruzando os resultados de densidade populacional de *A. aegypti* e de pluviometria é possível observar que alguns picos de crescimento populacional da espécie registrados no período mais chuvoso em 2015, não se reproduziram em 2016 (Figura 14). Neste contexto, é importante relatar que outras ações complementares para o controle do mosquito, além das já realizadas pelo PNCD, aconteceram na ilha. Entre elas, a remoção de 18 toneladas de resíduos sólidos,

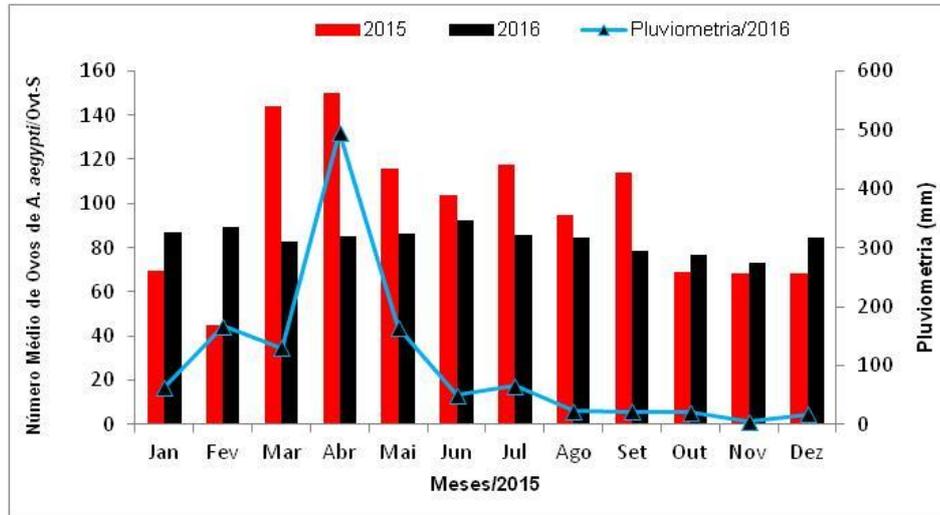
pela Secretaria de Saúde do Distrito de Fernando de Noronha/PE, de maio a junho de 2015, bem como, a aplicação espacial do biolavicida Bti (VectoBac®WG 500 g/hectar), mensalmente, nos espaços peridomiciliares das quatro vilas mais infestadas da ilha (Floresta Nova, Floresta Velha, Remédios e Trinta), e de forma esporádica nas demais vilas (dados não apresentados). As duas ações tinham por objetivo eliminar criadouros temporários do mosquito antes de iniciar a liberação de mosquitos estéreis.

A Figura 15 retrata a distribuição das chuvas em Fernando de Noronha de 2014 a 2016, na qual pode ser observado que o período de chuvas mais frequente na ilha parece ser de fevereiro a julho de cada ano, após o qual as mesmas cessam quase completamente.

Variações significativas entre as densidades populacionais do mosquito foram observadas entre as vilas, com destaque para cinco delas, Três Paus, Floresta Nova, Floresta Velha, Remédios e Trinta, cuja média de ovos foi  $\geq 100$  ovos/Ovt-S em 2015 na maioria dos meses e  $\leq 90$  ovos/Ovt-S em todos os meses de 2016.

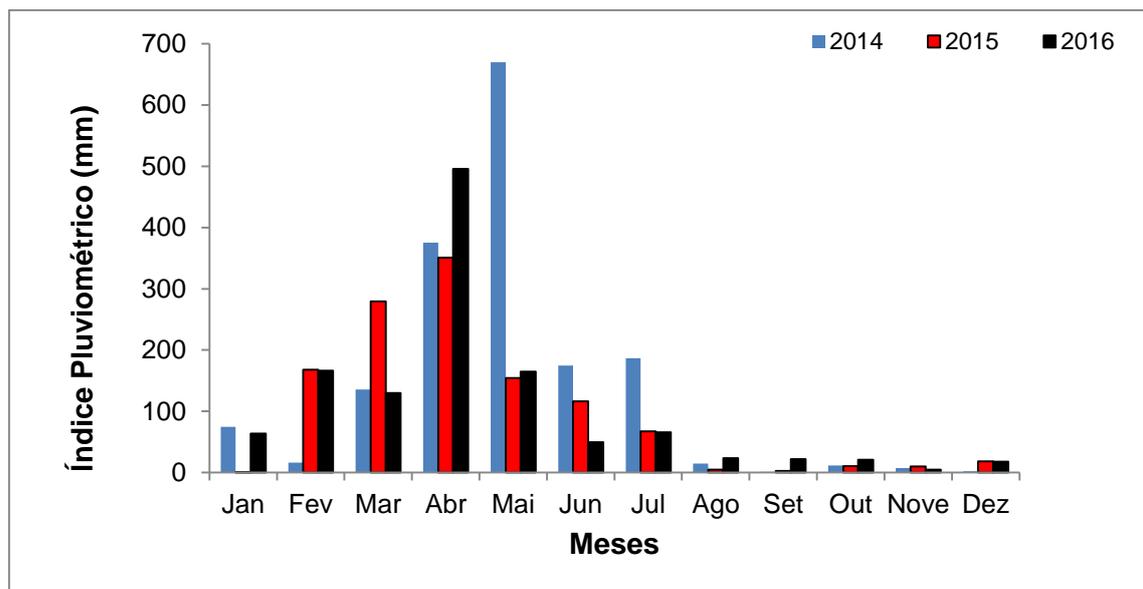
**Figura 14: Distribuição espaço-temporal e flutuação da densidade populacional de *Aedes aegypti* na Ilha de Fernando de Noronha/PE, estimada pela coleta de ovos do mosquito por 103 armadilhas, em 2015 e 2016.**





Fonte: Do autor

Figura 15: Índices pluviométricos observados na Ilha de Fernando de Noronha de 2014 a 2016.



Fonte: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. I Gerência Regional de Saúde. Distrito de Fernando de Noronha, 2016.

#### 4.6 IMPACTO DA LIBERAÇÃO DOS MACHOS ESTÉREIS *Aedes*-VPC SOBRE A DENSIDADE DE POPULACIONAL DE *A. aegypti* NA VILA DA PRAIA DA CONCEIÇÃO.

As primeiras 18 solturas de machos estéreis na VPC ocorreram no período de dezembro/2015 a abril/2016, totalizando 77.261 machos esterilizados com 40 Gy. Nas 33 solturas subsequentes os machos foram esterilizados com 50 Gy. Este esquema de uso de uma dose menor de radiação no início das liberações foi com o objetivo de potencializar a sobrevivência do ME em campo, uma vez que os estudos de Lima (2015) apontavam para uma redução da longevidade dos ME com a dose 50 Gy.

Na VPC e na vila do Trinta (área controle) o IPO em 2015 variou de 40% a 100% e 65% a 100%, respectivamente (Figura 16). Em 2016 esse padrão se modificou apenas para a VPC, cujos valores oscilaram de 25% a 86%. Os valores encontrados de agosto a novembro indicavam para uma tendência progressiva de diminuição, quando o IPO voltou a subir em dezembro/2016.

Uma redução também foi observada sobre a densidade de ovos de *A. aegypti* nas duas áreas no período de chuvas, contudo a diminuição foi mais pronunciada nos primeiros meses na vila do Trinta do que na VPC (Figura 17 e 18). Reduções significativas nos valores médios de ovos/Ovt-S na área VPC, comparando 2015 e 2016, foram observadas em janeiro ( $p < 0,0001$ ), maio ( $p = 0,0006$ ), junho ( $p = 0,0032$ ), julho ( $p = 0,0244$ ) e setembro ( $p = 0,0007$ ) (Tabela 7), enquanto na vila do Trinta foi em março ( $p = 0,0001$ ), abril ( $p = 0,036$ ), julho ( $p = 0,0011$ ) e setembro ( $p = 0,0001$ ). A aplicação espacial de Bti continuou a contecer no Trinta, em 2016, apenas nos pontos que acumulavam entulhos nas áreas peridomiciliares (Figura 5). Esta ação parece ter eliminado criadouros larvários produtivos, os quais seriam responsáveis pela produção de mosquitos adultos e o repovoamento da área.

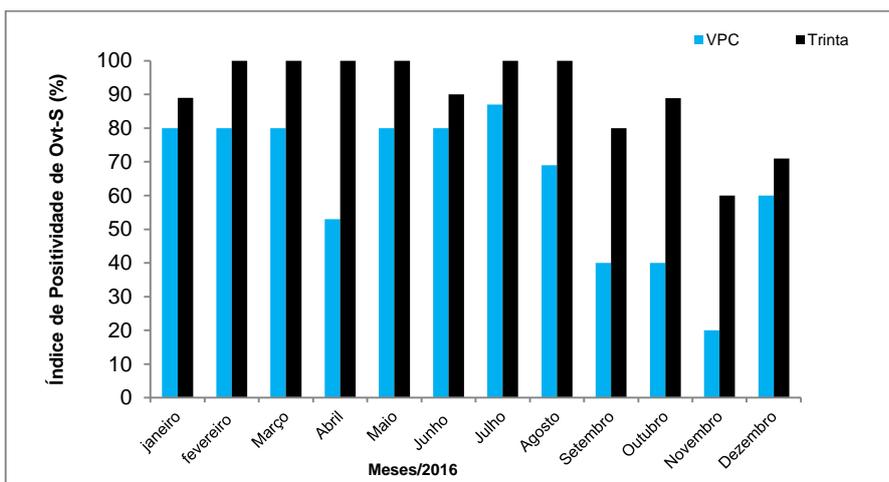
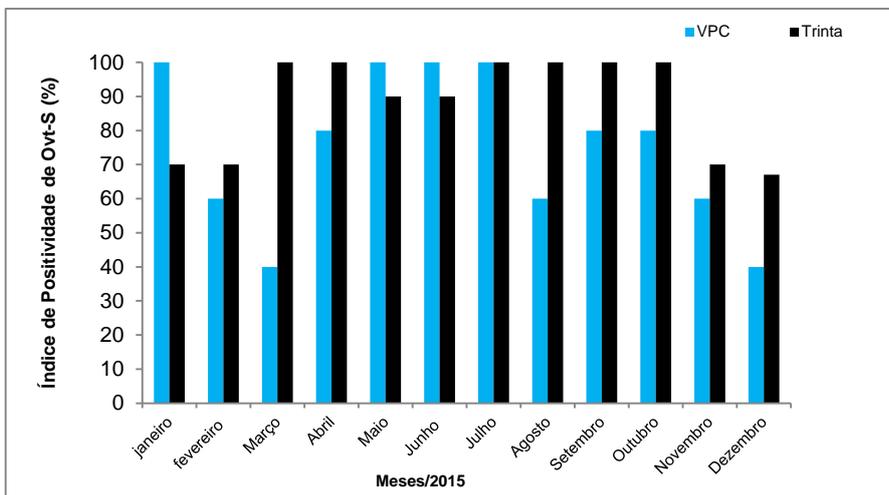
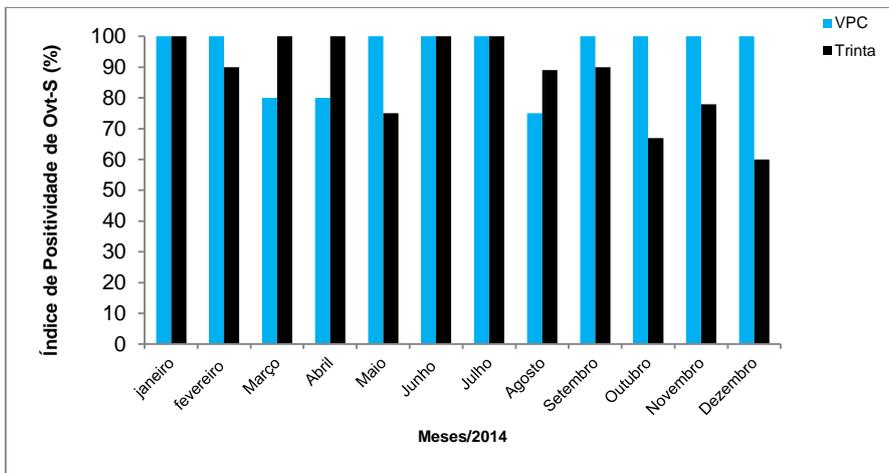
As figuras 16 e 17 demonstram as flutuações do IPO e da densidade de ovos de *A. aegypti* nas duas vilas de 2014 a 2016, nas quais se percebe um perfil de infestação maior no Trinta do que na VPC, embora as diferenças entre elas fossem bem menores em 2014, ano em que ocorreram apenas as ações de controle do PNCD (Figura 17; Tabela 6). A figura 18 representa as flutuações populacionais em 2016 associadas à distribuição das chuvas.

A primeira grande redução na viabilidade de ovos do mosquito, ou seja, um PIO  $\cong$  40%, foi registrada em janeiro/2016, após a 6ª soltura dos ME na VPC (Figura 19).

Dificuldades na logística de envio dos mosquitos para a Ilha reduziram para dois os eventos de solturas em janeiro/2016 (Tabela 7). No período seguinte, as solturas voltaram a acontecer semanalmente, exceto em abril e julho. De fevereiro a abril a densidade de ovos coletados nas Ovt-S continuou a aumentar (Figura 18) acompanhada de uma queda drástica do PIO para menos de 25% (Figura 19). No intervalo de janeiro a abril o índice pluviométrico acumulado foi de 855,5 mm dos 1.224 mm registrado para 2016. Além disso, nestes mesmos meses ocorreram três dos quatro picos de chuva na ilha (Figura 18).

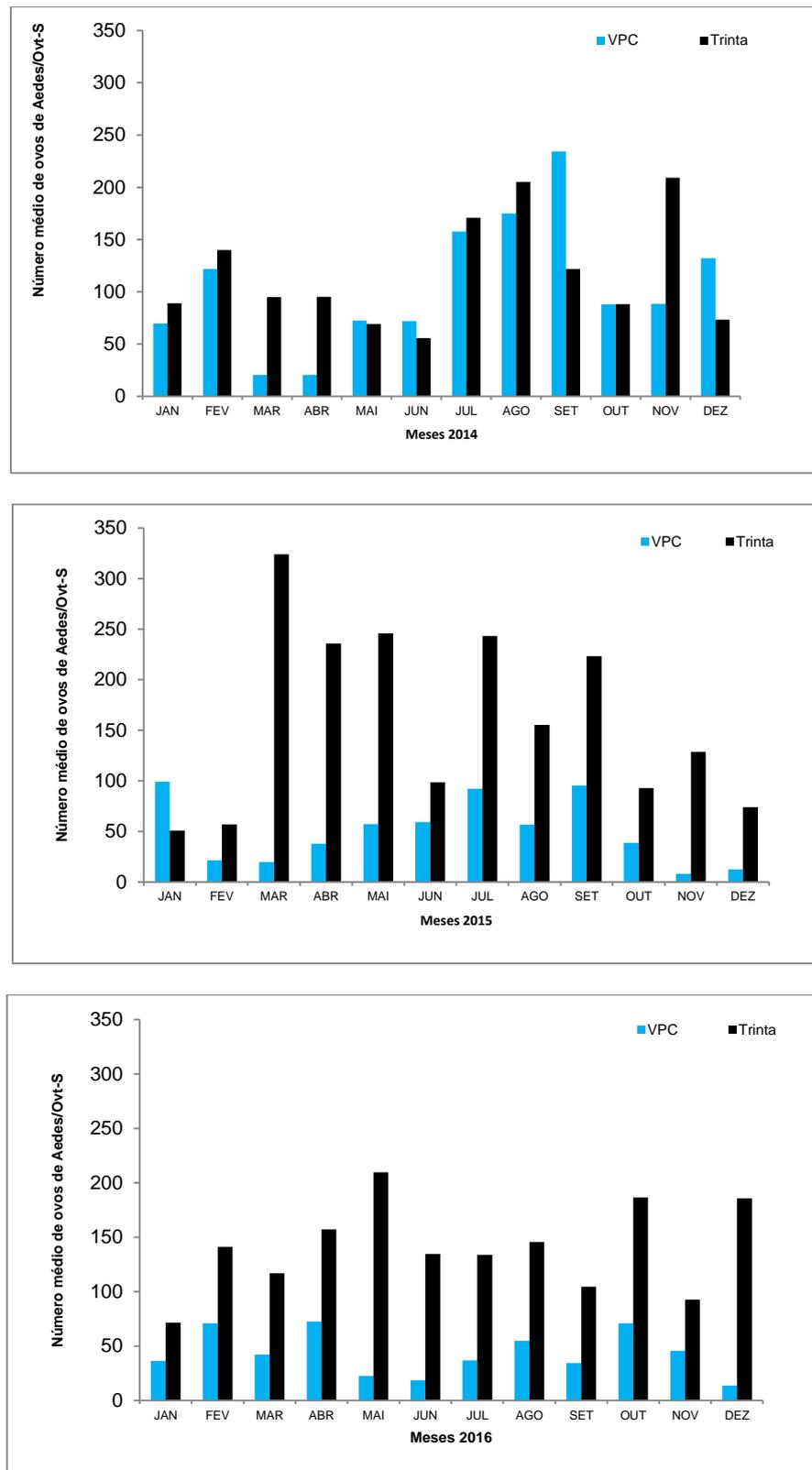
Machos esterilizados com 40 Gy foram liberados até a 18<sup>o</sup> soltura, ou seja, até o final de abril, a partir desse momento, machos esterilizados com 50 Gy passaram a ser usados, em quantidades que variaram de 3.000 a 5.000 ME/soltura semanal (Tabela 7). De maio a julho o PIO voltou a aumentar, atingindo seu pico máximo de 83,7% de inviabilidade de ovos, em julho após 28 eventos consecutivos de soltura, também confirmado pela inviabilidade induzida de ovos cujo valor foi de 91,8%.

**Figura 16 - Índice de Positividade de Ovitrapas nos períodos de 2014, 2015 e 2016, nas vilas da Praia da Conceição (VPC) e do Trinta, Fernando de Noronha/PE.**



Fonte: Do autor

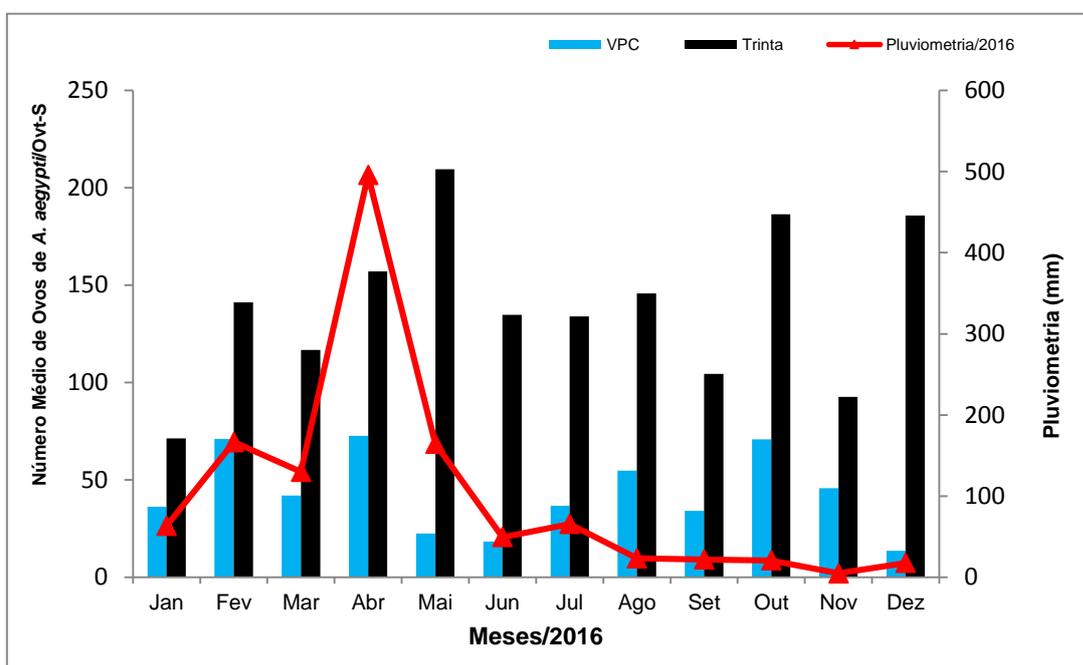
**Figura 17 - Densidade de ovos de *Aedes aegypti* observada nos anos de 2014 a 2016 nas vilas da Praia da Conceição (VPC) e do Trinta, Fernando de Noronha/PE.**



Fonte: Do autor

Nesta ocasião também ocorreu uma redução significativa do número médio de ovos coletados nas Ovt-S (Tabela 7; Figura 19). Nos meses seguintes, a redução não se manteve para os índices e o PIO diminuiu drasticamente, oscilando entre 40% e 10% (Figura 19), mesmo com o aumento do número de machos estéreis para 5.000/soltura semanal, realizado de forma mais regular a partir de agosto (Tabela 7). Portanto, um percentual tão elevado de inviabilidade de ovos quanto 80% não foi mais alcançado.

**Figura 18 - Flutuação da densidade populacional de *Aedes aegypti* nas vilas da Praia da Conceição (VPC) e do Trinta, Ilha de Fernando de Noronha, estimada pela coleta de ovos do mosquito por ovitrampas-sentinelas, em 2015 e 2016.**



Fonte: Do autor

A comparação entre a VPC e o Trinta permite afirmar que em todos os meses foi detectada uma porcentagem de inviabilidade induzida de ovos de *A. aegypti* associada à liberação dos ME (Tabela 7). Valores acima de 50% foram registrados em oito dos 13 meses analisados, inclusive em janeiro, junho, agosto e outubro quando a densidade de ovos aumentou, mas o PIO foi  $\geq 40\%$ .

De um modo geral o total de ovos de *A. aegypti* coletado na VPC, bem como o MNO em 2016 foi  $\cong 55\%$  menor do que os observados em 2014 e  $\cong 16\%$  menor do que os

de 2015. Por outro lado, no Trinta, a situação de infestação em 2016 foi  $\cong$  35% maior do que a de 2014 e  $\cong$  19% menor do que a de 2015 (Tabela 6).

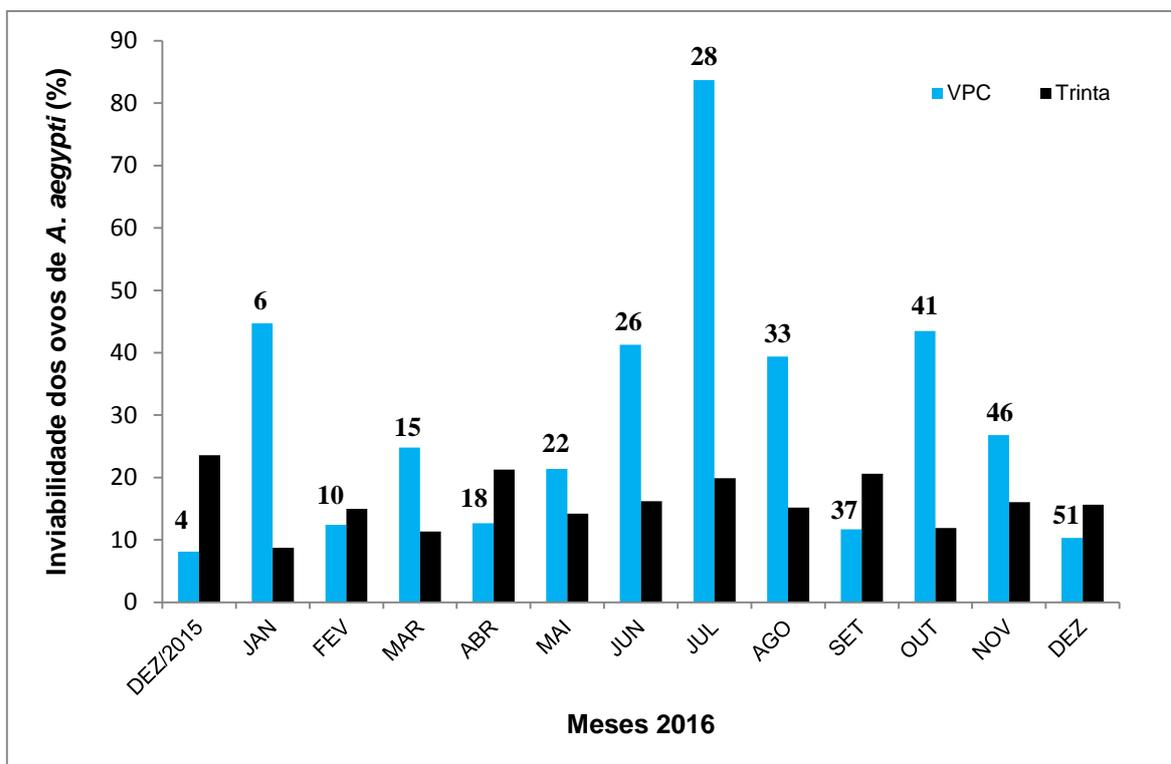
**Tabela 6 Número total e número médio de ovos (NMO) de *Aedes aegypti* por ovitrampa sentinela (Ovt-S) coletados nos anos de 2014, 2015 e 2016 nas vilas da Praia da Conceição (VPC) e Trinta, Fernando de Noronha-PE**

Áreas	Nº ovos/2014		Nº ovos/2015		Nº ovos/2016	
	Total	NMO $\pm$ DP	Total	NMO $\pm$ DP	Total	NMO $\pm$ DP
VPC	5.561	104,9 $\pm$ 102,1	2.994	50,7 $\pm$ 65,7	2.510	43,3 $\pm$ 49,9
Trinta	12.285	122,8 $\pm$ 128,2	18.939	163,3 $\pm$ 144,5	15.465	139,3 $\pm$ 160,8

DP = desvio padrão.

Considerando o período de 12 meses de execução da TIE na VPC e da aplicação de Bti na vila do Trinta, o percentual acumulado de inviabilidade de ovos de *A. aegypti* foi de aproximadamente 30% e 8%, respectivamente. O somatório destes valores ao da redução da quantidade de ovos recuperada pelo SMCP-*Aedes* em 2016 sugere que houve uma diminuição de aproximadamente 46% na VPC e de 27% no Trinta.

**Figura 19 - Porcentagem de ovos de *Aedes aegypti* inviáveis coletados nas vilas da Praia da Conceição e do Trinta, Ilha de Fernando de Noronha/PE, ao longo de 51 solturas de machos estéreis, no período de dezembro/2015 a dezembro/2016.**



Os números no topo das colunas correspondem ao número acumulado de solturas de machos estéreis (ME) na vila da Praia da Conceição. Os machos foram esterilizados com 40 Gy até a 18ª soltura, e com 50 Gy para as demais.

Fonte: Do autor

**Tabela 7 - Número total de ovos de *Aedes aegypti*, número médio de ovos/ovitrampa/mês (NMO), número de solturas, quantidade de machos estéreis liberados/mês, inviabilidade induzida de ovos pela Técnica do Inseto Esteril (TIE) e diminuição da densidade de ovos comparativa entre a Vila da Praia da Conceição/ VPC (área TIE) e a do Trinta (controle), Fernando de Noronha-PE, em 2016.**

Mês/ano	Número total de ovos		NMO ± DP		Nº de solturas	Nº de machos estéreis liberados	Inviabilidade induzida de ovos na VPC (%)	Diminuição da densidade de ovos (%) (VPC x Trinta)
	VPC	Trinta	VPC	Trinta				
Dez/2015	62	666	12,4 ± 20,0	74,0 ± 80,6	4*	12.457	33,2	- 83,2
Jan/2016	181	697	36,2 ± 25,8	77,4 ± 48,0	2*	10.412	66,4	- 53,2
Fev/2016	355	1.411	71,0 ± 46,1	141,1 ± 128,7	4*	13.032	48,5	- 49,7
Mar/2016	210	1.051	42,0 ± 49,9	116,8 ± 129,4	5*	25.671	52,7	- 64,0
Abr/2016	363	1.257	72,6 ± 80,4	157,1 ± 184,6	3*	15.689	30,7	- 53,8
Mai/2016	112	2.096	22,4 ± 32,2	209,6 ± 138,6	4	16.053	54,2	- 89,3
Jun/2016	92	1.347	18,4 ± 15,2	134,7 ± 92,7	4	16.708	65,0	- 86,3
Jul/2016	147	1.339	36,7 ± 29,5	133,9 ± 116,4	2	10.130	91,8	- 72,5
Ago/2016	274	1.311	54,8 ± 26,9	145,7 ± 96,5	5	26.110	60,3	- 62,4
Set/2016	171	1.024	34,2 ± 64,9	102,4 ± 88,6	4	20.594	44,4	- 66,6
Out/2016	354	1.678	70,8 ± 67,9	186,4 ± 342,9	4	14.953	64,4	- 62,0
Nov/2016	183	939	45,7 ± 91,5	93,9 ± 135,5	5	22.836	65,1	- 51,3
Dez/2016	68	1.315	13,6 ± 15,9	187,8 ± 293,4	5	29.510	24,2	- 92,8

\* Machos *Aedes*-VPC esterilizados com 40 Gy de radiação gama.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo relatam a primeira experiência exitosa de utilização da Técnica do Inseto Estéril (TIE), baseada na liberação de machos esterilizados por radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ , para o controle de *Aedes aegypti*, na vila da Praia da Conceição (VPC), Ilha de Fernando de Noronha (FN), PE-Brasil.

Outros estudos com diferentes espécies de mosquitos têm utilizado doses de radiação gama que variam de 30 a 100 Gy para obtenção de machos estéreis (ME), sendo um consenso entre eles que quanto menor for a dose de radiação ionizante melhor o desempenho biológico dos indivíduos (BALESTRINO *et al.*, 2010; OLIVA *et al.*, 2012; 2013; BELLINI *et al.*, 2013; MUNHENGA *et al.*, 2016). A esterilidade completa dos machos *Aedes*-VPC foi alcançada com a dose de 50 Gy, embora a de 40 Gy, considerada parcialmente esterilizante, tenha também promovido mais de 70% de inviabilidade da prole das fêmeas nos cruzamentos realizados em campo simulado. Estes resultados corroboram os referidos por (Lima, 2015) para uma colônia de laboratório (RecL), representativa do município de Recife, área continental mais próxima da Ilha de Fernando de Noronha no estado de Pernambuco.

Shetty *et al.* (2016) confirmaram uma relação inversamente proporcional entre o aumento da dose de radiação e a longevidade de *A. aegypti*. Os dados de Lima (2015) também corroboram esta afirmativa, haja vista que os machos *Aedes*-RecL irradiados com 50 Gy foram menos longevos que os irradiados com 30 e 40 Gy. Segundo o mesmo autor, o comprometimento foi ainda maior quando os ME foram mantidos em grupo e na presença de fêmeas, cuja atividade de competição para a cópula também influenciou negativamente este parâmetro. De acordo com Robinson (2002) e Helinski *et al.* (2006) as doses parcialmente esterilizantes podem ser importantes para potencializar a competitividade dos machos em condições de campo, sobretudo quando a quantidade de machos estéreis não é muito maior do que as dos machos selvagens.

Na tentativa de minimizar outros fatores, além da exposição à radiação, que pudessem comprometer o desempenho dos machos estéreis em campo foi utilizada neste estudo uma subpopulação de *A. aegypti* da própria ilha (*Aedes*-VPC), cujo *background* genético já confere adaptações importantes às condições ambientais peculiares deste local. No entanto, os ensaios enzimáticos revelaram alterações na atividade das GST nos indivíduos *Aedes*-VPC, machos e fêmeas, sobretudo depois da exposição à radiação gama.

De acordo com Halliwell; Gutteridge (1995) as GST possuem um importante papel na redução do estresse oxidativo, atuando na conjugação de eletrófilos produzidos endogenamente, tais como os peróxidos lipídicos de membrana, em animais após a exposição à radiação. Então, o aumento na atividade das GST poderia conferir uma vantagem adaptativa dos ME *Aedes*-VPC em campo. Por outro lado, as alterações poderiam estar relacionadas à manutenção do mecanismo de resistência metabólica aos piretróides, como referido por Araújo *et al.* (2013), no entanto nossos resultados não confirmam tal hipótese, haja vista que a população de Fernando de Noronha está susceptível a estes inseticidas. Não podemos desconsiderar o uso doméstico de inseticidas em spray e repelentes, piretróides ou não, como elemento de proteção individual pela população (LIMA *et al.*, 2011). Então, é possível sugerir que algum outro xenobiótico esteja induzindo a produção das GST nos indivíduos *Aedes*-VPC, uma vez que as mesmas estão ligadas aos sistemas de proteção dos componentes celulares contra vários efeitos tóxicos e genotóxicos à célula (SEM; SEMIZ, 2007).

Segundo Diniz *et al.* (2014), a manutenção do mecanismo de resistência metabólica em populações de *A. aegypti* poderia levar a custos biológicos, refletidos especialmente sobre a fecundidade e o prolongamento do tempo de desenvolvimento larval. Em nosso estudo, o efeito de ampliação do tempo para a obtenção das pupas-macho *Aedes*-VPC pareceu estar relacionado apenas ao aumento da densidade de larvas/cuba, no processo de produção em massa dos mosquitos.

A TIE tem como um dos seus pré-requisitos a liberação dos insetos (machos) em grande quantidade. Portanto, estudos recentes têm aprimorado a logística de criação de mosquitos para a obtenção de indivíduos em quantidade e qualidade, no menor tempo possível e com o menor custo agregado de produção (MEDICI *et al.*, 2011; BALESTRINO *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014; 2015). Os resultados encontrados em nosso estudo não revelaram efeitos adversos associados ao aumento da densidade de larvas/cuba sobre a qualidade dos mosquitos adultos, embora tenha impactado na quantidade relativa de machos produzida em até 12 dias após a eclosão das larvas. Densidades de até 18 mil larvas/recipiente, com uma relação de 3 larvas/ml de água, portanto, seis vezes maior do que a usada na criação massal de *Aedes*-VPC, são praticados em outros protocolos de produção em larga escala (BALESTRINO *et al.*, 2014), inclusive em biofábricas, onde 100 a 540 mil machos podem ser produzidos semanalmente (BELLINI *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015).

A presença de um resíduo de 1% de fêmeas nas amostras encaminhadas para liberação na VPC aponta para a necessidade de melhorias nas condições de triagem das pupas-macho. Outros instrumentos e protocolos para a separação mecânica dos machos pelo tamanho das pupas referem contaminação das amostras que variam de 0,02% a 1,2% (BELLINI *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015). Nossos resultados corroboram os de Lima (2015) e confirmam que as fêmeas *Aedes*-VPC, assim como as *Aedes*-RecL, irradiadas com 40 ou 50 Gy, não produzem ovos. Esta alteração fisiológica, já detectada em outras espécies de mosquitos como *A. albopictus* (BELLINI *et al.*, 2013), precisam ser melhor investigadas, sobretudo para avaliar se o comportamento de busca por alimentação sanguínea também sofre alguma modificação, uma vez que essa necessidade está fortemente associada à produção de ovos, na maioria das espécies de mosquitos (CLEMENTS, 1998). Portanto, os aspectos éticos relacionados à liberação de fêmeas de *A. aegypti* no âmbito da TIE precisam ser considerados, especialmente em áreas endêmicas de transmissão de arboviroses, como dengue, zika e chikungunya (CARVALHO *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2015).

Outro ponto que reforça a necessidade de melhorar a qualidade da sexagem é que a presença de fêmeas confinadas junto aos machos estéreis, antes da soltura em campo, pode reduzir a longevidade dos mesmos (VREYSEN 1995; ROBINSON 2002; LIMA, 2015). Assim, diminuir significativamente a presença de fêmeas nas amostras enviadas para liberação em campo é um ponto importante e que precisará ser melhorado na logística de produção dos ME para liberação na VPC. Diversos estudos apontam para a necessidade de desenvolver sistemas de separação por sexo que sejam mais precisos do que os baseados apenas no tamanho dos indivíduos (BELLINI *et al.*, 2013; ALPHEY, 2014).

O efeito de cada ciclo mensal de soltura dos ME sobre a densidade de ovos do mosquito na VPC só pode ser observado, com mais clareza, no conjunto de ovos coletados no mês seguinte à soltura. Com isto, a primeira redução importante sobre a viabilidade de ovos, registrada em janeiro/2016, provavelmente esteve relacionada às solturas de dezembro/2015, haja vista que nesse mesmo mês (jan/2016) houve um aumento importante na quantidade de chuvas, as quais se prolongaram até abril desse mesmo ano.

A quantidade elevada de chuvas pode, de certa forma, ter desfavorecido a efetividade da técnica como um todo, e, conseqüentemente, o processo de avaliação da efetividade dos ME tratados com 40 Gy. Tendo-se isso em vista, no final de abril/2016, optou-se pela substituição da dose de 40 Gy pela dose de 50 Gy.

O segundo momento expressivo de inviabilidade de ovos ocorreu em junho, seguido do percentual máximo de 83,3% alcançado em campo uma única vez (julho). Depois disso, percentuais inferiores a 50% ou 40% foram registrados, mesmo após 51 solturas consecutivas. De um modo geral, as poucas experiências com a TIE para controle de *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Culex tarsalis* e *Anopheles quadrimaculatus*, revelam resultados consistentes de controle com um número menor ou igual a 30 semanas e/ou eventos de soltura de ME (ALPHEY, 2014), cabendo dizer que a maioria dos estudos ocorrem em países temperados, onde as condições climáticas, com sazonalidade bem marcada no inverno, são desfavoráveis aos mosquitos.

É importante ressaltar que a VPC, durante todo o ano de 2016, não recebeu nenhum outro tipo de intervenção, além da TIE, para o controle do mosquito, enquanto que a área controle recebeu a aplicação espacial do larvicida Bti. Os resultados mostram que a TIE foi mais efetiva que o larvicida, para garantir a sustentabilidade do controle populacional de *A. aegypti*, uma vez que se observou um índice de inviabilidade de ovos maior para a VPC que para o Trinta, no mesmo período.

Os resultados da nossa avaliação longitudinal na VPC revelaram que as condições de temperatura, umidade e pluviometria encontradas, são capazes de manter níveis médio-altos de densidade populacional de *A. aegypti* durante o ano todo, mesmo no período mais seco, apesar de existir uma diminuição natural do tamanho populacional do mosquito nessa ocasião (REGIS *et al.*, 2014).

A quantidade de ME/soltura na VPC foi similar ou maior do que a utilizada por Bellini *et al.* (2013) ( $\cong 1.500$  ME/ha) em quatro vilarejos da Região de Emilia-Romagna, no Norte da Itália. Tais vilarejos estão situados em área urbana, com extensão territorial de 16 a 45 hectares, cujo número de solturas em cada um variou de 13 a 25, também a intervalos semanais, no período de 2005 a 2009. Segundo os autores, a redução da viabilidade dos ovos também variou bastante, atingindo 70% a 80%, em apenas uma delas, com machos esterilizados com doses de 30 ou de 40 Gy, para controle de *Aedes albopictus*. A avaliação da técnica foi por apenas cinco meses, em função do clima temperado daquela região da Itália.

A oscilação no percentual de inviabilidade de ovos na VPC e a baixa redução do número médio de ovos em 2016 pode estar relacionada a diversos fatores, com destaque para a preexistência de uma elevada infestação por *A. aegypti*, confirmada por nossos dados de 2014 e 2015, e já diagnosticada pela coleta de ovos por armadilhas em anos anteriores

(REGIS *et al.*, 2014), mesmo com as ações de controle, rotineiras, do PNCD, realizadas desde 2001 na Ilha. Esta situação pode ter sofrido a influência das chuvas observadas no período esperado de estiagem, setembro a dezembro (Figura 15) que, certamente favoreceu a rápida recomposição do número de fêmeas e machos selvagens, oriundos do estoque de ovos quiescentes deixados no ambiente durante 2015. Segundo Regis *et al.* (2014) isso ocorre porque criadouros temporários, que não foram eliminados pelas ações do PNCD permanecem no local. Ainda, segundo os mesmos autores, o efeito das chuvas sobre a densidade de ovos só é percebida dois ou três meses depois.

É preciso também considerar que os ME *Aedes*-VPC podem ter se dispersado para outras vilas, ou que machos ou fêmeas já inseminadas selvagens tenham migrado para a VPC, o que, de certa forma, seria um comportamento esperado para *A. aegypti*, uma espécie invasora, cuja dispersão pode se dar de forma ativa, pelo vôo, ou passiva pelo transporte de ovos quiescentes (CLEMMENTS, 1999).

Nossos resultados do uso do ME esterilizado por radiação gama/TIE para a supressão de *A. aegypti* em Fernando de Noronha (FN) diferiram bastante daqueles encontrados por Carvalho *et al.* (2015) com o mosquito transgênico (OX513A), na cidade de Itaberaba, no município de Juazeiro/Bahia. Apesar de ambas as áreas, Itaberaba e FN, estarem localizadas no Nordeste brasileiro, a precipitação média anual é de 536 mm e 1.300 mm, respectivamente, o que demonstra que em FN ocorre muito mais chuvas. Além disso, cerca de 10.000 machos OX513A eram liberados/ha/semana, em três eventos consecutivos, de forma que a cobertura de soltura foi mais regular, repondo ciclicamente os machos OX513A em campo. A avaliação por seis meses também indicou uma redução de aproximadamente 78% da população local de *A. aegypti*, mas também não houve continuidade da avaliação para definir o que aconteceria no próximo período de chuvas.

De um modo geral, os resultados encontrados em nosso estudo ou nos realizados com os machos OX513A apontam para a necessidade de agregar metodologias, como a TIE, capazes de atuar na eliminação do estoque de ovos que será deixado nas áreas infestadas, no intuito de integrar ações mais efetivas para a supressão das populações de *A. aegypti*.

## 6 CONCLUSÕES

- A soltura de machos estéreis na Vila da Praia da Conceição, associada às outras ações do PNCD, levou a uma diminuição de cerca de 40% do nível de infestação por *A. aegypti* nesta localidade;
- Os resultados encontrados neste estudo trazem fortes evidências de que populações de *A. aegypti* de campo podem ser utilizadas na produção massal de machos esterilizados por radiação gama;
- Quantidades menores do que 5000 ME/semana não garantem reduções sustentáveis de inviabilidade de ovos de *A. aegypti*, em áreas densamente infestadas pela espécie, sobretudo em períodos chuvosos;
- Intervalos maiores do que sete dias entre as solturas comprometem a efetividade de controle da TIE;
- A TIE foi mais efetiva para garantir a sustentabilidade do controle populacional de *A. aegypti* do que a aplicação espacial de biolarvicida;
- A logística de envio, por via aérea, dos mosquitos machos esterilizados pareceu não comprometer sua competitividade para o acasalamento em campo;
- O conjunto de informações técnicas geradas neste estudo confirmam a viabilidade da TIE para o controle de *A. aegypti* em ambientes insulares e, também apontam para seu potencial em contextos urbanos em áreas continentais tropicais, com níveis similares de infestação pelo mosquito;
- A TIE tem grande potencial para a supressão populacional de *A. aegypti* e apresenta viabilidade para uso, de forma integrada, no Programa nacional de controle das arboviroses/SUS.

## 7 REFERÊNCIAS

AHMAD, S. et al. Cabbage looper antioxidant enzymes: tissue specificity. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 21, p. 563-572, 1991.

ALPHEY, L. Genetic Control of Mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 59, p. 205-224, 2014.

ALPHEY, L. et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 10, p. 295–311, 2010.

ALPHEY N, Bonsall M, Alphey L. 2009. Combining pest control and resistance management: synergy of engineered insects with Bt crops. **J. Econ. Entomol.** 102:717–32

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

ARAÚJO, A. P. **Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de Municípios do Estado de Pernambuco.** 2013. 94 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/10668>>. Acesso em: 03 mai. 2017, 15:54:12.

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

ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, China, v. 6, p. 576-94, 2015.

ASMAN SM, McDonald PT, Reisen WK, Milby MM, Reeves WC (1983) A field release of radio-sterilized males to suppress an isolated population of *Culex tarsalis* ; 1983 April 18–22 1982; Sacramento, California, USA. **CMVCA Press**, Sacramento, California, USA.

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

BALESTRINO, F. et al. Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Mass rearing. **PLoS ONE**, v. 9, p. e91914, 2014.

BARBOSA, P. et al. Vector surveillance for dengue virus detection in the archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 53, p. 613-619, 2016.

BARCELLOS, C. et al. Mudanças climáticas e ambientais doenças infecciosas: cenário e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 18, p. 285-304, 2009.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and Their Control**, 2 ed. New York. Springer, 2003. 576 p.

BELINATO, T. A.; MARTINS, A. J.; VALLE, D., Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, p. 916- 22, 2012.

BELLINI, R.; MEDICI, A.; PUGGIOLI, A.; BELESTRINO, F.; CARRIERI, M. Pilot field trial with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 50, p. 317-325. 2013

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

BENEDICT, M. Q.; KNOLS, B. G. J.; BOSSIN, H. C.; HOWELL, P. I.; MIALHE, E.; CACERES, C.; ROBINSON, A. S. Colonisation and mass rearing: learning from others. **Malaria Journal**. v. 8, n. 2, p.:S4. 2009.

BENNETT, K. E. et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 67, p. 85-92, 2002.

BENTLEY, M. D.; DAY, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, p. 401-21, 1989.

BESERRA, E. B. et al. Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Iheringia Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 99, p. 142-148, 2009.

BITELLI, T. **Física e dosimetria das radiações**. 2 ed. São Paulo. Atheneu, 2006. 422 p.

BLACK, W.C.; BENNETT, K. E. et al. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, México, v. 4, p. 379-388, 2002.

BOSIO, C. F.; BEATY, B. J.; BLACK, W. C. T. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, p. 965-970, 1998.

BOURTZIS, K. et al. Harnessing mosquito- *Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. **Acta Tropica**. Baseal, v. 132, p. 150-163, 2014.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, p. 113-118, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. **Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**. Brasília, v. 46, n. 9, ISSN 2358-9450, 2016.

\_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998**. Boletim Eletrônico Epidemiológico Edição Especial. Brasília, p. 48, 1999.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, p. 3-32, 2002.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e Zika (Semana Epidemiológica 47)**. Brasília, 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Febre de chikungunya: manejo clínico**. 1. ed. Editora MS- OS 2015/0061. Brasília, p. 28, 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Dengue: Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor- Manual de Normas Técnicas**. 3. ed. Editora Ascom/Pre/FUNASA. Brasília, p. 84, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti***. 1. ed. Editora MS- OS 2006/1338. Brasília, p. 128, 2006.

BURT A. Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 369: 2014.

BUSHLAND. R. C. Screw-Worm Research and Eradication: New Developments. **Special Collections, USDA National Agricultural Library**, p. 1956-1959. 1958. Disponível em: <<https://www.nal.usda.gov/exhibits/speccoll/items/show/7195>> Acessado em 12 de janeiro de 2016.

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

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

CAMPANELLI, E. S. **O desenvolvimento de um processo de infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus dengue: caracterização da interação do vírus com uma população de mosquitos autóctones**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz; Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/4044/2/000014.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2017, 20:24:49.

CARVALHO, D. O. **Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti***. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-20092012-094242/pt-br.php>>. Acesso em: 04 mai. 2017, 21:19:59.

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.

CARVALHO, D. O. et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, p. 1-15, 2015.

CAVALCANTI, A. E. H. D. **Caracterização da resistência aos piretroides pelo mecanismo de penetração reduzida em populações de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae), do Estado de**

**Pernambuco**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz; Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2017.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.). **The yellow fever mosquito – its life history, bionomics and stature**. Cambridge University Press. 1960.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition, and reproduction**. v. 1, Michigan. Chapman & Hall, 1992, 509 p.

COLLIS, S. J.; SCHWANINGER, J. M.; NTAMBI, A. J. Evasion of early cellular response mechanisms following low-level radiation induced DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, p. 49624-632, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1 ed. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p.

CORDEIRO, M. T. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006: Epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes**. 2008. 226 f. Tese (Doutorado) - Doutorado em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/3890>>. Acesso em: 04 mai. 2017, 22:10:33.

COSTA, Z. G. A. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Pará, v. 1, p. 11-26, 2011.

COX, J.; BROWN, H. E.; RICO-HESSE, R. Variation in vector competence for dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, p. 1172, 2011.

CRUPKIN, A. C.; MENONE, M. L. Changes in the activities of glutathione-S-transferases, glutathione reductase and catalase after exposure to different concentrations of cadmium in *Australoheros facetus* (Cichlidae, Pisces). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 8, p. 21-25, 2013.

CURTIS, C. F. The production of partially sterile mutants in *Glossina austeni*. **Genetics Research**, Cambridge, v. 13, p. 289-301, 1969.

CURTIS, C. F. et al. A field trial on genetic control of *Culex p. fatigans* by release of the integrated strain IS-31B. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Austria, v. 31, p. 181-190, 1982.

DAME, D. A.; LOWE, R. E.; WILLIAMSON, D. L. Assessment of released sterile *Anopheles albimanus* and *Glossina morsitans morsitans*. In: **Cytogenetics and genetics of vectors: proceedings of a symposium of the XVth International Congress of Entomology/editors, R. Pal, JB Kitzmiller, T. Kanda**. Tokyo: Kodansha; Amsterdam; New York: Elsevier Biomedical Press, c1981, 1981.

DAME D, Curtis C, Benedict M, Robinson A, Knols B. 2009. Historical applications of induced sterili-sation in field populations of mosquitoes. **Malar. J.** 8:S2

DEAN MD. A Wolbachia-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. **Proc Biol Sci.** v. 273 p. 1415–1420, 2006.

DIAS, N. P.; GARCIA, F. R. M. Fundamentos da Técnica do Inseto Estéril (TIE) para o controle das moscas das frutas (Diptera, Tephritidae). **Biológico**, São Paulo, v. 76, p. 58-62, 2014.

DINIZ, D. F. A. **Custo biológico associado à resistência ao inseticida temefos em populações de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12166>>. Acesso em: 05 mai. 2017, 16:33:12.

DINIZ, M. M. C. S. L. et al. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, p.775-782, 2014.

DUBOVSKIY, I. M. et al. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Oxford, v. 148, p. 1-5, 2008.

DUTRA, H. L. C. et al. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host and Microbe**, v. 19, p. 1-4, 2016.

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.

**DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S.** Sterile Insect Technique. Principles and Practices in Area-Wide Integrated Pest Management. **3-36. IAEA, Netherlands, Springer, 2005.**

DYCK, V., Hendrichs, J., Robinson, A.S., Klassen, W. & Curtis, C. History of the Sterile Insect Technique. in Sterile Insect Technique. **Netherlands, Springer 3-36. 2005.**

ENKERLIN, W.; MUMFORD, J. Economic evaluation of three alternative control methods of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Palestine and Jordan. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 1066-1072, 1997.

FANTINATO, F. F. S. T. et al. Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços em Saúde**, impress, 2016.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. v. 1. São Paulo, 1962.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. v. 2. São Paulo. EDUSP, 2002.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**, Londres, v. 324, p. 1563-66, 2002.

GOELDI, E. A. Os Mosquitos no Pará. **Memórias do Museu Goeldi**, Pará, v. 6, p. 124-127, 1905.

GONÇALVES, C. M. **O estudo da competência vetorial das populações de *Aedes aegypti* da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao Dengue vírus 2**. 2010. 78 f. Dissertação

(Mestrado) - Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ. Biblioteca do CPqRR. Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <[http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D\\_42.pdf](http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_42.pdf)>. Acesso em: 05 mai. 2017, 17:45:48.

GRIMSTAD, P. R.; PAULSON S. L.; CRAIG JR, G. B. Vector competence of *Aedes hendersoni* Cockerell (Diptera: Culicidae ) for La Cross e virus and evidence for a salivary gland escape barrier. **J. Med. Entomol.** v. 22, n. 4, p.: 447-453. 1985.

GUEDES, D. D. R.; DONATO, M. M. A.; BARBOSA, P. P.; KROKOVSKY, L.; ROCHA, S. W. S.; SARAIVA, K. L. A. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbe and Infection**, v. 6: e69, 2017.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. **Radiobiology for the Radiologist**. 6 ed. Lippincott. 2006. 576 p.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JC. The definition and measure-ment of antioxidants in biological systems. **Free Radic Biol Med**. 1995. 18:125–6.

HARRIS, A. F. et al. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, p. 828-830, 2012.

HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S.; CAYOL, J.P.; ENKERLIN, W. Medfly area-wide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behaviour studies. **Florida Entomologist**, v.85, p.1-13, 2002.

HELINSKI, M. E. H.; HOOD, R. C.; KNOLS, B. G. J. A stable isotope dual-labeling approach to detect multiple insemination in un-irradiated and irradiated *Anopheles arabiensis* mosquitoes. **Parasites and Vectors**, Londres, v. 1, p. 9, 2008.

HELINSKI, M. E. H.; KNOLS, B. G. J. Mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* mosquitoes irradiated with a partially- or fully-sterilizing dose in small and large laboratory cages. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 45, p. 698-705, 2008.

HELINSKI, M. E. H.; PARKER, A. G.; KNOLS, B. G. J. Radiation biology of mosquitoes. **Malaria Journal**, Londres, v. 2, p. 1-13, 2009.

HELINSKI, M. E. H.; PARKER, A. G.; KNOLS, B. G. J. Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. **Malaria Journal**, Londres, v. 5, p. 41, 2006.

HILGENBOECKER, K. et al. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. **Fems Microbiology Letters**, v. 281, p. 215–220, 2008

HOFFMANN A. A., et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, p. 454–457, 2011.

HOFFMANN, A. A.; ROSS, P. A.; RASIC, G. *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. **Evolutionary Applications**. v. 8, n. 8, pp.:751-768. 2015.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; ÂNGELO, F. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Projeção da População Brasileira. 2014. Acessado em: [https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao\\_da\\_populacao/2013/default.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/default.shtm).

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**, Paris, v. 12, p. 272-279, 2010.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F. History of the sterile insect technique. In: **Sterile Insect Technique**. Springer Netherlands, 2005. 36 p.

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.

KODRÍK, D. et al. Hormonal regulation of response to oxidative stress in insects- an update. **International Journal of Molecular Sciences**, China, v.16, p. 25788-25816, 2015.

KOYAMA, J.; KAKINOHANA, H.; MIYATAKE, T. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 331-349, 2004.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, Cambridge, v. 4, p. 08347, 2015.

KRISHNAN, N.; KODRÍK, D. Endocrine control of oxidative stress in insects. In: **Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling**. Wiley-Blackwell. New Jersey, NJ, USA. 2012. 270 p.

KUBA, H. T. et al. The successful eradication programs of the melon fly in Okinawa. In: **A world assessment of their biology and management**. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, 1996. 543 p.

LaCHANCE, L. E.; SCHMIDT, C. H.; BUSHLAND, R. C. Radiation induced sterilization. In: **Pest control: Biological, Physical and Selected Chemical Methods**. Academic Press, New York. 1967. 196 p.

LACROIX, R. et al. Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. 42771, 2012.

LAMBRECHTS, L. et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, p. 7460-7465, 2011.

LAVEN, H. Erradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature**, Londres, v. 216, p. 383-384, 1967.

RENDÓN P, McInnis D, Lance D, Stewart J. 2004. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. **J. Econ. Entomol.** 97:1547–53

LIMA, E. P. et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites and Vectors**, Londres, v. 4, p. 5-16, 2011.

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**, Baltimore, v. 68, p. 329-333, 2003.

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. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, 2015. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15830>>. Acesso em: 05 mai. 2017, 21:03:41.

LOFGREN, C. S. et al. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* El Salvador. III. Field methods and population control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 23, p. 288-297, 1974.

LORETO, E. L. S.; WALLAU, G.L. Risks of *Wolbachia* mosquito control. **Science**, New York, v. 351, p. 1273-1273, 2016.

MASSONNET-BRUNEEL, B.; CORRE-CATELIN, N.; LACROIX, R.; LEES, R. S.; HOANG, K. P.; NIMMO, D.; ALPHEY, L.; REITER, P. Fitness of Transgenic Mosquito *Aedes aegypti* Males Carrying a Dominant Lethal Genetic System. **PLoS ONE**. v. 8, n. 5, p.: e62711. 2013.

MCDONALD, P. T. ;W. Hausermann, N. Lorimer. Sterility Introduced by Release of Genetically Altered Males to a Domestic Population of *Aedes aegypti* at the Kenya Coast. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Volume 26, Issue 3, May 1977, p. 553 – 561. 1977. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh..26.553>

McMENIMAN, C. J. et al. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, 141–144, 2009.

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

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. Mosca-das-frutas de importância enconômica no Brasil - conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: **Holos**, 2000. 327p.

MARROQUIM, B. C. B. **Análise da diversidade genética de *Aedes aegypti* de Fernando de Noronha baseada em genes mitocondriais**. Monografia (graduação) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, 2015.

MARTINS, A. J. et al. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* Populations. **PLoS one**, São Francisco, v. 7, n. 3, p. 1-9, 2012.

MARTINS, A. J. et al. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 108-115, 2009.

MEDICI, A. Studies on *Aedes albopictus* larval mass-rearing optimization. **Journal of Economic Entomology**, 104, 266-273, 2011.

MELO-SANTOS, M. A. V., et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, n. 113, v.2, p. 180–189, Basel, 2010.

MENDONÇA, F.A; SOUZA, A.V; DUTRA, D.A. Saúde, Urbanização e Dengue no Brasil. **Sociedade e Natureza**, Uberlândia, v. 21, p. 257-269, 2009.

MERCADO-CURIEL, R. F.; BLACK, W. C. T.; MUNOZ, L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. **BMC microbiology**, Londres, v. 8, p. 118, 2008.

MESSINA, J. P. et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. **E-life**. p.1-19, 2016.

MIN K.T.; BENZER S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997;94:10792–6.

MONATH, T. P., HEINZ, F. X. Flaviviruses. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 961–1034. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: **Lippincott–Raven**. 1996.

MONTEIRO, F. J. C. **Monitoramento da dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e da dengue no município de Macapá, Amapá, Brasil/Macapá**. 2014. 78 f. Dissertação (Doutorado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Population from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, p. 467-477, 2007.

MOREIRA L.A., et al. *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, p. 1268–1278, 2009.

MULLER, H. J. Radiation damage to genetic material. **American Scientist**, n.38, p. 33–59, New Haven, 1950.

MUNHENGA, G. et al. Mating competitiveness of sterile genetic sexing strain males (GAMA) under laboratory and semi-field conditions: Steps towards the use of the Sterile Insect Technique to control the major malaria vector *Anopheles arabiensis* in South Africa. **Parasites and Vectors**. Londres, v.9, p. 122, 2016.

NAVARRO, M. V. T.; LEITE, H. J. D.; ALEXANDRINO, J. C.; COSTA, E. A. Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. **Historia Ciência e Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.15, n. 4, p.1039-1047, 2008.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, v.27, p.77, 2013.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. M. **Física das radiações**. São Paulo: Oficina de textos, 2010.

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

OLIVA, C. F. et al. The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males. **PLoS ONE**, v. 7, p. e49414, 2012.

OLIVEIRA, S. L.; CARVALHO, D. O.; CAPURRO, M. L. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. **Revista da Biologia**, n.6, p.38-43, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO-supported collaborative research projects in India: the facts. **WHO Chronicle**, n.30, p.131–139, Genebra, 1976.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD; Centers for Disease Control and Prevention. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas [Internet]. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**; 2011. Disponível em: [http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV\\_Spanish.pdf](http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf)

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Organização Mundial da Saúde anuncia emergência de saúde pública de importância internacional [Internet]. Brasília: **Organização Pan-Americana da Saúde**; 2016. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4991:organizacao-mundial-da-saude-declaraemergencia-de-saude-publica-de-importanciainternacional&Itemid=816](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4991:organizacao-mundial-da-saude-declaraemergencia-de-saude-publica-de-importanciainternacional&Itemid=816).

PAL, R.; LaCHANCE, L. E. **The operational feasibility od genetic methods for control insects of medical and veterinary importance.**1974

PAPATHANOS, P.A., et al. Sex separation strategies: experience and new approaches. **Malar. J.** 8 Suppl 2, S5 (2009).

PARKER, A.; MEHTA, K. **Sterile insect technique: a model for dose optimization for improved sterile insect quality.** Florida Entomologist, Gainesville, 2007.Paulo: EDUSP, 2002.

PATTERSON, R. S., D. E. WEIDHAAS, H. R. FORD., C. S. LOFGREN. Suppression and elimination of an island population of *Culex quinquefasciatus* with sterile males. **Science**, v. 168, p. 1368–1370, 1970.

PAULSON, S. L.; POIRIER, S. J.; GRIMSTAD, P. R.; CRAIG JR, G. B. Vector Competence of *Aedes hendersoni* (Diptera: Culicidae) for La Crosse Virus: lack of impaired function in virus-infected salivary glands and enhanced virus transmission by sporozoite-infected mosquitoes. **J. Med. Entomol.** v.29, n. 3, pp.: 483-488. 1992.

PHUC, H. K., M. H. ANDREASEN, et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC cell Biology**, v.5, p.1-11, 2007.

PINTO-JUNIOR, V. L.; LUZ, K.; PARREIRA, R.; FERRINHO, P. Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Medica Portuguesa**, n. 28, v. 6, p. 760-765, 2015.

REGIS, L. N. et al. Characterization of the spatial and temporal dynamics of the dengue vector population established in urban areas of Fernando de Noronha, a Brazilian oceanic island. **Acta Tropica**, v. 137, p. 80-7, 2014.

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**, v. 8, p. e67682, 2013.

REISEN, W. K. et al. *Anopheles culicifacies*: mating behavior and competitiveness in nature of chemosterilized males carrying a genetic sexing system. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 74, p. 395–401, 1981.

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

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

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology** 2007.

SAZAKI, C. S. S. **Esterilização Química da Broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) através de isca com melão e inseticidas do grupo dos reguladores de crescimento de insetos**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2006.

SEAWRIGHT, J. A., et al. Genetic method for the preferential elimination of females of *Anopheles albimanus*. **Science**, v. 200, p. 1303–1304, 1978.

SEGRETO, H. R. C.; SEGRETO, R. A. Revisão e atualização em radiobiologia: aspectos celulares, moleculares e clínicos / Radiobiology review and update: cellular, molecular and clinical aspects. **Folha Médica**, n.119, v.4, p.9-27, 2000.

SEN, A.; SEMIZ, A. Effects of metal and detergents on biotransformation and detoxification enzymes of leaping mullet (*Liza saliens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n. 68, p. 405-411, New York, 2007. Disponível em <[http:// dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.08.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.08.007)> Acesso em Outubro de 2016.

SHETTY, V. et al. Effect of gamma radiation on life history traits of *Aedes aegypti* (L.). **Parasite Epidemiology and Control**. 2016.

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. 32, n. 4, p. 349-355, 1999.

SMALLRIDGE, C., HEAVEN D., COLAGIOVANNI, L. 2002. The introduction of the sterile insect technique for Mediterranean fruit fly control in Adelaide, South Australia in 2001. **South Australian Research and Development Institute**. Department of Primary Industries and Resources, South Australia.

SOTA, T.; MOGI, M. Survival time and resistance to desiccation of diapause and non diapause eggs of temperate *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 63, p. 155-161, 1992

TAUHATA, L. et al. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos** - 9ª revisão novembro/2013 - Rio de Janeiro - IRD/CNEN. 345p.

TAUIL, P L. Urbanização e ecologia do Dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 99-102, 2001

THOMAS, D. D., et al. Insect Population Control Using a Dominant, Repressible, Lethal Genetic System. **Science**, v. 287, p. 2474-2476, 2000

TIBA, L. M. **Efeito de alguns inseticidas sobre a mariposa *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera, Plutellidae) por meio de iscas ionizantes**. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, 2008.

TRAVANTY, E. A. et al. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 607-613, 2004.

TURELLI; Bull JJ, Turelli M. Wolbachia versus dengue: evolutionary forecasts. **Evol Med Public Health**. 2013 set; 2013(1):197–207.

VALLE, D. Sem bala mágica: cidadania e participação social no controle de *Aedes aegypti*. **Epidemiologia Serviço e Saude**, v. 25, p. 629-632, 2016.

VREYSEN, M J. **Radiation induced sterility to control Tsetse flies**. PhD thesis, Wageningen Agricultural University. 1995.

WALDER, J. M. M. Técnica do inseto estéril – controle genético. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000, p. 151-158.

WALKER, T.; JOHNSON, P.H.; MOREIRA, L.A.; Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, Londres, v. 476, p. 450–3, 2011.

WEIDHAAS D.E., Breeland SG, Lofgren CS, Dame DA, Kaiser R (1974) Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador IV. Dynamics of test populations. **Am J Trop Med Hyg** 23: 298–308.

WEIDHAAS, D. E., SCHMIDT, C. H., SEABROOK, E. L. Field studies on the release of sterile males for the control of *Anopheles quadrimaculatus*. **Mosquito News**, v. 22, p. 283–291, 1962.

WEIR, B. S., COCKERHAM C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. *Wolbachia* infection frequency in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 267, p. 1277–1285, 2000.

WHO (World Health Organization). **Library Cataloguing-in-Publication Data Global strategy for dengue prevention and control**. 2012-2020. ISBN 978 92 4 150403 4. 2012.

WILDNER, W.; FERREIRA, R. V. PROJETO GEOPARQUES FERNANDO DE NORONHA – PE; Proposta. 2011. Disponível em: <[http://www.cprm.gov.br/publique/media/gestao\\_territorial/geoparques/noronha1/index.php?GEOPARQUE=1](http://www.cprm.gov.br/publique/media/gestao_territorial/geoparques/noronha1/index.php?GEOPARQUE=1)> Acesso em 03.11.2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome [Internet]. Geneva: **World Health Organization**; 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zikamicrocephaly/en/>

YE, Y.H., et al. *Wolbachia* reduces the transmission potential of dengue infected *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. e0003894, 2015.

ZANLUCA C., et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, p. 569-72, 2015.