DANILO DE OLIVEIRA CARVALHO

**Estudo de dispersão de machos da linhagem
transgênica OX513A de *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

DANILO DE OLIVEIRA CARVALHO

**Estudo de dispersão de machos da linhagem
transgênica OX513A de *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro-
Guimarães

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Carvalho, Danilo de Oliveira.

Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti* / Danilo de Oliveira Carvalho. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Mosquitos geneticamente modificados.

Versão do título para o inglês: Dispensal study of transgenic males line OX513A of *Aedes aegypti*.

1. *Aedes aegypti* 2. Dispensação 3. Transgênico 4. Supressão I. Guimarães, Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB040/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Danilo de Oliveira Carvalho.

Título da Dissertação: Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica
OX513A de *Aedes aegypti*.

Orientador(a): Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA-ICB/USP - 018/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 022/11/CEUA, datado de 15.02.11 e por solicitação da Profa. Dra. **Margareth de Lara Capurro Guimarães**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos **Danilo de Oliveira Carvalho**, **Aline S. Pereira Duarte**, **Milene A. Ferreira Lima**, **Miriam Brito dos Santos**, **Gildeane P. dos Santos Silva**, **Gessilane Araújo dos Santos** ao Projeto de Pesquisa "*Liberação planejada de machos de Aedes aegypti linhagem OX513A para estudos de dispersão*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 01 de abril de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Aos meus pais, irmão, avós e amigos.

AGRADECIMENTOS

À profa. Margareth por absolutamente tudo, principalmente por confiar em mim.

Ao pessoal do laboratório e comunidade USP com quem tive afeição pela paciência e discussões.

À Soraia, por cada momento de trabalho, orelhada e cafés.

Ao André, Andrézinho, sempre disposto a oferecer ajuda e suporte científico, a ele minha admiração.

À Bianca, pela breve orientação e conselhos que levarei sempre.

À Ceres, pela experiência e auxílio em todos os setores da vida.

Ao pessoal da biblioteca do ICB, sem vocês não haveria padronização.

Àqueles que me iniciaram no mundo dos mosquitos, dra. Carmen Costa, dra. Rosa Tubaki, dra. Regiane Menezes, dr. Luiz Mucci e dr. José Laporta.

Ao prof. Mauro Marrelli, pela oportunidade de continuar a trabalhar com mosquitos.

Ao prof. Lincoln Suesdek, pelo apoio e contribuições.

Aos companheiros da Oxitec, obrigado também por melhorarem meu inglês.

Aos companheiros da Moscamed, todos sem exceção, sejam da mosca ou do mosquito.

Aos amigos nordestinos além Moscamed.

À comunidade de Itaberaba, que é feliz vivendo na ignorância de si mesma.

Às agências de fomento, FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

“(...) era como um pai ocupado, um progenitor que dava muita importância ao seu trabalho. Mas nós podíamos senti-lo em nossos corações, e no fundo não estávamos sozinhos. Tolo é o filho que depende do pai, que se apóia em sua segurança e que desiste de desbravar o mundo por si.”

Eduardo Spohr

“Um homem da ciência não deve ter desejos, nem afeições, somente um mero coração de pedra.”

Charles Darwin

RESUMO

CARVALHO, D. O. **Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti***. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Novas alternativas são necessárias para controlar o mosquito transmissor da dengue, como a manipulação genética. Baseada na técnica do inseto estéril (SIT) que compreende a esterilização, a criação em massa e a liberação de grandes números de insetos machos estéreis em uma área alvo, a tecnologia RIDL, baseada em SIT, compreende criação em massa e liberação de mosquitos machos que carregam gene letal para sua prole, neste caso a linhagem OX513A de *Aedes aegypti* é testada nesse projeto, através da avaliação em testes laboratoriais e em testes de campo com marcação liberação e recaptura, comparando esta linhagem com linhagens selvagens. Foi mensurada a competitividade, longevidade e dispersão. Os testes foram realizados no bairro de Itaberaba (Juazeiro/BA) e na Universidade de São Paulo. Além da avaliação foi realizado o monitoramento com armadilhas “ovitrampa”, captura de mosquitos adultos com aspirações em residências. E o desenvolvimento de um plano de comunicação para a sociedade. Os resultados apontam que a compatibilidade entre as linhagens (transgênica e selvagem) foi positiva e a competitividade não apresentou tendência entre as fêmeas de escolherem uma linhagem ou outra. Estatisticamente não há diferença entre o número de ovos e larvas (logo a fertilidade) entre a linhagem selvagem e transgênica. O monitoramento da área de estudo confirmou a presença de *A. aegypti*, e não foi capturado nenhum indivíduo de *Aedes albopictus*. Para avaliar a dispersão, os mosquitos machos transgênicos foram liberados no ambiente e esses apresentaram uma sobrevivência no campo de 2,3 dias e um raio de vôo de 80 metros do ponto de liberação. O índice de esterilidade relativa foi determinado baseado na competitividade e proporção de ovos fluorescentes encontrados. Foi possível estabelecer uma produção em massa para realizar a fase de pré-supressão com a liberação de 540.000 machos ao longo de seis semanas e obtenção de 17% de larvas transgênicas oriundas do cruzamento desses machos com fêmeas do campo. Baseado nesses dados iniciou-se a fase de supressão com a liberação alvo de 400.000 por semana, aproximadamente 05 vezes mais esperando alcançar o estágio de supressão.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Dispersão. Transgênico. Supressão.

ABSTRACT

CARVALHO, D. O. **Dispersal study with transgenic males line OX513A of *Aedes aegypti*.** 2012. 112 p. Masters thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

New alternatives are needed to control mosquitoes that transmit Dengue. Based on insect technique Sterile (SIT), which comprises sterilizing, mass rearing and release a large number of sterile males in an area target, RIDL technology based on SIT, but using transgenesis instead of radiation. Doing the same process for mass rearing and release of male mosquitoes carrying lethal gene to their offspring, in this case the strain OX513A of *Aedes aegypti* is under test in this project, through the evaluation of laboratory and field trials with mark-release-recapture (MRR), comparing transgenic with wild-type. We measured competitiveness, longevity and dispersal. The tests were performed in Itaberaba neighborhood (Juazeiro / BA) and at University of São Paulo. The evaluation was carried out with monitoring through ovitraps and adult mosquitoes collection with aspiration in houses. It was also developed a communication plan to society/community in general. The results indicate that the compatibility between the lines (transgenic and wild-type) was positive, and competitiveness showed no trend among females to choose one lineage or another. Statistically there were no difference between the number of eggs and larvae (resulting fertility) between the transgenic line and wild-type. The study area monitoring confirmed the presence of *Ae. aegypti*, and no *Aedes albopictus* was captured. To evaluate dispersion, transgenic males were released into the environment and they showed a field survival of 2.3 days and a flight range of 80 meters from the release point. The relative sterility index was determined based on the competitiveness and fluorescent proportion of eggs. Mass production was established to perform the pre-suppression phase releasing 540,000 males over six weeks and obtaining 17% of transgenic larvae in response of transgenic males mating field females. Based on these data suppression process have started with a release target of 400,000 per week, this is about 05 times more to reach the suppression stage briefly.

Keywords: *Aedes aegypti*. Dispersion. Transgenic. Suppression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 02 – Esquema de substituição de população por introdução gênica.....	24
Figura 03 – Esquema de supressão de população por transmissão de gene letal.....	26
Figura 04 – Esquema do transgene LA513 da linhagem OX513A de <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 05 – Representação do sistema da letalidade condicional.....	27
Figura 06 – Armadilha de captura de ovos - ovitrampa.....	34
Figura 07 – Aspirador elétrico para captura de mosquitos adultos.....	35
Figura 08 – Sistema de marcação de adultos: método do floco de isopor.....	36
Figura 09 – Sistema de marcação de adultos: método do pote marcado.....	37
Figura 10 – Visão geral do bairro Itaberaba.....	43
Figura 11 – Panfleto do projeto.....	45
Figura 12 – Disposição das armadilhas ovitrampas durante as duas primeiras fases do monitoramento.....	46
Figura 13 – Disposição das armadilhas durante a terceira fase de monitoramento.....	48
Figura 14 – Pontos de liberação de transgênico para estudo de dispersão.....	54
Figura 15 – Divisão da área de liberação.....	54
Figura 16 – Mapa da dispersão dos mosquitos recapturados entre fevereiro e maio de 2011.....	55
Figura 17 – Estudo de dispersão no bairro de Itaberaba (Juazeiro/BA)	56
Figura 18 – Área de recaptura de mosquitos marcados.....	59
Figura 19 – Mapa guia para liberação em campo de machos transgênicos no bairro Itaberaba.....	65
Gráfico 01 – Taxa de mortalidade de larvas na presença e ausência de tetraciclina.....	39
Gráfico 02 – Porcentagem de escolha das fêmeas selvagens.....	40
Gráfico 03 – Número de ovos por armadilha	50
Gráfico 04 – Taxa de recaptura de mosquitos marcados (transgênicos e selvagens)....	58

Gráfico 05 – Taxa de recaptura de mosquitos marcados após a liberação em múltiplos pontos.....	61
Gráfico 06 – Regressão linear entre o número de ovos e peso em gramas.....	63
Gráfico 07 – Produção de machos ao longo das liberações.....	64
Gráfico 08 – Número de machos liberados semanalmente durante a pré-supressão....	66
Gráfico 09 – Taxa de mortalidade entre os dois tipos de marcação.....	67
Gráfico 10 – Relação entre liberação e larvas transgênicas.....	69
Gráfico 11 – Liberação de machos no bairro de Itaberaba entre abril de 2011 a janeiro de 2012.....	72
Gráfico 12 – Número de ovos e larvas em relação a três variáveis climáticas.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT).....	20
Tabela 02 – Regime de alimentação das larvas.....	32
Tabela 03 – Número de larvas remanescentes na presença e ausência de tetraciclina ao longo do tempo.....	38
Tabela 04 – Avaliação entre as linhagens Higgs e OX513A quanto a quantidade de ovos e larvas.....	41
Tabela 05 – Dados de ovitrampa da primeira fase de monitoramento.....	47
Tabela 06 – Dados de ovitrampa da segunda fase de monitoramento.....	49
Tabela 07 – Dados de ovitrampa da terceira fase de monitoramento.....	51
Tabela 08 – Número e porcentagem de mosquitos marcados recapturados nos intervalos de distanciamento do ponto de liberação.....	55
Tabela 09 – Número de mosquitos capturados durante estudo de dispersão.....	57
Tabela 10 – Número de mosquitos recapturados ao longo dos dias após a liberação....	58
Tabela 11 – Total de mosquitos coletados por dia de aspiração nas áreas controle e tratada.....	60
Tabela 12 – Estimativa da probabilidade de sobrevivência diária e da expectativa de vida.....	61
Tabela 13 – Estimativa do número total de ovos em cada uma das amostras de peso.....	62
Tabela 14 – Taxa de mortalidade entre os métodos de marcação.....	68
Tabela 15 – Taxa sexual entre as áreas controle e de tratamento.....	70
Tablea 16 – Densidade de machos e número de ovos da área tratada durante MLR.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Substituição de população	23
1.2 Supressão de população	25
2 OBJETIVO	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.1.1 Colonização da linhagem selvagem Itaberaba (Ita)	30
3.1.2 <i>Aedes aegypti</i> não transgênicos	30
3.1.3 Manutenção da linhagem transgênica OX513A	31
3.1.4 Produção em larga escala	31
3.1.4.1 Colônia para produção de ovos	31
3.1.4.2 Produção de machos para liberação em campo	33
3.2 Captura de ovos e de adultos	34
3.3 Marcação liberação e recaptura – MLR	36
3.3.1 Marcação	36
3.3.1.1 Método do floco de isopor	36
3.3.1.2 Método do pote marcado	37
3.3.2 Liberação	37
3.3.3 Recaptura	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 No laboratório	38
4.1.1 Teste de letalidade condicionada	38
4.1.2 Preferência sexual das fêmeas selvagens (Higgs)	39
4.1.3 Outros dados observados	40
4.2 No campo	41
4.2.1 Área para liberação dos machos	41
4.2.1.1 Bairro de Itaberaba	43
4.2.2 Esclarecimento à população – Plano de comunicação	43
4.2.3 Monitoramento	46
4.2.4 Estudo de dispersão	53
4.2.5 Longevidade – Taxa de recaptura	56

4.2.5.1 Transgênico X Selvagem.....	56
4.2.5.2 Taxa de recaptura em liberação de múltiplos pontos.....	59
4.2.6 Fase de pré-supressão.....	62
4.2.6.1 Aprimoramentos na criação em massa de mosquitos transgênicos.....	62
4.2.6.2 Liberação de machos transgênicos em campo.....	64
4.2.6.3 Comparação entre os métodos de marcação.....	66
4.2.6.3 Visão geral da fase pré-supressão.....	68
4.2.6.4 Índice de esterilidade relativa - IER.....	69
4.2.7 Supressão de população.....	72
5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A – Artigo 1 Mosquito transgênico do paper para realidade.....	88
ANEXO B – Artigo 2 Mass production of RIDL <i>Aedes aegypti</i> for field releases in Brazil.....	95
ANEXO C – Mídia contendo arquivos de áudio e tabela.....	112
ANEXO C1 – Jingle do PAT – Projeto <i>Aedes</i> Transgênico	
ANEXO C2 – Spot do PAT – Projeto <i>Aedes</i> Transgênico	
ANEXO C3 – Tabela com todos os dados obtidos no projeto	

1 INTRODUÇÃO

As primeiras espécies de mosquito somente foram identificadas por volta do século XVIII, quando aspectos gerais de seu ciclo biológico também foram então elucidados. Até as últimas décadas do século XIX acreditava-se que mosquitos provocavam apenas incomodo através de sua picada, porém foi durante este período que se descobriu que os agentes etiológicos da filariose bancroftiana (*Wulchereria* sp.) e da malária (*Plasmodium*) são transmitidos pelos mosquitos. Houve então a necessidade de se conhecer melhor esses organismos e suas espécies para obter um estudo mais detalhado de sua biologia e estudar sua sistemática(CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATTINI 1996;). Posteriormente outros organismos classificados na mesma família (Culicidae) foram incriminados na participação da transmissão de vírus, principalmente vírus das famílias Flaviviridae e Togaviridae, onde entre essas famílias virais se destacam o vírus da febre amarela, dengue, chikungunya e algumas encefalites (St. Louis, Equina do Oeste e Leste, Japonesa e da Venezuela) (FIGUEIREDO, 2007). Desta forma a história natural dessas doenças recebeu uma atenção ainda maior, pois se conhecendo bem a biologia, descobrem-se pontos vulneráveis da transmissão sendo assim mais fácil combatê-las.

Em especial, o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) é designado o principal transmissor do vírus dengue em todo o mundo. Tanto a mortalidade quanto a morbidade dessa doença está em crescente aumento (GUBLER, 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009) 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de serem infectadas. A incidência de dengue aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos e anualmente são estimados por volta de 50 a 100 mil casos. No âmbito nacional, a dengue é a principal enfermidade transmitida por vetores. Entre junho de 2010 e junho de 2011 mais de 1,4 milhões de casos foram notificados ao Ministério da Saúde com 999 óbitos pela forma mais grave da doença – febre hemorrágica por dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). O quadro se agrava com a ausência de vacinas que sejam eficazes com os quatro sorotipos virais (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) e pela falta de medicação específica que combata o vírus, existindo apenas medicação para o tratamento paliativo dos sintomas. Em 30 de julho de 2010, após 20 anos, ocorreu a reintrodução do vírus DENV4 na cidade de Boa Vista (RR) através de um caso autóctone seguido de mais 11 casos. Isso implica que uma geração inteira de pessoas esteve fora do alcance deste sorotipo. Diante deste quadro, a preocupação com o controle da dengue passa a ter o mosquito como principal alvo(GUBLER, 2004; GUZMAN; ISTURIZ 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WHO, 2009; 2010).

A espécie *Ae. aegypti* é originária da África subsahariana, onde se domesticou e se adaptou ao ambiente criado pelo homem, tornando-se uma espécie extremamente antropofílica e também de hábito antropofágico, de forma geral é uma espécie sinantrópica de fácil adaptabilidade (FORATTINI, 2002). Foi por conta dessa adaptação e também pelo fato dos seus ovos entrarem no estado de quiescência que esta espécie teve a possibilidade de se propagar por toda faixa tropical e subtropical ao redor do mundo (TEIXEIRA, 1999). Essa distribuição se deve principalmente ao período das grandes navegações com o tráfego de escravos do continente africano para outras regiões do mundo, principalmente para o Brasil, acredita-se que nesse período, os ovos desse mosquito eram trazidos e deixados nas áreas portuárias onde lá encontraram as condições mínimas necessárias para se desenvolver. Assim também ocorreu com o vírus, que foi transportado em seus hospedeiros (vertebrados e invertebrados) infectados (BRYANT et al., 2007; TOMA et al., 2011). No Brasil há relatos desde 1846 de uma doença que se assemelharia com dengue, porém foi somente em 1981 que foi realizado o primeiro isolamento do vírus no estado de Roraima (região norte do país) pelo Instituto Adolfo Lutz (DE FIGUEIREDO et al., 2010).

Uma das primeiras tentativas de controle do vetor teve como foco o controle da febre amarela, através da parceria com a fundação Rockefeller e o Departamento Nacional de Saúde Pública onde foram iniciadas atividades de controle vetorial com uso de inseticidas e em 1947 a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) juntamente com a Organização Mundial de Saúde (WHO) formam um novo grupo para combate do vetor e formam a coordenação do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* no hemisfério oeste. Foi através dessas ações públicas que no final da década de 1950 o mosquito *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do território nacional. Porém durante a década de 1970 houve a reintrodução da espécie na pela região costeira do nordeste do país. E desde então o número de municípios que passaram a reportar a presença do vetor e da doença está aumentando (FUNASA, 2001; BRAGA; VALLE, 2007).

Conhecer o ciclo de vida do mosquito (figura 01) pode auxiliar no combate á doença, por exemplo, somente as fêmeas realizam repasto sanguíneo e durante o mesmo é que elas transmitem o vírus e machos não se alimentam de sangue. A alimentação sanguínea é necessária para o término do desenvolvimento dos ovos. Durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro já infectado as fêmeas se infectam com o vírus estando aptas a transmitirem o vírus para o próximo hospedeiro entre 07 e 14 dias (SALAZAR et al., 2007; TRAVANTY et al., 2004). De forma geral, o ciclo de vida passa por quatro estágios, ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos que podem ficar em estado de quiescência e permanecerem

viáveis no ambiente, esperando condições ideais para desenvolvimento por até um ano. Com o aumento da umidade, da disponibilidade de água nos criadouros e de alimento (condições favoráveis) as larvas eclodem e passam por quatro estádios (L1-L4) que tem duração de aproximadamente oito dias no total. Passada esta fase as larvas passam para o novo estágio, transformando-se em pupas. É nessa fase que ocorre a reorganização de todo material para a formação do adulto, esta fase assim como as demais é dependente da temperatura que tem duração de dois dias (quando em temperatura igual a 27°C), embora a pupa não se alimente, ela possui foto-sensibilidade e consegue se locomover na coluna d'água. Com o desenvolvimento do imago no interior da pupa ocorre então a emergência do adulto. E nas primeiras horas após a emergência ocorre o enrijecimento do exoesqueleto do inseto. Após a emergência do macho adulto, nas primeiras 24hs ocorre a torção da genitália para a garantia de sucesso de cópula, esse período também é necessário para produção em quantidade suficiente de espermatozoides para iniciar as cópulas, portanto o macho estará maduro sexualmente somente após este período. Por outro lado, a fêmea emerge pronta para realizar cópula e após a realização da cópula a fêmea não tem necessidade de realizar outra, pois ela armazena quantidade suficiente de espermatozoides nas espermatecas por todo o seu período reprodutivo. E após três dias ela realiza um repasto sanguíneo para o término da maturação dos ovos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998; FORATTINI, 2002).

Dessa forma, as estratégias utilizadas para combater o vetor são em geral atividades preventivas que envolvem medidas baseadas no manejo integrado que tem como pilares, ações de controle biológico, mecânico e químico. No Brasil, somente em 2008 e 2009 foram utilizados mais de 110 milhões de reais para combater a doença através de ações de combate ao vetor (SUAYA, et al. 2009). Mesmo com o alto investimento, o manejo integrado não é suficiente e não consegue lidar com a demanda. Dessa forma acaba sendo uma estratégia pouco eficaz, que se agrava com a falta de conscientização por parte da população, contribuindo para a prevalência da do vetor e da doença no ambiente (MACORIS et al., 1999; TAUIL, 2002).

Atualmente o uso de inseticida é a principal estratégia usada contra o vetor. Essa atividade iniciou usando principalmente DDT (organoclorado), carbamatos (propréter, propoxur), posteriormente organofosforados (como malathion e temefós), e piretróides (como deltametrina e cipermetrina) (MACORIS et al. 1999). O uso de temefós é bastante intenso sendo que somente entre 1997 e 2001 foram usados 33.833 kg, onde esta quantidade representou apenas 60% do total usado apenas no ano de 2003 (CARVALHO et al. 2004).

Figura 01 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*

As larvas eclodem dos ovos e passam por quatro estádios (aproximadamente dois dias cada estágio) até alcançarem a fase de pupa (duração de dois dias). Quando emergem os adultos, as fêmeas estão aptas a realizarem cópula e repasto sanguíneo, enquanto que o macho necessita de 24 horas para que ocorra a torção da genitália permitindo a realização da cópula.

Fonte: UNICAMP (2001)

Como se pode notar, em populações que apresentam a resistência ao inseticida empregado as medidas são maior frequência de aplicação do produto assim como aumento da dosagem a ser utilizada, mesmo quando o uso é combinado entre dois ou mais inseticidas. Outro ponto negativo do uso de inseticidas é o efeito adverso em organismos não-alvos, embora sejam desenvolvidos para atingirem um grupo específico, na maioria dos casos acaba gerando mortalidade em outras populações (SCHLEIER; PETERSON, 2010).

Atualmente uma ferramenta de grande potencial é o uso de *Bacillus thuringiensis israelensis*, ou Bti, como larvicida. Essa bactéria gram-negativa produz cristais durante a fase de esporulação que ao entrarem em contato com o trato digestivo das formas imaturas têm função de toxinas matando as larvas. Porém assim como para outros inseticidas, estudos científicos apresentam populações de *Ae. aegypti* resistentes as toxinas produzidas por Bti (CANTON et al., 2010; PARIS et al., 2010; 2011).

A resistência esta associada principalmente à maior eficiência no sistema de detoxificação do mosquito, enzimas como esterases, glutathioneS-transferases e reação monooxigenase fazem parte desse mecanismo. Genes que eram raros ou pouco expressos passam a ser mais frequentes e mais expressos em uma população, resultado de uma seleção

genética. Genes relacionados a resistência contra Bti, também estão envolvidos com a expressão, mudando sua taxa de transcrição, por exemplo a redução na expressão de receptores no intestino das larvas impede a interação das toxinas, outro mecanismo é quanto a modificação de algumas sequencias dos receptores que faz com que a ligação entre o receptor e a toxina não seja possível. Outro mecanismo envolve a redução na expressão de uma protease serina que ativa a família daprotoxina Cry no intestino do inseto. Essa seleção de mosquitos imunes a agentes químicos tem causado sérios problemas de saúde pública, além do controle do mosquito a cada dia ficar mais difícil, ainda temos o ressurgimento de parasitoides e viroses transmitidas por mosquitos (DARRIET et al., 2010; PARIS et al., 2010; 2012; BOYER; ZHANG; LEMPÉRIÈRE; 2011).

Frente aos problemas relatados e com a possibilidade de se agravar devido ao aquecimento global, há uma evidente necessidade de melhorar as atuais intervenções e também explorar alternativas para o controle do vetor, que sejam diferentes das estratégias atualmente utilizadas. Desde o início da década de 1960 tentativas de manipulação genética abriu espaço para controlar pragas e vetores. Primeiro com a utilização de radiação ionizante para provocar esterilidade em insetos e reduzindo assim a população alvo (ASMAN et al. 1981).

A técnica do inseto estéril (SIT – *Sterile Insect Technique*) de uma forma simplificada compreende a criação em massa de insetos machos, seguida de esterilização e liberação desse produto em uma área alvo, assim machos estéreis copulam com fêmeas selvagens e a prole gerada desse cruzamento é inviável. Por se tratar de cópula, esta é uma técnica espécie-específica, uma vez que o macho não copula com fêmeas de outras espécies. O uso dessa técnica esta baseada na exposição dos insetos a radiação que danifica permanentemente seu material genético, provocando esterilidade nesses indivíduos, e também na intensa liberação dos machos estéreis para garantir essa cópula (10 machos estéreis para cada macho selvagem) (ALPHEY 2002; 2008; BENEDICT; ROBINSON, 2003; DYCK et al., 2005; PHUC et al., 2007).

A primeira tentativa utilizando SIT em mosquitos foi realizada também no início da década de 1960 nos USA, com a utilização de raios gama de fonte de cobalto (Co^{60}) para gerar esterilidade em pupas macho. Neste estudo, nas duas áreas tratadas não foi possível confirmar o efeito de uma supressão populacional (MORLAN et al. 1962). Outras tentativas subsequentes com *Ae. aegypti* e outras espécies obtiveram resultados diversificados, mas de maneira geral todos relatam que, além desse sistema apresentar instabilidade, a radiação provoca perda de *fitness* dos machos, que os tornam menos eficientes e muito pouco

competitivos (THOMAS et al., 2000; ALPHEY, 2002; ALPHEY; ANDREASEN, 2002; BENEDICT; ROBINSON, 2003; DYCK et al., 2005; COLEMAN; ALPHEY, 2004).

Tabela 01 –Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT)

(continua)						
Organismo	Ano	Local	Esterilidade	N. Liberado	Objetivo	Resultado
<i>Aedes aegypti</i>	1960-1961	EUA	Ga	4,6 milhões por 43 semanas	Redução populacional	Apesar da esmagadora quantidade liberada de material selvagem, nenhum efeito foi concluído.
	1967	EUA	Ma	17 mil machos férteis por 2 semanas	Introgressão alélica morfológica	De 1084 ovos, dois cruzamentos foram para indivíduos marcados.
	1971	Índia	Tr	30 mil machos translocados por 4 semanas	Persistência da translocação em população selvagem	Machos foram competitivos e persistência da translocação foi observada.
	1971	Índia	Ma	~50 mil machos marcados por 4 semanas	Introgressão alélica em população selvagem	Machos foram competitivos e introgressão do alelo marcador foi observado.
	1974	Índia	Ch, Tr ou Sg	40.500 em 3 experimentos de 6 dias cada	Competitividade de cópula entre machos	Machos foram competitivos.
	1974	Quênia	Tr	57 mil por 10 semanas	Redução populacional e esterilização parcial	Esterilização parcial, mas não houve persistência em longo prazo de translocação nem um grande efeito na população de pupa e adultos.
<i>Aedes albopictus</i>	1975	Quênia	Tr	31.500 por 9 semanas	Redução populacional e dinâmica	Machos liberados acasalaram fêmeas selvagens, mas os ovos não foram depositados nas ovitrampas e progênie híbrida não sobreviveu a pupa.
	1990-1991	EUA	Ma	21 mil machos em 3 liberações	Diapausa e introgressão rara eletromórfica	Evidência de introgressão

Tabela 01 –Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT)

(continuação)						
Organismo	Ano	Local	Esterilidade	N. Liberado	Objetivo	Resultado
<i>Culex pipens</i>	1970	França	Tr	Centena de milhares por 8 semanas	Redução populacional e esterilização parcial	Persistência da translocação e redução populacional foram observadas
	1967	Mianmar	CI	5 mil diariamente por 9 semanas	Eliminação da população	População eliminada
	1968	EUA	Ch	2.500 machos diariamente por 8 semanas	Redução da população	Esterilidade aumentada, mas equilíbrio no número de jangadas de ovo.
	1969	EUA	Ch	930 mil machos por 12 semanas	Redução da população	Supressão populacional e/ou eliminação devido a liberação de machos estéreis.
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1973	Índia	CI+Tr ou Ch	11.400 machos em 2 experimentos de 9 ou 10 dias	Competitividade de cópula entre machos	Machos foram competitivos
	1973	Índia	Tr+CI	~23 milhões de machos por 14 semanas	Redução populacional, e esterilidade por incompatibilidade citoplasmática.	Esterilidade por incompatibilidade e translocação com redução populacional
	1973	Índia	Ch	38 milhões de machos por 25 semanas	Redução populacional e esterilidade	Até 90% das jangadas de ovos estéreis, mas nenhuma supressão populacional aparente.
	1977	EUA	Tr	76 mil machos por 4 semanas	Redução populacional	Nenhum efeito mensurável
<i>Culex tarsalis</i>	1978	EUA	Tr	180 mil machos por 2,5 meses	Competitividade masculina	Evidencia de cópula, mas dispersão e competitividade baixa. Sem evidencia de redução populacional.
	1979	EUA	Ga	13 mil machos em uma liberação	Redução populacional	Aumento da esterilidade no lote dos ovos.
	1981	EUA	Ch	85 mil machos por 8 semanas	Redução populacional e comportamento de cópula	Acasalamento observado e não houve redução populacional

Tabela 01 –Revisão dos principais programas utilizando a técnica do inseto estéril (SIT)

(conclusão)						
Organismo	Ano	Local	Esterilidade	N. Liberado	Objetivo	Resultado
	1982	EUA	Ma	159 mil machos e fêmeas por 6 semanas	Introgressão de mutação para cor de olhos carmin	Frequência alélica aumentada e persistiu em baixos níveis por até dois anos após o término das liberações
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	1977	Paquistão	Tr	167 mil por 2 semanas	Competitividade masculina	Machos competiram bem por fêmeas criadas em laboratório, mas não selvagens. Imigração impediu evidência de redução populacional
	1972	El Salvador	Ch	4,4 milhões de machos por 22 semanas	Desenvolvimento de metodologia e redução populacional	População eliminada
<i>Anopheles albimanus</i>	1977-1979	El Salvador	Ch, Ga	Centena de milhões de machos	Redução populacional	População suprimida em área de liberação, mas acredita-se que imigração reduziu o efeito.
	1979	Paquistão	Tr	3.100 machos em 1 liberação	Cópula com fêmeas selvagem e da colônia liberadas	Acasalamento não pareceu ter sido selecionado devido ao difícil processo de colonização. Machos eram competitivos.
<i>Anopheles culicifacies</i>	1980	Paquistão	Ch	7.500 machos em 1 semana	Cópula com fêmeas selvagem e da colônia liberadas	Machos menos competitivos, mas dispersão, <i>swarming</i> e cópula foram observadas.
<i>Anopheles gambiae</i>	1968-1969	Burkina Faso	Hy	240 mil por 9 semanas	Redução populacional	Nenhum efeito significativo. Dispersão alta, mas pobre competitividade.
	1959-1960	EUA	Ch	433.600 machos por 48 semanas em 2 localidades	Redução populacional e esterilização parcial	Nenhuma redução populacional, e nenhuma ou pouca esterilidade parcial foram observadas.
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	1962-1963	EUA	Ch	50 mil machos selvagens e da colônia	Competitividade masculina, comportamento, e métodos de esterilização.	Cópula com fêmeas selvagem e da colônia foi observado.

Abreviações: Ch, quimioesterilização; CI, incompatibilidade citoplasmática; Ga, radiação gama; Hy, esterilidade macho híbrido; Ma, apenas marcado (esterilidade não intencional); Sg, Segregação distorcida.

Fonte: Adaptada de Benedict; Robinson (2003)

Em paralelo, a tentativa de encontrar translocações cromossômicas promovidas pela radiação e com a utilização de quimioesterilizantes a fim de promover a esterilidade em machos, alguns estudos encontraram resultados promissores, mas que não geraram resultados subsequentes. Por outro lado, ocorreram problemas de criação em massa acabaram, tornando-se inviáveis, além de outros trabalhos que não obtiveram o resultado esperado (ASMAN et al., 1981; CURTIS et al., 1976; LOFGREN et al., 1974).

A utilização desses processos radioativos acarretam alterações somáticas no indivíduo que indiretamente interferem na capacidade desses insetos de copularem, uma vez que o processo gera perda de competitividade, entre outros parâmetros, no seu conjunto a perda de *fitness* do inseto. Curtis (1968) comenta que para se obter sucesso na técnica, tais modificações não devem ser deletérias para o inseto, embora qualquer modificação cause uma pequena redução em seu *fitness*. Além disso, o número de insetos que não eram estéreis era grande e a utilização insetos esterilizados por quimioesterilizantes mostrou um efeito acumulativo quando são usados como dieta para outros organismos, esterilizando assim também outros animais que porventura se alimentarem deles. Outra questão é quanto ao uso de fontes geradoras de radiação que expõem os trabalhadores humanos a pequenas, porém frequentes doses de radiação (BRACKEN; DONDALE, 1972; HELINSKI et al., 2009).

Dessa forma, com o advento das ferramentas de biologia molecular foram criadas novas abordagens que utilizam mecanismos mais complexos para a produção de organismos modificados geneticamente. Utilizando essas ferramentas, essas modificações permitem utilizar genes de outras espécies e assim alcançar o objetivo de controle da doença ou da população vetora de uma forma mais direta, pontual e eficiente. Então, nesse tipo de abordagem temos pelo menos duas metodologias, a primeira visa promover uma substituição populacional em uma determinada área, enquanto que a segunda tem como objetivo suprimir a população não-transgênica (tipo selvagem) a níveis que promovam um colapso populacional, interrompendo o ciclo de transmissão da doença (CARTER; HURD, 2010; VONTAS et al. 2010).

1.1 Substituição de população

Esta estratégia consiste em disseminar um novo gene dentro de uma população de mosquitos numa determinada área, dessa forma a população a cada geração será substituída e passa a ter com mais frequência esta nova informação transgênica inserida no genoma (figura 02). Grande parte das linhagens transgênicas obtidas em laboratório está contida nesse grupo,

elas têm como função expressar genes que de alguma forma impeçam o agente etiológico de completar seu ciclo e/ou de ser transmitido para o próximo hospedeiro (CATTERUCCIA et al., 2009; HAY et al., 2010).

Para exemplificar, a linhagem transgênica que expressa moléculas efetoras contra o vírus dengue sorotipo DENV-2 (ADELMAN et. al., 2002), a construção expressa no mosquito um fragmento de RNA específico do vírus dengue, este RNA dupla fita acaba ativando a via do RNA de interferência (RNAi) inibindo a replicação viral no mosquito e interrompendo seu ciclo, consequentemente a transmissão. Esta linhagem foi capaz de bloquear a transmissão do sorotipo DENV-2. Embora o autor comente que alguns indivíduos ainda fossem capazes de transmitir o vírus. E que esse escape possa ser causado por sutis diferenças fisiológicas que cada indivíduo apresenta, incluindo o próprio vírus que pode ter meios de escapar. O autor ainda salienta que a linhagem não foi capaz de bloquear a transmissão do sorotipo DENV-4 (ADELMAN et al., 2002; FRANZ et al., 2006; TRAVANTY et al., 2004).

A expressão de múltiplas moléculas efetoras, reguladas por diferentes promotores em tecidos diferentes, pode ser necessária para reduzir a intensidade da infecção à zero. Além disso, múltiplas moléculas efetoras, com mecanismo de ação diferente, são necessárias para evitar potencial seleção por resistência a uma molécula efetora ou mecanismo-alvo (KOKOZA et al., 2010; MATHUR et al., 2010). Embora a maior dificuldade nesta estratégia seja em como disseminar o transgene dentro da população (HAY et al., 2010; MARSHALL; HAY, 2011; WINDBICHLER et al., 2007; YAHARA et al., 2009).

Figura 02 –Esquema de substituição de população por introdução gênica

Liberação de machos em uma população para introduzir um gene onde a frequência dos genes aumenta conforme se mantém as liberações em campo, neste caso a espécie não é eliminada ou suprimida, apenas substituída.

Fonte: Carvalho (2012)

1.2 Supressão de população

Reduzir o número de uma população existente em uma determinada área, através da liberação contínua e suficiente de machos (estéreis ou portadores de uma desvantagem dominante) ao longo do tempo, causa o colapso dessa população. Assim, com menos mosquitos disponíveis menores serão as chances de transmissão do patógeno no ciclo vetor-hospedeiro(DYCK et al., 2005).

Baseada no princípio da SIT, uma nova abordagem para supressão de população é apresentada com o advento da tecnologia RIDL (*Release of Insect carrying a Dominant Lethal gene*) que compreende a liberação de machos portadores de um gene letal condicionado, ou seja, apenas em uma determinada condição o gene será expresso. Estes machos transgênicos copulam com fêmeas selvagens e transmitem este gene letal para sua prole (figura 03). Os indivíduos portadores desse gene são impedidos de alcançar a fase adulta (fase de transmissão da doença). E isso se dá por não conseguirem sobreviver no ambiente na ausência de um “antídoto”. Dentre as diversas vantagens com a utilização dessa tecnologia RIDL, a mais atraente é que não faz uso de fonte de radiação ionizante. Não há necessidade de cada lote a ser liberado no ambiente ser tratado com nenhum tipo de radiação ou produto químico, pois os organismos já nascem com o gene letal condicionado inserido em seu genoma. A intenção é utilizar esta tecnologia em conjunto com as estratégias de controle já utilizadas, mas que por si mesmas não alcançam o efeito esperado (ALPHEY; ANDREASEN, 2002; BENEDICT; ROBINSON, 2003; LEE et al., 2009; NAZNI et al. 2009; PHUC et al., 2007; THOMAS et al. 2000).

No âmbito dessa tecnologia, a Oxford Insect Technology (Oxitec Ltd., Oxford, Inglaterra), empresa que tem como foco o desenvolvimento de tecnologia para o combate de insetos com o uso de linhagens transgênicas, desenvolveu linhagens de *Ae. aegypti* para controle populacional. Atualmente a linhagem OX513A foi a primeira que mostrou os melhores resultados em laboratório, tendo grande possibilidade de ser testada em campo. Testes realizados nas Ilhas Caiman mostraram a eficiência dessa linhagem na supressão de população do mosquito em uma pequena área que esta livre do vírus causador da dengue(HARRIS et al. 2011). Esta linhagem transgênica foi gerada a partir de uma linhagem laboratorial (Rockfeller) que é susceptível a inseticidas, através de microinjeções de solução com o transgene em ovos embrionados de *Aedes aegypti* (MCGRANE et al., 1988; JASINSKIENE et al., 2007).

Figura 03–Esquema de supressão de população por transmissão de gene letal

Liberação de machos em uma população para transmissão do gene letal para sua prole matando os portadores do gene, conforme são realizadas as liberações em campo, neste caso a espécie pode ser eliminada ou suprimida.

Fonte: Carvalho (2012)

Como principal característica esta linhagem apresenta o sistema letal, e também um marcador genético. Essa marcação é promovida pela expressão da proteína vermelha fluorescente (DsRed2 - com comprimento de onda entre 563 a 582 nm) (GROSS et al., 2000) no exoesqueleto do inseto promovido pelo promotor de actina Act5c (PHUC et al., 2007), que foi inserida juntamente com o sistema letal e possui duas funções interligadas, a primeira é marcar de forma irrefutável a linhagem transgênica, a segunda é quanto ao monitoramento e avaliação do projeto, pois somente uma marcação eficiente facilita a identificação do mosquito modificado o que gera economia no tempo de identificação com ampla margem de segurança. Pois um marcador molecular (DNA) tende a ser mais polimórfico e muito heterogêneo, diferentemente de um marcador protéico, como a proteína DsRed2 (BEHURA, 2006; HOY, 2002).

Figura 04 – Esquema do transgene LA513 da linhagem OX513A de *Aedes aegypti*

Utilizando o elemento de transposição piggyBac, os mosquitos transformados são identificados pela fluorescência DsRed2.

Fonte: Phuc et al. (2007)

Na figura 04 é apresentado o esquema do transgene LA513A que promove a mortalidade das larvas e que foi microinjetado nos embriões. Este transgene é constituído pelo sistema ativador de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV). A proteína tTA, que é produto do sistema tTAV, se liga e ativa a expressão do elemento de resposta à tetraciclina (tRE), uma sequência que inclui cópias múltiplas da sequência específica de DNA a que o tTA se liga, isso ativa a sequência tetO. Que por sua vez promove a expressão exacerbada de tTA por retroalimentação positiva (*feedback* positivo). A expressão em altos níveis de tTA é deletéria às células dos mosquitos, pois modifica a taxa de transcrição normal das células (figura 05A). O gene é condicional, pois a proteína tTA se liga à tetraciclina com alta afinidade, logo, o antibiótico atua como um interruptor regulando a expressão - na ausência deste antibiótico. A proteína tTA induzirá a expressão de tRE, enquanto que na presença de tetraciclina esse processo é interrompido (figura 05B). A expressão basal de tTA é posteriormente bloqueada por tetraciclina nos mosquitos transgênicos e não tem efeito detectável nos mosquitos transgênicos independente da fase de desenvolvimento (FU et al., 2007; FURTH et al., 1994; GONG et al., 2005; GOSSEN et al., 1994; LYCETT et al., 2004; ZHANG et al., 2009).

Figura 05 – Representação do sistema da letalidade condicional

A letalidade condicional causada pela presença ou ausência de tetraciclina. (A) situação na ausência de tetraciclina que induz a morte no mosquito, onde a proteína tTA se liga ao elemento tRE produzindo tetO e por retroalimentação positiva modifica a taxa de transcrição normal das células e passa a ser deletério; (B) situação na presença de tetraciclina, onde tTA tem mais afinidade por tetraciclina que pelo elemento tRE, nessa condição a maquinaria letal é interrompida e o mosquito alcança a fase adulta.

Fonte: Oliveira et al. (2011)

Com o estabelecimento dessa linhagem, tendo sua caracterização e testes preliminares em ambiente natural, temos uma nova ferramenta que necessita ser avaliada e colocada à prova para que possa ser apresentada às autoridades responsáveis como uma nova estratégia oficial no combate ao vetor e consequentemente à doença. Dessa forma visamos apresentar os efeitos da liberação de uma linhagem transgênica em campo. Testes no Brasil foram realizados por este projeto aqui apresentado sob aprovação da Comissão Técnica Nacional de

Biossegurança (CTNBio) como publicado no Diário Oficial da União (página 48 da secção 1 nº 241, de sexta-feira, 17 de dezembro de 2010) que permite a realização de testes em campo utilizando a linhagem transgênica OX513A de *Ae. aegypti* apenas nos sítios de estudo selecionados no município de Juazeiro no estado da Bahia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliação da tecnologia RIDL com criação em massa e atuação em campo da linhagem de *Ae. aegypti* OX513A para controle da população selvagem em uma localidade do município de Juazeiro (BA).

2.2 Específico

- Informar a população quanto ao uso dessa tecnologia referente os riscos e benefícios gerados.
- Realizar testes de competitividade e compatibilidade da linhagem OX513A.
- Estimar a dispersão da linhagem OX513A através da técnica de marcação liberação e recaptura (MLR).
- Calcular a taxa de recaptura ou a longevidade.
- Realizar teste de pré-supressão encontrar os parâmetros necessários para iniciar a supressão de população selvagem.
- Iniciar a fase de supressão da população de *Aedes aegypti* em uma localidade no município de Juazeiro (BA).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Colonização da linhagem selvagem Itaberaba (Ita)

No bairro de Itaberaba, município de Juazeiro, Bahia foram colocadas 21 ovitrampas (detalhes item 3.2 de material e métodos) para o início do monitoramento. As paletas dessas armadilhas foram levadas ao laboratório, secas e colocadas individualmente em água para a eclosão das larvas. Os animais foram mantidos até a fase adulta para a identificação individual da espécie *Aedes aegypti*. Depois da identificação, foi montada uma gaiola contendo adultos de ambos os sexo, os adultos foram deixados por 3 dias para a realização da cópula, onde foram mantidos com solução de sacarose 10% (p/v) embebida em chumaços de algodão *ad libitum*. Após a cópula, as fêmeas foram alimentadas artificialmente com sangue e realizada a postura dos ovos. Estes foram recuperados e eclodidos para a expansão da colônia.

3.1.2 *Aedes aegypti* não transgênicos

As colônias dos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (cepa Higgs e cepa Ita) foram mantidas no Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados localizado na Moscamed Brasil, Juazeiro, Bahia ou no Biotério de insetos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II –ICB II– da Universidade de São Paulo – USP, de acordo com o experimento. Os mosquitos foram mantidos sob a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $80\% \pm 10\%$ e fotoperíodo (16h luz; 8h escuro). Os adultos foram alimentados com sacarose 10% (p/v) *ad libitum* com chumaços de algodão embebidos na solução. Nos experimentos realizados na USP as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em camundongos da linhagem Balb/c anestesiados com injeção de cloridrato de xilazina 0,3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg. Nos experimentos realizados na Moscamed Brasil, o repasto sanguíneo foi realizado com o auxílio de um alimentador artificial Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Inglaterra) com sangue animal obtido em um abatedouro local. Três dias após a alimentação sanguínea, um recipiente plástico revestido com papel filtro e contendo água foi colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem a oviposição. A postura era retirada da gaiola após três dias e seca por 24 horas.

As larvas foram eclodidas de maneira sincronizada em água autoclavada armazenada em pote fechado hermeticamente. As larvas foram alimentadas com ração para peixe triturada Vipran Premium[®] (SeraGmbH, Heinsberg, Alemanha).

3.1.3 Manutenção da linhagem transgênica OX513A

A linhagem OX513A é portadora de um transgene que promove uma letalidade condicionada (como mencionado anteriormente) e necessita de um complemento em sua dieta para que o sistema letal seja desativado e permita que as larvas cheguem à fase adulta. Logo, para promover a criação da colônia, fez-se a adição do antibiótico (tetraciclina) em cada bandeja de criação para uma concentração final entre 30 µg/ml. Os demais processos de criação são idênticos aos descritos no item 3.1.2.

3.1.4 Produção em larga escala

Para manter constantes as liberações ao longo do tempo faz-se necessário a manutenção de uma colônia para produção de ovos que serão usados para os lotes de liberação.

3.1.4.1 Colônia para produção de ovos

As larvas foram eclodidas de maneira sincronizada em água autoclavada armazenada em pote fechado hermeticamente por 60 minutos, passado este períodoo conteúdo dos potes era concentrado com auxílio de uma peneira (granulométrica com abertura de 0,075 mm) em um Becker para um volume final conhecido de 300ml. Este Becker era colocado em um agitador magnético com uma barra magnética e eram retiradas três amostras para contagem do número de ovos eclodidos e não-eclodidos. Em cada amostra eram escolhidos três campos aleatórios para realização dessa contagem em estereomicroscópio luz incidente. A taxa de eclosão se dá pela razão entre o número de ovos eclodidos pelo número total de ovos (eclodido e não eclodido). No caso da taxa de eclosão desses ovos fosse inferior a 70%, então mais ovos eram colocados para eclodir seguindo as duas fórmulas (01 e 02) abaixo usando o resultado de uma na outra:

$$Y = (taxa\ de\ eclosão \times 7,8) \div 100 \quad (01)$$

$$grama\ adicional = (7,8 - Y) \div 1,3 \quad (02)$$

Caso a taxa fosse igual ou superior a 70%, não havia a necessidade de eclosão adicional de ovos. O conteúdo dos potes de eclosão era transferido para uma bandeja plástica (com 53x37x8 cm) onde permanecia por aproximadamente 24 horas (bandeja de espera noturna). Quando então uma nova taxa de eclosão era realizada e registrada. Do concentrado de larvas usado para calcular a taxa de eclosão, também eram retiradas quatro amostras de 01 ml para contagem e estimativa de larvas/ml. Com a média de larvas multiplicada pelo volume conhecido no Becker obtêm-se a estimativa do número total de larvas. Como a quantidade desejada é de 9.000 larvas por bandeja de criação (com 53x37x8 cm), divide-se o número total de larvas pelo número desejado por bandeja (9.000) e se tem a quantidade de bandejas possíveis que se pode montar. O volume conhecido no Becker é então dividido entre o número de bandejas totais, resultando no volume que cada bandeja de criação deve receber (que irá conter 9.000 larvas). Nas bandejas de criação foram colocados quatro litros de água, o volume do concentrado de 9.000 larvas. E foi adicionada a ração para peixe triturada Vipán Premium® para as larvas conforme o regime de alimentação apresentado na tabela 01.

Tabela 02 – Regime de alimentação das larvas

Dias após eclosão	Gramas por bandeja	Gramas por larva
01	0,54	0,00006
02	0,72	0,00008
03	1,44	0,00016
04	2,79	0,00031
05	5,76	0,00064
06	2,88	0,00032
07	2,88	0,00032
08	2,88	0,00032
09	2,88	0,00032
10	1,44	0,00016
11	1,44	0,00016

Regime de alimentação baseado na necessidade alimentar de cada larva por dia de desenvolvimento utilizando a ração para peixe Vipán Premium®.

Fonte: Carvalho (2012)

As pupas foram separadas das larvas e foi realizada a sexagem em machos e fêmeas através do separador de pupas de vidro, também conhecido como máquina de Hock (John W. Hock, Gainesville, FL), que forma um gradiente gerado pelo tamanho das pupas (pupas larvas são menores que as pupas de macho que são menores que pupas de fêmea). As larvas retornavam para as bandejas de criação com o volume de água e tetraciclina além de receberem a quantidade de comida referente ao dia após a eclosão.

As pupas eram transferidas para gaiolas para a emergência do adulto e manutenção da colônia. Em cada gaiola (30 cm Ø X 30 cm de altura) eram colocadas 3.000 fêmeas e 1.000 machos. Após a emergência dos adultos e acasalamento, era realizado repasto sanguíneo com o auxílio de um alimentador artificial (Hemotek) com sangue animal obtido em um abatedouro local. Três dias após a alimentação sanguínea, um recipiente plástico revestido com papel filtro e contendo água foi colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem a oviposição. A postura era retirada da gaiola após três dias e seca por 48 horas.

3.1.4.2 Produção de machos para liberação em campo

O modelo de produção em massa segue os mesmos critérios da manutenção da colônia de produção de ovos (descrito no item 3.1.4.1) até o desenvolvimento das pupas no oitavo dia após a eclosão. Neste momento, as pupas foram separadas das larvas e foi realizada a sexagem em machos e fêmeas através do separador de vidro (como anteriormente). Porém as pupas foram submetidas a um controle de qualidade para verificar a contaminação de fêmeas no grupo dos machos e vice-versa. Caso houvesse contaminação o processo de sexagem no separador de vidro era repetido. As pupas fêmeas e as larvas foram descartadas, e mantidas apenas as pupas de macho. Fazia-se a contagem de 500 pupas e calibrava-se um dosador para facilitar o processo de montagem dos potes de liberação. Esse dosador era constituído de uma barra de acrílico com um orifício em uma das extremidades com um dos lados revestido por uma malha metálica que impedisse a passagem de pupas através dela. Dessa forma a calibração gerava a cada vez uma quantia por volta de 500 pupas. Aleatoriamente escolhiam-se três amostras depois da calibração e contava-se o número de pupas para certificar-se da média e se havia contaminação por pupas fêmeas.

Então cada amostra obtida no dosador era acondicionada em um pote de liberação para a emergência dos adultos. O pote de liberação era constituído de um pote plástico redondo transparente (14 cm Ø x 15 cm altura) com capacidade para 1.800 ml e com a face interna lixada (lixa de papel folha d'água grana 100), a ponto de terem uma superfície áspera e repleta de ranhuras. As pupas foram mantidas em 150 ml de água e os potes tampados com pedaço de tecido voil para permitir ventilação. Um chumaço de algodão hidrófilo embebido em solução de sacarose (10% p/v) era oferecido *ad libitum* para os adultos recém emergidos até o momento da liberação.

3.2 Captura de ovos e de adultos

A coleta de ovos no local de estudo foi feita com armadilhas do tipo ovitrampa (FAY; EALISON, 1966), que compreende um recipiente escuro (vaso plástico de planta de aproximadamente 500ml) com água (proveniente do sistema de abastecimento local) e com uma palheta de aglomerado de madeira em seu interior (recortes de chapa de aglomerado – Eucatex de 12x2,5X0,3 cm) (figura 06). Estas armadilhas foram rotuladas com adesivo com a seguinte informação: “Armadilha de captura de ovos do mosquito da dengue” com o nome do projeto e as instituições participantes, além de um número de telefone para contato.

Figura 06 – Armadilha de captura de ovos - ovitrampa

Armadilha utilizada durante o monitoramento antes e durante o período de liberação dos mosquitos transgênicos. A armadilha consiste em um recipiente plástico preto, com uma palheta de aglomerado de madeira no interior do recipiente parcialmente imersa com água comum.

Fonte: Carvalho (2012)

As palhetas coletadas semanalmente em campo eram encaminhadas para o laboratório de análises de campo da biofábrica Moscamed Brasil, onde eram colocadas para secarem em condições laboratoriais ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar de $80\% \pm 10\%$) por três dias, após este período os ovos eram contados na própria palheta e os dados registrados. Após a contagem, as palhetas eram colocadas em potes de eclosão individuais. Potes similares ao descritos no item 3.1.2. A palheta era colocada no pote e permanecia por um intervalo mínimo de 12 horas. O conteúdo do pote era filtrado em papel de filtro em sistema de kitassato com funil Büchner de placa porosa conectado a uma bomba à vácuo. O papel de filtro contendo as larvas recém-eclodidas era levado para análise em estereomicroscópio com luz fluorescente com filtro Texas Red (visualização da proteína DsRed2) e o estado da fluorescência das larvas da palheta era registrado em planilhas para posterior análise.

Para a captura das formas adultas do inseto foi utilizado um aspirador elétrico (NASCI, 1981) que foi confeccionado na oficina do setor de operações da biofábrica

Moscamed Brasil. Este aspirador utiliza bateria de 12 V utilizada em motocicletas e foram utilizados canos de PVC encaixados com uma hélice em uma das extremidades, para que gere empuxo no interior do cano sugando mosquitos que estiverem próximo a extremidade oposta, nesta foi encaixado outro fragmento de cano PVC com fundo de tela metálica para aprisionar os mosquitos de cada amostra (figura 07). Todos os mosquitos capturados foram mortos por congelamento e identificados.

Figura 07 – Aspirador elétrico para captura de mosquitos adultos

Aspirador elétrico (bateria 12 V). A – Sentido do fluxo de ar e aspecto geral do equipamento; B – localização e detalhe da hélice; C e D – detalhamento dos fragmentos de cano PVC para encaixe e coleta dos mosquitos.

Fonte: Carvalho (2012)

3.3 Marcação liberação e recaptura – MLR

Técnica realizada para os experimentos de dispersão dos mosquitos machos liberados e também determinação da longevidade por taxa de recaptura desses mosquitos no ambiente.

3.3.1 Marcação

Foram utilizados dois métodos de marcação detalhados nos itens a seguir.

3.3.1.1 Método do floco de isopor

Machos transgênicos e machos selvagens foram criados separadamente (de acordo com o item 3.1). A marcação foi feita em um sistema de potes plásticos encaixáveis, o primeiro pote recebia 1000 pupas machos com aproximadamente 150 ml de água. Um segundo pote com fundo cortado, recebia uma tela de metal com orifícios de 01 cm X 01 cm. Sobre a tela eram colocados pedaços de isopor recobertos de pó fluorescente (Bioquip Products Inc. Califórnia, EUA) de uma mesma cor, este então era colocado sobre o pote contendo as pupas (figura 08). O conjunto de potes era acondicionado no interior de uma gaiola de liberação para emergência dos adultos, dessa forma os adultos necessariamente teriam que esbarrar nos flocos de isopor com pó fluorescente para alcançarem o lado de fora do pote. Após dois dias os potes de marcação eram removidos do interior da gaiola de liberação, estas gaiolas eram colocadas no interior de sacos plásticos e transportadas para o ponto de liberação.

Figura 08 – Sistema de marcação de adultos: método do floco de isopor

Em sequência da esquerda para direita: pote com fundo substituído por tela metálica; flocos de isopor para impregnação do pó-fluorescente; flocos impregnados com pó; e estrutura completa de marcação.

Fonte: Carvalho (2012)

3.3.1.2 Método do pote marcado

Este método consiste utilizar os próprios potes de liberação como fonte de marcação dos mosquitos usando o mesmo tipo de pó fluorescente. O pote que já tinha a face interna lixada recebeu 0,3g de pó fluorescente (figura 09) foi tampado e por agitação manual o pó foi espalhado até estar o mais impregnado possível na parede interna do pote se fixando nas ranhuras do mesmo, retira-se o excesso caso seja necessário.

Figura 09 – Sistema de marcação de adultos: método do pote marcado

Pote de liberação com 0,3 g de pó-fluorescente e 500 pupas. Pote com ranhuras internas para melhor adesão do pó-fluorescente e dos mosquitos, este pote foi tampado com um pedaço de tecido voil para permitir ventilação no interior do pote.

Fonte: Carvalho (2012)

3.3.2 Liberação

As liberações ocorreram de acordo com a necessidade dos experimentos de dispersão e taxa de recaptura.

3.3.3 Recaptura

Após 24 horas da liberação iniciou uma coleta ativa com aspiradores descritos anteriormente no item 3.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 No laboratório

4.1.1 Teste de letalidade condicionada

Primeiramente foi realizado um teste para averiguar a letalidade condicionada da linhagem OX513A, da forma como ela foi elaborada. Para tanto foram usados dois lotes de 50 larvas transgênicas mantidas na ausência ou na presença de tetraciclina, este experimento teve 10 repetições. Os resultados mostraram que no 5º dia de observação as larvas mantidas em tetraciclina já haviam passado para o estagio de pupas (tabela 03). Entretanto, as larvas na ausência de tetraciclina permaneceram nesse estagio por vários dias. Podemos notar no gráfico 01 que o período larval dos animais controle 100% das larvas desenvolvem as pupas até o 10º dia após a eclosão. Por outro lado, nos animais mantidos sem a tetraciclina, no 10º dia 32% estavam na fase de larva, 66% das larvas transgênicas haviam morrido e 2% delas se mantiveram nesse estagio até 30 dias após a eclosão. Dessa forma foi possível constatar que a linhagem OX513A, como previsto pela construção transgênica tem a necessidade da ingestão do antibiótico durante a fase larval.

Tabela 03 – Número de larvas remanescentes na presença e ausência de tetraciclina ao longo do tempo

Dia de observação	Com Tetraciclina	Sem Tetraciclina
1º	50	50
5º	37	50
10º	16	0
15º	3	0
20º	1	0
25º	1	0
30º	1	0

Larvas de primeiro estágio (OX513A) foram utilizadas para cada uma das condições, que foram mantidas nas mesmas condições do insetário. As larvas vivas remanescentes foram contadas num intervalo de cinco (05) dias e mantidas até a fase adulta quando possível.

Fonte: Carvalho (2012)

Gráfico 01 – Taxa de mortalidade de larvas na presença e ausência de tetraciclina

Larvas transgênicas foram mantidas em recipientes na ausência e na presença de tetraciclina e o número de mortos foi recordado para cálculo da taxa de mortalidade.

Fonte: Carvalho (2012)

4.1.2 Preferência sexual das fêmeas selvagens (Higgs)

Vinte e cinco fêmeas selvagens de *Aedes aegypti* foram coladas em copos de cópula com 25 machos transgênicos e 25 machos selvagens, onde foram mantidos por 03 dias para a realização da cópula. Após esse período, as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo e 72 horas após foram isoladas para a oviposição individual, em tubos de vidro para oviposição (25x150mm de fundo chato) com algodão umedecido no fundo e recoberto com pedaço de papel de filtro. Cada fêmea foi individualizada em um desses tubos com o número de referência da gaiola em que estavam. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas com lotes biológicos diferentes. As larvas foram eclodidas mantendo a individualidade do grupo e no estágio L3 foram submetidas a exame em estereomicroscópio com fluorescência para determinação do macho com qual a fêmea foi copulada, pois as larvas transgênicas possuem marcação fluorescente.

Os resultados mostraram que 43% das fêmeas copularam com machos transgênicos e 57% com os machos selvagens (gráfico 02). O teste estatístico de Mann-Whitney mostrou no que se diz respeito a essa preferência que não existe diferença estatística quanto a escolha entre machos selvagens Higgs e machos transgênicos OX513A ($p=0,343$), ou seja, as fêmeas

selvagens Higgs não distinguem diferenças aparentes entre os dois tipos de macho para realização da cópula.

Gráfico 02 – Porcentagem de escolha das fêmeas selvagens

Fêmeas virgens foram colocadas na presença de machos transgênicos e selvagem para determinação da preferência de cópula. Teste estatístico de Mann-Whitney com $p=0,343$ e desvio padrão igual a 10,5.

Fonte: Carvalho (2012)

4.1.3 Outros dados observados

Através das posturas obtidas do experimento anterior (preferência sexual das fêmeas – item 4.2), o número de ovos, número de larvas e a taxa de eclosão foram anotados e utilizados em análises. Com relação a quantidade de ovos que uma fêmea copulada com um macho transgênico ou com macho selvagem é capaz de produzir, foi possível inferir que estatisticamente não há diferença significativa em relação ao número de ovos depositados entre essas fêmeas, como mostra a tabela 04 (teste Mann-Whitney com $p=0,557$). O mesmo ocorre com o número de larvas (tabela 04) que eclodem desses ovos ($p=0,443$), confirmando que estatisticamente não há diferença significativa entre fêmeas que copulam com machos transgênicos ou selvagens com o mesmo teste. Com a taxa de eclosão, também não houve diferença estatística entre a linhagem selvagem e transgênica, como mostrado na tabela 04, e dado pelo teste de Mann-Whitney com $p=0,309$. Experimento similar realizado por Lee (2009) também mostrou que não houve diferença estatística entre a linhagem transgênica e uma linhagem selvagem da Malásia.

Tabela 04 – Avaliação entre as linhagens Higgs e OX513A quanto a quantidade de ovos e larvas

Exp.	Higgs				OX513A			
	N° ♀	Ovos	Larvas	% eclosão	N° ♀	Ovos	Larvas	% eclosão
1°	25	1.100	829	75	25	1.258	1.042	83
2°	25	1.059	940	89	25	951	666	70
3°	25	882	663	75	25	984	659	67
4°	25	1.077	679	63	25	1.072	747	70
Total	100	4.118	3.111	76	100	4.265	3.114	73

Dados obtidos durante o experimento de preferência das fêmeas, após a oviposição e eclosão o número de ovos e larvas foi registrado e analisado. Teste de Mann-Whitney com $p=0,557$ para o número de ovos, 0,443, para o número de larvas e 0,309 para a taxa de eclosão.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2 No campo

4.2.1 Área para liberação dos machos

A escolha da área de estudo teve fatores e necessidades específicas para que possibilitassem obtenção de dados consistentes e irrefutáveis, e que pudesse gerar benefícios para a comunidade. O primeiro fator é quanto ao isolamento da área, que pode ser da forma mais comumente conhecida como ilha geográfica, uma área apropriada de terra circundada por água a uma distância que não possa haver migração para dentro ou fora da ilha, o outro tipo de isolamento é conceitualmente conhecido como ilha ecológica, onde em uma determinada área se possa ter a mesma característica de uma ilha geográfica, mas neste caso circundado por uma área inóspita ou similar que da mesma forma isole a área de interesse impedindo que exista algum tipo de migração. A região da depressão são-franciscana pertence ao bioma da Caatinga e esta região apresenta ilhas ecológicas urbanizadas, ou seja, pequenas áreas de civilização humana (suficientemente capazes de manter o ciclo de vida dos mosquitos e por muitas vezes dovirus) circundadas pela vegetação e clima típico da Caatinga que não oferece condição favorável para o desenvolvimento da espécie *Aedes aegypti*, dessa forma, um estudo com liberação de transgênicos, por exemplo, ficaria contido nessas áreas sem sofrer influência das áreas circunvizinhas. E é na depressão são-franciscana pertencente ao estado da Bahia, que se localiza o município de Juazeiro, este foi escolhido por apresentar áreas com essa característica de ilhas ecológicas urbanizadas, entre outros fatores a serem apresentados a seguir.

Na escolha da área de estudo foi levado em consideração a presença do vetor selvagem, mas não a presença do agente etiológico. Quanto às necessidades locais, podemos citar o grau de desenvolvimento da área e a presença de organizações que possam contribuir favoravelmente para o desenvolvimento do estudo no local. Neste caso, Juazeiro conta com a presença da biofábrica Moscamed Brasil (local onde se encontra o anexo do laboratório de mosquitos geneticamente modificados do Instituto de Ciências Biomédicas - ICBII). A biofábrica (organização social sem fins lucrativos para o controle da praga agrícola *Ceratitis capitata*) já possui ampla atuação na criação em escala industrial de insetos para programas de liberação de moscas estéreis para supressão de população. Dessa forma foi possível utilizar essa experiência e espaço físico para a produção em larga escala da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti* para supressão de população. Outra instituição participante foi a prefeitura de Juazeiro que também teve contribuição na escolha do sítio de estudo, pois através dos agentes de saúde foi realizado um levantamento dos bairros e distritos que possuíam os maiores índices larvais, que porventura tiveram casos de dengue e que possuísem isolamento ecológico necessário. Uma área candidata tende a ser compacta (por volta de 0,5 km²) com população humana com condições de manter o ciclo de vida do mosquito, e que leve em consideração a logística.

Assim, sete áreas foram selecionadas como pré-candidatas para teste em campo da tecnologia RIDL. De todas as áreas o bairro de Itaberaba apresentou uma vantagem em relação às demais. Pois com a constante falta de água no bairro a população é forçada a armazenar água em caixas de água de solo, containers e outros reservatórios. Assim, a flutuação populacional de mosquitos no bairro não depende apenas da pluviosidade, e dessa forma não havia necessidade de aguardar o período de seca ou o chuvoso para iniciar as liberações.

Para realização deste estudo, o projeto teve como base as normas propostas pelo protocolo de Cartagena, juntamente a lei brasileira nº 11.105, de 24 de março de 2005, além das solicitações da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Como publicado no Diário Oficial da União (página 48 da seção 1 nº 241, sexta-feira, 17 de dezembro de 2010) a CTNBio autorizou a liberação em campo da linhagem transgênica OX513A de *Ae. aegypti* no sítio de estudo selecionado no município de Juazeiro no estado da Bahia.

4.2.1.1 Bairro de Itaberaba

Este bairro possui aproximadamente 1.400 casas com uma população humana estimada de 7.000 pessoas em uma área total de 55 ha e uma população humana de baixo poder aquisitivo. As ruas em sua maioria não são pavimentadas e há um precário sistema de abastecimento de água que obriga a população a armazenar água em reservatórios ao nível do solo ou em cisternas (figura 10), além de precário sistema de coleta de esgoto, quando existente. Dessa forma os reservatórios de água se tornam excelentes criadouros para *Ae. aegypti*, razão a qual esta área tem a presença do mosquito durante todo o ano, não dependendo da estação chuvosa para completar o ciclo, no entanto na época chuvosa esses números também tendem a aumentar (dados apresentados a seguir). Embora a prefeitura faça as intervenções necessárias no bairro, desenvolvendo atividades de conscientização, com busca, eliminação e tratamento dos criadouros com larvicida, ainda assim não é suficiente para controlar o mosquito e consequentemente a doença.

Figura 10 – Visão geral do bairro Itaberaba

A - bairro Itaberaba com área total de 55ha (imagem Google Earth); B - aspecto de área residencial interna; C - reservatório de água (caixa de solo).

Fonte: A - Carvalho (2010); B e C – Arquivo Moscamed Brasil (2011)

4.2.2 Esclarecimento à população – Plano de comunicação

Quando definida a área de estudo, a primeira ação foi apresentar o projeto ao maior número de pessoas para que não ocorresse um entendimento equivocado em relação ao uso destes organismos geneticamente modificados para controle de mosquito. Pois, com esta técnica centenas de milhares de mosquitos serão liberados próximo às casas das pessoas. Dessa forma para que não houvesse desentendimento por parte da população e garantindo o direito de ser informada foi elaborado um plano de comunicação para a comunidade e

apresentado antes e durante as liberações dos mosquitos transgênicos. Pois possa parecer contraditória a afirmação de que se liberando mais mosquitos do que a população tem conhecimento conseguiremos realizar o controle dos mesmos e também da doença (COLEMAN; ALPHEY, 2004; DYCK et al., 2005).

Assim, o plano de comunicação teve como objetivo apresentar as atividades que foram realizadas na comunidade, principalmente sobre a liberação da grande quantidade de mosquitos. Dessa forma, no que se diz a nível local, ou seja, na comunidade, a população foi informada sobre o projeto através de palestras com as atividades realizadas naquela área e com informações gerais sobre o mosquito em questão antes de se iniciarem as liberações. Dentre os diferentes temas reportados durante a palestra, foi abordada a diferença entre os principais gêneros e espécies de mosquitos, incluindo seus hábitos (alimentares e comportamentais), além do pensamento básico e objetivo da liberação dos machos transgênicos e a justificativa da escolha da área em questão. Foram elaborados panfletos informativos com ilustrações (figura 11), que teve a linguagem ajustada para o público em geral. Esse material foi distribuído durante as palestras e também durante o mutirão de visitação em cada uma das casas na área de tratamento no bairro. Neste mutirão, cada agente disseminador visitava a casa e explicava de uma forma muito simples, com a ajuda do material gráfico, as etapas que foram realizadas na comunidade. Foram 494 casas, onde 89% foi possível conversar com pelo menos um morador e falar a respeito do projeto e 11% das casas estavam fechadas ou com apenas crianças, portanto nestas casas apenas o material informativo foi deixado.

Em nível regional as atividades foram divulgadas em mídia impressa (jornais e revistas), em rádio e emissoras de televisão, nestas duas últimas foram 12 participações e entrevistas que abordaram todos os aspectos do projeto. Outra atividade em instância regional foi a realização de um *workshop* intitulado “*Programa de Controle Genético do Mosquito Aedes aegypti*”, com a participação de aproximadamente 60 pessoas, entre elas estiveram presentes representantes das diversas camadas governamentais. Em um segundo momento, houve um convite para uma apresentação em caráter especial em uma sessão na Câmara Municipal de Juazeiro (Casa Aprígio Duarte) com a participação de mais de 50 pessoas, entre elas os vereadores do município. Houve também convite para participação em eventos organizados pela prefeitura de Juazeiro, onde tivemos a oportunidade de divulgação do projeto conversando com os moradores e distribuindo material informativo. Escolas municipais e estaduais, também entraram em contato para realização de trabalhos em conjunto mostrando a inovação implantada na região através de uma fábrica de insetos, também foram

utilizados assuntos que foram abordados em sala de aula junto aos alunos complementando a grade curricular e agregando valores socioambientais. Neste âmbito foram 28 palestras formais com a participação de aproximadamente 1.000 pessoas (alunos, professores e outros interessados).

Figura 11 – Panfleto do projeto

Panfleto distribuído para a comunidade e em palestras além de outros eventos sobre o assunto. O folder possui linguagem simples e de fácil compreensão para o público em geral.
Fonte: Arquivo biofábrica Moscamed Brasil (2011)

Em nível nacional foram utilizados meios de comunicação como jornais e revistas de grande impacto, que tiveram interesse em saber mais informações sobre o projeto. Uma emissora de televisão também decidiu elaborar uma matéria jornalística com as informações do projeto em programa de abrangência nacional. Antes e durante todo o processo de liberação de transgênico foram mantidas atualizações na internet com mais de 100 publicações, em blogs, jornais e revistas eletrônicas, além de atualizações frequentes em outros sites e redes sociais.

Durante todos os eventos houve distribuição de aproximadamente 4.000 exemplares impressos de material com informações gerais do projeto. Também foi elaborado um jingle (ANEXO C1) e um spot (ANEXO C2) para que fossem transmitidos nas estações de rádio, e também na veiculação em carro de som para informar os ouvintes e população sobre as atividades e objetivo do projeto.

4.2.3 Monitoramento

O monitoramento foi realizado com armadilhas ovitrampa (figura 06), que foram georeferenciadas com auxílio de um aparelho GPS (*Global Position System* – Garmin Oregon®450) e utilização do software Google Earth® (Google Inc., Mountain View, CA, EUA) onde os pontos foram nomeados e ajustados para cada armadilha (figura 12 A e B, figura 13). Os dados do monitoramento também estão disponíveis no anexo C3.

Figura 12 –Disposição das armadilhas ovitrampas durante as duas primeiras fases do monitoramento

A: disposição das armadilhas ovitrampas no bairro de Itaberaba para inferir a presença de *Aedes albopictus* entre julho de 2010 e fevereiro de 2011; B: ampliação da distribuição das armadilhas ovitrampas no bairro de Itaberaba entre fevereiro e março de 2011.

Fonte: Carvalho (2012).

As palhetas coletadas semanalmente em campo eram encaminhadas para o laboratório de análises de campo da biofábrica Moscamed Brasil, onde eram colocadas para secarem em condições ambientais por três dias, após este período os ovos eram contados na própria palheta e os dados registrados.

Tabela 05 – Dados de ovitrampa da primeira fase de monitoramento

2010 / 2011	Jul		Ago		Set		Out		Nov		Dez		Jan	
	Ovo	Larva	Ovo	Larva	Ovo	Larva	Ovo	Larva	Ovo	Larva	Ovo	Larva	Ovo	Larva
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	0	244	215	135	88	273	181	357	258	24	13	396	188
3	2	2	45	37	7	7	97	83	23	28	98	48	300	273
4	89	18	357	368	76	63	773	255	92	11	221	118	-	-
5	0	0	0	0	0	0	15	13	0	0	0	0	421	347
6	12	0	1	1	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
7	1	0	1	0	0	0	0	0	33	0	0	0	-	-
8	0	0	168	127	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
9	0	0	0	0	0	0	51	51	55	38	-	-	52	46
10	0	0	40	26	0	0	20	21	216	66	229	22	306	268
11	0	0	56	51	49	15	155	111	27	27	0	0	872	707
12	0	0	10	7	86	78	0	0	0	0	64	36	78	69
13	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0	0	-	-	91	16	0	0	4	3	20	15	120	109
16	0	0	28	65	72	42	0	0	17	15	24	8	8	0
17	7	6	0	0	81	31	2	2	35	8	0	0	84	107
18	1	0	133	105	148	72	96	89	52	37	27	27	686	273
19	0	0	23	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	0	1	1	58	27	144	65	135	106	57	7	374	241
21	0	0	-	-	7	7	-	-	0	0	0	0	0	0
Total	118	26	1107	1020	810	446	1626	871	1046	597	764	294	3697	2628

Soma do número de ovos e de larvas em cada armadilha por mês de coleta durante a primeira fase de monitoramento com 21 armadilhas em busca da espécie *Aedes albopictus*.

Fonte: Carvalho (2012)

As palhetas eram então colocadas em potes de eclosão individuais. Potes similares ao descritos no item 3.1.2, porém com aproximadamente 300 ml de água apenas. A palheta era colocada no pote e permanecia por um intervalo mínimo de 12 horas. Deste pote, a palheta era então removida, tomando-se o cuidado para não deixar larvas grudadas na palheta. O

conteúdo do pote era então concentrado por filtrado em papel de filtro em sistema de kitassato com funil Büchner com placa porosa conectado a uma bomba à vácuo. O papel de filtro contendo as larvas recém-eclodidas era levado para observação em estereomicroscópio com luz fluorescente com filtro Texas Red (visualização da proteína DsRed2) e o estado da fluorescência das larvas era registrado em planilhas para posterior tabulação e análise.

Figura 13 – Disposição das armadilhas durante a terceira fase de monitoramento

Distribuição das armadilhas no bairro de Itaberaba cobrindo as áreas utilizadas como controle e de tratamento durante a fase de pré-supressão e supressão.

Fonte: Carvalho (2012)

O monitoramento foi dividido em três fases, a primeira composta por 21 armadilhas tinha para iniciar a coleta de dados na região e verificar se havia presença da espécie *Aedes albopictus* (Skuse). Além disso, também foi a partir desses ovos coletados que foi estabelecida a linhagem Ita oriunda do bairro tratado. A disposição dessas armadilhas é apresentada na figura 12A. De 22 de julho de 2010 a 14 de fevereiro de 2011 foram coletadas semanalmente 21 ovitrampas para avaliação da área de estudo (tabela 05). Essas coletas semanais resultaram em 2.955 amostras que foram, em laboratório, contadas e identificadas até a fase adulta. Dessas amostras obtivemos um total de 9.168 ovos, onde 5.882 larvas eclodiram (taxa de eclosão de 64,15%), e não foi encontrado nenhum indivíduo da espécie *Ae. albopictus*. Em comunicação pessoal com os agentes de saúde do município, foi relatado que a mais de vinte anos que não se é reportado a presença de *Ae. albopictus* em todo o município e nos seus arredores.

A segunda fase do monitoramento teve como objetivo aumentar o número de captura da espécie de interesse (*Ae. aegypti*), para isso foram instaladas mais 19 armadilhas para incremento dos dados a serem obtidos.

Tabela 06 – Dados de ovitrampa da segunda fase de monitoramento

2011	Fev		Mar		Abr	
	Ovo	Larva	Ovo	Larva	Ovo	Larva
1	0	0	0	0	0	0
2	9	1	14	9	0	0
3	16	11	17	15	0	0
4	0	0	9	6	57	10
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	86	60	100	26
7	1	1	483	413	330	98
8	84	31	45	39	23	6
9	37	29	0	0	56	28
10	0	0	0	0	0	0
11	36	32	0	0	0	0
12	69	69	0	0	0	0
13	124	97	169	143	83	22
14	0	0	0	115	21	0
15	30	18	165	115	135	15
16	7	1	10	10	16	16
17	71	62	123	122	24	0
18	1	1	20	5	2	0
19	25	1	19	2	1	0
20	0	0	22	18	20	7
21	3	3	0	0	70	49
22	0	0	26	11	145	47
23	78	67	227	143	6	0
24	0	0	3	3	0	0
25	198	87	14	8	13	7
26	0	0	0	0	11	0
27	4	3	11	11	9	0
28	0	0	9	0	5	3
29	0	0	38	23	3	0
30	0	0	2	0	9	1
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	58	24
33	33	0	95	49	37	0
34	2	2	2	0	6	2
35	57	15	1079	728	0	0
36	15	6	355	91	140	90
37	0	0	0	0	19	16
38	29	17	22	17	42	4
39	80	0	0	0	239	96
40	0	0	25	7	52	1
Total	1009	554	3090	2163	1732	568

Soma do número de ovos e de larvas em cada armadilha por mês de coleta durante a segunda fase de monitoramento com 40 armadilhas.

Fonte: Carvalho (2012)

A partir de 14 de fevereiro 2011 foram então instaladas as armadilhas adicionais para complementar o monitoramento na área de estudo (figura 12B). Durante essa fase foram coletadas mais 155 amostras, que contribuíram com mais 5.831 ovos, e 3.285 larvas identificadas com taxa de eclosão de 56,33% (tabela 06). As duas fases resultaram em 1.572 amostras responsáveis pela coleta de 14.999 ovos e 9.167 larvas eclodidas (taxa de eclosão de 61,99%), os dados são apresentados na tabela 03.

Gráfico 03 – Número de ovos por armadilha

O número total de ovos coletados foi dividido pelo número de armadilhas instaladas para obtenção do número médio de ovos por armadilhas.

Fonte: Carvalho (2012)

Uma semana antes do início das liberações de machos transgênicos da fase de pré-supressão também teve início a terceira fase de monitoramento com a instalação de mais 178 armadilhas no bairro, sua distribuição final é apresentada na figura 13. Nesta terceira fase todas as larvas encontradas eram submetidas ao estereomicroscópio com fluorescência para serem analisadas sob luz fluorescente em busca do marcador genético presente na linhagem OX513A. Neste período, entre maio de 2011 e fevereiro de 2012, foram 7.676 amostras com a coleta de 78.603 ovos e 45.332 larvas eclodidas (tabela 07). No total foram coletados 93.603 ovos entre julho de 2010 e fevereiro de 2012. Tabela contendo todos os dados do número de ovos, números de larvas segue em material anexo (arquivo 03). No gráfico 03 é mostrado o número médio de ovos por armadilha.

Tabela 07 – Dados de ovitrampa da terceira fase de monitoramento

(continua)

2011 / 2012	Mai		Jun		Jul		Ago		Set		Out		Nov		Dez		Jan	
	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.
1	1	0	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	46	45	116	110	224	139
2	0	0	86	44	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4
3	55	37	0	0	53	4	34	1	264	0	0	0	6	0	0	0	0	0
4	731	558	392	247	65	38	219	0	81	1	0	0	26	26	14	11	187	69
5	120	116	286	187	40	26	20	0	132	48	123	30	120	55	117	79	169	59
6	248	142	283	139	207	143	166	39	7	0	111	40	221	187	50	39	988	631
7	60	42	176	54	204	118	73	0	13	1	65	9	307	100	95	90	560	285
8	235	137	149	88	535	266	30	3	44	3	114	111	89	47	1	1	48	31
9	0	0	0	0	82	51	3	0	4	0	0	0	9	3	0	0	0	0
10	0	0	57	9	156	135	0	0	0	0	3	0	11	11	0	0	0	0
11	69	32	28	0	26	2	1	0	29	2	17	7	7	7	149	107	21	7
12	12	4	15	1	18	11	4	4	14	0	0	0	25	1	120	86	119	99
13	458	265	180	134	75	60	245	7	38	0	4	0	119	57	57	87	89	52
14	5	2	26	1	245	214	26	0	54	0	74	66	132	69	58	49	177	44
15	49	43	167	28	46	10	73	0	45	0	124	85	74	49	41	33	28	23
16	19	19	1	0	0	0	0	0	121	5	120	117	69	39	103	74	167	137
17	13	13	8	0	39	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0
18	8	0	4	0	18	5	18	0	71	0	1	0	0	0	1	0	9	1
19	11	6	190	0	10	0	85	0	0	0	51	1	9	7	1	1	0	0
20	11	11	64	0	29	0	0	0	73	0	3	0	0	0	0	0	0	0
21	41	38	43	33	0	0	0	0	0	0	7	3	0	0	0	0	0	0
22	67	48	116	0	115	0	50	0	18	0	44	0	55	10	3	2	0	0
23	44	2	7	0	0	0	0	0	0	0	7	7	2	2	0	0	0	0
24	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	214	171	113	1	60	0	30	0	0	0	0	0	14	9	0	0	0	0
26	0	0	1	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	27	27	27	0	82	0	8	0	0	0	0	0	1	1	14	10	0	0
28	8	7	64	37	0	0	65	0	0	0	0	0	0	0	216	124	72	15
29	168	167	65	22	51	5	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	22	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
32	1	0	103	7	0	0	0	0	0	0	6	57	52	2	2	2	0	0
33	31	22	20	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2
34	0	0	26	26	21	0	12	0	14	0	2	1	0	0	2	2	72	0
35	46	25	11	1	0	0	9	0	13	0	0	0	15	1	16	15	2	1
36	0	0	21	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	7
37	41	9	3	3	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0
39	406	320	171	112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	31	0	38	0	0	0	2	0	0	0	0	0	89	9	10	8	0	0
41	170	92	506	341	0	0	852	13	0	0	14	0	6	3	8	8	58	5
42	22	12	36	26	117	84	19	0	16	9	21	17	115	71	84	78	0	0
43	1	1	12	7	44	16	78	0	177	17	40	27	25	0	5	5	86	57
44	473	390	295	101	183	136	296	20	0	0	91	71	281	119	161	133	257	180
45	87	70	158	130	0	0	0	0	1	0	64	35	47	12	0	0	36	36
46	136	105	535	327	113	80	121	37	1	0	172	135	185	142	132	96	180	145
47	319	130	816	518	393	222	230	4	293	1	890	500	1271	947	1012	817	420	223
48	32	28	67	26	23	12	18	0	186	59	191	99	924	382	790	613	177	145
49	187	90	370	222	259	73	254	6	310	60	79	4	191	125	46	31	20	20
50	25	20	133	102	175	90	21	0	7	4	23	14	227	141	96	78	181	140
51	-	-	40	39	0	0	4	0	176	29	0	0	72	31	0	0	0	0
52	2	1	769	408	134	62	149	0	-	-	0	0	74	67	13	12	25	8
53	329	240	390	193	447	199	178	69	141	6	55	47	495	344	55	52	288	222
54	218	145	666	399	46	36	45	0	70	33	89	0	98	36	18	8	20	17
55	13	7	168	83	20	15	24	0	-	-	0	0	0	0	50	0	3	3
56	14	8	268	142	0	0	35	0	-	-	22	19	37	0	29	26	-	-
57	63	60	271	144	0	0	26	9	94	0	111	93	277	198	259	155	427	304
58	0	0	281	137	6	3	18	0	172	22	303	227	252	153	334	214	412	307
59	141	79	86	66	125	78	34	0	48	0	87	83	234	114	224	16	228	156
60	412	316	419	273	249	85	95	0	56	30	118	107	34	29	74	47	117	88
61	0	0	45	26	78	48	1	0	35	0	3	3	22	4	18	12	21	5
62	0	0	8	5	169	118	0	0	0	0	14	6	67	4	6	3	0	0
63	-	-	93	78	6	0	11	0	8	0	96	76	252	148	19	7	215	193
64	54	43	718	435	125	105	92	1	27	0	0	0	457	165	30	1	234	192
65	64	44	188	111	54	38	2	0	0	0	0	0	20	11	37	4	0	0
66	0	0	59	15	49	37	6	2	0	0	5	4	211	157	0	0	0	0
67	0	0	157	71	13	3	9	0	20	0	82	68	18	15	29	29	111	95
68	9	4	119	45	81	23	38	29	32	14	63	4	37	17	42	42	160	130
69	0	0	10	2	70	65	2	0	17	5	53	3	17	17	19	10	94	68
70	39	13	34	24	74	58	43	0	57	0	113	55	118	85	3	3	185	119

Tabela 07 – Dados de ovitrapa da terceira fase de monitoramento

(conclusão)

2011 / 2012	Mai		Jun		Jul		Ago		Set		Out		Nov		Dez		Jan	
	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.	Ovo	Larv.
71	353	197	145	75	58	31	133	1	504	45	101	63	795	548	271	178	440	186
72	147	68	12	6	2	1	2	1	20	0	160	132	163	135	119	84	34	20
73	20	12	34	18	25	16	90	0	4	0			15	9	458	14	14	9
74	147	102	383	280	312	265	469	27	1520	12	44	10	263	208	145	104	228	144
75	161	154	85	72	67	57	110	3	327	87	31	26	52	44	1	0	34	23
76	0	0	112	57	134	93	34	0	78	2	35	28	53	45	166	119	97	54
77	50	23	151	103	44	19	56	0	44	6	255	137	301	186	105	92	8	6
78	137	94	286	74	24	19	12	0	-	-	4	4	114	15	110	62	150	88
79	168	141	35	12	106	92	7	3	7	0	35	0	236	164	298	232	118	0
80	29	18	187	128	39	22	45	0	1	0	0	0	0	0	-	-	105	88
81	4	1	125	99	51	42	6	2	14	3	27	16	250	58	170	84	72	47
82	0	0	16	5	83	38	0	0	0	0	0	0	90	65	-	-	89	44
83	96	0	20	16	281	127	7	4	1	0	0	0	0	0	-	-	0	0
84	77	58	274	135	208	117	45	23	6	0	0	0	0	0	-	-	25	20
85	185	83	33	12	333	134	23	15	225	40	13	9	35	26	21	0	3	0
86	406	308	17	0	67	33	0	0	77	14	12	12	164	135	63	45	312	222
87	6	2	420	273	134	65	5	0	142	39	23	9	17	7	2	2	27	24
88	184	61	131	84	231	98	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
89	0	0	9	0	52	30	8	0	24	0	0	0	27	27	0	0	55	44
90	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	2	2	0	0	12	11
91	0	0	5	0	0	0	1	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	23	23	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	3	2	123	1	0	0	38	0	56	0	2	0	1	1	18	3	24	16
94	24	23	49	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	99	53	25	0	62	0	18	0	12	3	55	28	0	0	0	0
96	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39	39
97	8	8	56	39	0	0	0	0	0	0	0	0	42	15	0	0	0	0
98	0	0	7	2	4	0	0	0	5	0	0	0	2	0	12	12	0	0
99	65	52	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14
100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	-	-	-	-	0	0	33	2	27	0	0	0	154	148	65	64	0	0
102	-	-	-	-	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	51	45	68	50
103	-	-	-	-	8	1	16	0	61	30	76	54	73	58	10	5	60	60
104	-	-	-	-	4	0	8	0	0	0	0	0	106	54	113	83	51	35
105	-	-	-	-	17	17	9	2	0	0	0	0	0	0	-	-	7	7
106	-	-	-	-	2	2	63	4	40	0	18	16	444	273	33	30	177	140
107	-	-	-	-	32	26	70	0	0	0	82	43	259	159	-	-	9	7
108	-	-	-	-	63	33	14	0	0	0	0	0	1	1	0	0	10	8
109	-	-	-	-	143	124	3	0	38	0	2	0	0	0	0	0	0	0
110	-	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	33	19	90	27
111	-	-	-	-	7	7	22	0	0	0	72	28	0	0	12	0	57	32
112	-	-	-	-	14	4	15	0	22	0	4	3	165	107	55	38	72	61
113	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	1	0	4	4	2	0	98	30
114	-	-	-	-	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	-	-	-	-	0	0	23	0	16	3	0	0	2	0	21	21	123	97
116	-	-	-	-	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	57	0	101	267
117	-	-	-	-	0	0	0	0	31	13	8	8	8	8	13	13	22	22
118	-	-	-	-	0	0	93	0	20	0	18	15	29	13	49	10	15	12
119	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	98	84	21	11	169	153	27	21
120	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	19	13	405	271
121	-	-	-	-	0	0	3	0	3	0	1	0	0	0	82	33	23	19
122	-	-	-	-	51	36	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	94	73
123	-	-	-	-	0	0	27	0	57	0	46	26	6	1	0	0	7	0
124	-	-	-	-	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	24
125	-	-	-	-	0	0	11	0	0	0	0	0	22	22	0	0	0	0
126	-	-	-	-	4	4	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	6	3	0	0	0	0	0	0
128	-	-	-	-	32	18	0	0	0	0	23	12	41	19	109	84	52	39
129	-	-	-	-	0	0	55	0	184	0	5	1	90	40	0	0	21	14
Total	8365	5609	13522	7221	7898	4382	5656	331	6624	643	4891	2922	11670	6960	7632	5072	10461	6882

Soma do número de ovos e de larvas em cada armadilha por mês de coleta durante a terceira fase de monitoramento com 129 armadilhas.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2.4 Estudo de dispersão

Este estudo de dispersão tem como objetivo saber quanto, comparado ao selvagem, o mosquito dessa linhagem transgênica pode se dispersar no ambiente. Para este experimento foi realizada a técnica de marcação-liberação-recaptura (MLR), com duas liberações concentradas em dois pontos diferentes. Dessa forma, sabendo a posição do ponto de liberação e o local onde o mosquito marcado foi recapturado se pode estimar a distância percorrida e inferir a capacidade de dispersão desse inseto no ambiente. (BUONACCORSI et al., 2003; HARRINGTON et al., 2008; RUSSELL et al., 2005; TRPIS et al., 1995).

No dia 21 de fevereiro de 2011 foram liberados 13.000 mosquitos machos marcados pelo método de marcação floco de isopor. As gaiolas de liberação foram transportadas até o local indicado e então abertas para a liberação dos mosquitos. Permaneceu-se no local por aproximadamente 30 minutos para que os mosquitos se dispersassem procurando abrigo. Os mosquitos marcados foram liberados em dois pontos diferentes como mostra a figura 14. No ponto 01 de liberação (figura 14) foram liberados 5.349 mosquitos transgênicos com marcação vermelha e mais 2.213 mosquitos machos selvagens da linhagem Itaberaba (recentemente colonizada) com marcação verde. No ponto 02 de liberação (figura 14) foram liberados 5.465 mosquitos transgênicos marcados em azul. Uma vez que as liberações de transgênicos tenham ocorrido na mesma data, mas em pontos diferentes, as amostras foram tratadas em conjunto.

Após 24 horas da liberação foi iniciada uma coleta ativa com aspiradores a bateria (NASCI, 1981) em áreas peri e intradomiciliares. Nessas casas eram realizada aspiração por todos os cômodos e locais onde mosquitos pudessem se abrigar, tal aspiração teve duração de 15 minutos em cada residência. As coletas foram finalizadas três dias após o último dia em que foram encontrados mosquitos marcados. Baseado na literatura, do ponto de liberação escolhido foi estabelecido um perímetro de 200 metros para realizar a recaptura. Neste perímetro foram estabelecidos 47 blocos de 60x60 metros onde diariamente uma residência era escolhida ao acaso e aspirada (figura 15) (BUONACCORSI et al., 2003; MARINI et al., 2010; MUIR; KAY, 1998; RUSSELL et al., 2005; SILVER, 2008; TRPIS et al., 1995).

Figura 14 – Pontos de liberação de transgênico para estudo de dispersão

Localização dos pontos de liberação no bairro de Itaberaba durante o ponto de liberação. No ponto 01 foram liberados mosquitos transgênicos e selvagens, enquanto que no ponto 02 somente mosquitos transgênicos. Para cada tipo de mosquito liberado em cada ponto foi utilizada uma cor diferente de pó fluorescente.

Fonte: Carvalho (2012)

A dispersão desses mosquitos foi baseada na distância em linha reta entre o ponto de liberação e o ponto onde o mosquito foi encontrado (figura 16 e 17). Foram estabelecidas cinco classes de distanciamento a cada 40 metros a partir do ponto de liberação. A maioria dos mosquitos transgênicos recapturados 86,5% estava contida na primeira classe de distanciamento, ou seja, até 40 metros do ponto de liberação, como mostrado na tabela 08.

Figura 15 – Divisão da área de liberação

Divisão da área em blocos com 60 x 60 metros para recaptura baseado nos pontos de liberação tendo em vista o distanciamento descrito de 200 metros do ponto de liberação.

Fonte: Carvalho (2012)

O mesmo foi observado com os mosquitos selvagens marcados, onde 92,8% deles também foram recapturados a até 40 metros do ponto de liberação. Embora a maioria tenha sido encontrada próximo ao local de liberação, mosquitos marcados (tanto transgênicos como selvagens) foram recapturados na quinta classe de distanciamento que compreende uma distância de 200 metros do ponto de liberação (figura 16 e 17), sendo a maior distância encontrada de 181 metros. Esse distanciamento já havia sido descrito por outros autores em estudos similares de dispersão populacional por marcação-liberação-recaptura para mosquitos machos de *Aedes aegypti* (LILLIE et al., 1985; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2008; MARINI et al. 2010; MUI; KAY, 1998; NIEBYLSKI; CRAIG, 1994; RUSSELL et al., 2005; TRPIS et al., 1995).

Tabela 08 – Número e porcentagem de mosquitos marcados recapturados nos intervalos de distanciamento do ponto de liberação

Classe	OX513A	%	Acumulado	Itaberaba	%	Acumulado
até 40 m	45	86,54	45	26	92,86	26
41 - 80 m	3	5,77	48	0	0,00	26
81 - 120 m	0	0,00	48	0	0,00	26
121 - 160 m	0	0,00	48	0	0,00	26
161 - 200 m	4	7,69	52	2	7,14	28

Classe de distanciamento de acordo com o raio de voo dos mosquitos, dados projetados pela distância do ponto de liberação até o local de recaptura em linha reta.

Fonte: Carvalho (2012)

Figura 16 – Mapa da dispersão dos mosquitos recapturados entre fevereiro e maio de 2011

Mosquitos recapturados dos dois pontos de liberação utilizando a aspiração residencial de coleta ativa. Linha amarela representa 200 metros de distanciamento do ponto de liberação 1.

Fonte: Carvalho (2012)

Figura 17 – Estudo de dispersão no bairro de Itaberaba (Juazeiro/BA)

(A-E) exemplo de casas escolhidas aleatoriamente para realizar a recaptura; (F) pontos de recaptura de mosquitos marcados.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2.5 Longevidade – Taxa de recaptura

Dois métodos de marcação e liberação foram usados para determinar a taxa de recaptura que é equivalente a sua longevidade em campo. Os dois modelos são apresentados a seguir e não tiveram diferença no resultado final.

4.2.5.1 Transgênico X Selvagem

Durante a determinação da dispersão dos mosquitos (transgênico e selvagem) foi possível realizar um primeiro ensaio para determinar a taxa de recaptura (ou longevidade) entre essas duas linhagens. Utilizando a técnica de marcação-liberação-recaptura, com uma liberação única ocorrendo em dois pontos isolados em uma mesma área. Dessa forma um lote de liberação com mosquitos transgênicos e selvagens marcados, cada um em cores diferentes foi liberado na área de estudo (RUSSELL, et al. 2005; HARRINGTON, et al. 2008; TRPIS, et al. 1995; BUONACCORSI, et al. 2003).

A mesma liberação utilizada durante o experimento de dispersão foi possível realizar a taxa de recaptura desses mosquitos, para tal foram usados os mesmos dados. Entre 22 de fevereiro a 02 de março de 2011 foram aspiradas um total de 241 casas (tabela 09) dentro da área estabelecida. Nessas casas se aproveitou a oportunidade para esclarecimento de dúvidas e também um registro de informações gerais para posterior localização do imóvel para realizar o georeferenciamento e evitar aspirações em dias seguidos na mesma casa. Dentre todas as espécies capturadas durante a aspiração, *Aedes aegypti* (marcados ou não) representaram 9,3% sendo mosquitos marcados 3,5% (tabela 09). A maioria dos mosquitos capturados dentro das residências que não pertencem à espécie *Aedes aegypti*, faz parte do gênero *Culex*, em especial da espécie *Culex quinquefasciatus*.

Tabela 09 – Número de mosquitos capturados durante estudo de dispersão

Dia da captura	Pessoas aspirando	Mosquito capturado ¹	<i>Aedes</i> Capturado	Não marcado ²	Marcado ²	Nº de Casas Aspiradas
1	10	429	67	20	47	47
2	8	572	68	39	29	47
3	6	432	26	22	4	43
4	6	390	19	19	0	43
5	6	39	2	2	0	17
6	6	450	33	33	0	44
Total	13	2.312	215	135	80	241

Mosquitos coletados por aspiração, identificados e separados entre gêneros e espécies. ¹ - Total de mosquitos capturados incluindo outras espécies, em especial *Culex quinquefasciatus* (Say). ² - *Ae. aegypti* capturados, sendo “não marcado” mosquitos existentes do campo e “marcado” mosquitos transgênicos e linhagem Itaberaba criados em laboratório.

Fonte: Carvalho (2012)

Dos 13.027 mosquitos liberados (transgênicos e selvagens) apenas 80 foram recapturados, representa uma taxa de recaptura de 0,61%. Entre os 10.813 mosquitos transgênicos marcados (vermelho e azul) liberados nos dois pontos, apenas 52 mosquitos foram recapturados como apresentado na tabela 10 e georreferenciados na figura 16F com uma taxa de 0,48%. A maior porcentagem de recaptura ocorreu 24 horas após a liberação dos mosquitos com 67,3%.

Tabela 10 – Número de mosquitos recapturados ao longo dos dias após a liberação

Dia	Recaptura OX513A	% de recaptura	Acumulado	Recaptura Selvagem	% de recaptura	Acumulado
1	35	67,3%	35	12	42,8%	12
2	14	26,9%	49	15	53,5%	27
3	3	5,7%	52	1	3,5%	28
4	0	0,0%	52	0	0,0%	28
5	0	0,0%	52	0	0,0%	28
6	0	0,0%	52	0	0,0%	28

Mosquitos recapturados diariamente por até três dias após o último dia em que se encontra mosquitos marcados. Neste caso todos os mosquitos são originários do insetário e possuíam marcação.

Fonte: Carvalho (2012)

A linhagem de Itaberaba apresentou taxa de recaptura de 1,27% com 28 indivíduos marcados recapturados dos 2.213 mosquitos liberados (tabela 10). A maior porcentagem de recaptura ocorreu 48 horas após a liberação (53,5%). Por outro lado, após três dias da liberação já não se encontravam mais mosquitos marcados, como mostra o gráfico 04 e tabela 10. Aparentemente esses mosquitos se dispersaram no ambiente e/ou encontraram abrigos em residências que já haviam sido aspiradas e que não seriam aspiradas novamente e não era mais possível recapturá-los (LILLIE et al., 1985; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2008; MARINI et al., 2010; MUIR; KAY, 1998; NIEBYLSKI; CRAIG, 1994; RUSSELL et al., 2005; TRPIS et al., 1995).

Gráfico 04 – Taxa de recaptura de mosquitos marcados (transgênicos e selvagens)

Recaptura dos mosquitos marcados (transgênicos e selvagens) ao longo do tempo por aspiração ativa em diversos pontos.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2.5.2 Taxa de recaptura em liberação de múltiplos pontos

Uma segunda taxa de recaptura também foi realizada através da técnica de marcação-liberação-recaptura, porém com a liberação ocorrendo em múltiplos pontos e por dias consecutivos (HARRINGTON et al., 2008; RUSSELL et al., 2005). Dessa forma foram quatro lotes de liberação com mosquitos marcados, cada lote com uma cor diferente, dessa forma saberíamos que todos os mosquitos capturados marcados eram transgênicos e através das capturas diárias por quanto tempo continuaríamos a encontra-los no ambiente, sendo possível inferir sua taxa de recaptura e longevidade (BUONACCORSI et al., 2003; TRPIS et al., 1995).

Os lotes de mosquitos machos foram marcados usando o método do pote marcado. Foram quatro lotes de liberação marcados com pó fluorescente nas cores amarelo, vermelho, azul e verde, sendo a liberação desses mosquitos no ambiente nessa mesma ordem. Cada lote de liberação continha por volta de 10.000 mosquitos. A liberação seguiu de acordo com os pontos apresentados na figura 09 entre os dias 25 de maio a 09 de junho de 2011.

Após 24 horas da liberação do primeiro lote de mosquitos marcados, foram realizadas aspirações na área de tratamento e em uma área controle (figura 18) da mesma forma que no experimento anterior. Na área controle foram escolhidas diariamente 05 casas diferentes ao acaso e na área de tratamento 20 casas ao acaso e se manteve aspirações de 15 minutos onde se percorria os cômodos das residências a procura de mosquitos (marcados ou não). As capturas seguiram até três dias depois do último dia em que se encontrou mosquito marcado.

Figura 18 –Área de recaptura de mosquitos marcados

Em azul área controle (0,12 km²), em vermelho área em tratamento (0,11 km²).
Fonte: Carvalho (2012)

Os dados obtidos durante essa aspiração é demonstrado na tabela 11, onde na área controle foram capturados 20 machos e 57 fêmeas de *Aedes aegypti*. Já na área de tratamento foram coletados 893 machos e 415 fêmeas da mesma espécie. Num total de 77 mosquitos na área controle e 1.308 na área tratada.

Tabela 11 – Total de mosquitos coletados por dia de aspiração nas áreas controle e tratada

Dia de coleta	Área controle		Área tratada	
	N. de machos	N. de fêmeas	N. de machos	N. de fêmeas
1	3	8	117	36
2	2	10	148	37
3	0	4	62	55
4	0	1	41	54
5	-	-	28	19
6	-	-	37	20
7	11	23	22	13
8	0	0	45	31
9	0	1	15	26
10	2	5	39	18
11	1	1	48	25
12	-	-	53	15
13	-	-	94	18
14	-	-	16	13
15	0	0	53	10
16	1	4	68	18
17	-	-	7	7
Total	20	57	893	415

Datas preenchidas com hífen são dias que não foram realizadas capturas de mosquitos na área controle.

Fonte: Carvalho (2012)

A partir dos dados obtidos durante as aspirações foi possível estimar a longevidade através da probabilidade de sobrevivência diária e a expectativa de vida. As quatro liberações seguidas com mosquitos marcados tiveram como objetivo garantir que todos os mosquitos marcados recapturados durante o período de recaptura se tratava de um mosquito transgênico, assim poderia ser calculada também a taxa entre mosquitos transgênicos e selvagens. A aspiração resultou um total de 341 casas na área tratada e mais 85 amostras.

Gráfico 05 – Taxa de recaptura de mosquitos marcados após a liberação em múltiplos pontos

A partir das aspirações os mosquitos foram identificados e calculada a taxa de recaptura sabendo quantos mosquitos foram liberados inicialmente e quantos foram recapturados.

Fonte: Carvalho (2012)

Assim como no estudo de dispersão, apresentado anteriormente, a maioria dos mosquitos marcados foi recapturada 24 horas depois da liberação (gráfico 05) 55,4%. A taxa de recaptura foi de 0,45%. A probabilidade de sobrevivência diária (PSD) entre todas as liberações foi de 0,734, que pode variar de acordo com o intervalo de confiança (tabela 12). A expectativa de vida é de aproximadamente três dias (3,2), também variando no intervalo de confiança (tabela 12). De forma geral estes dados compreendem a longevidade desses mosquitos. Estes dados também são similares à estimativa obtida durante o estudo de dispersão anteriormente apresentado.

Tabela 12 – Estimativa da probabilidade de sobrevivência diária e da expectativa de vida

Liberação	Amarelo	Vermelho	Azul	Verde	Geral
PSD	0,61	0,66	0,67	0,74	0,73
[Intervalo de confiança]	[0,5 - 0,6]	[0,6 - 0,7]	[0,6 - 0,7]	[0,6 - 0,8]	[0,7 - 0,8]
Expectativa de vida (dias)	2,0	2,5	2,5	3,3	3,2
[Intervalo de confiança]	[1,6 - 2,3]	[1,8 - 2,9]	[1,8 - 3,2]	[2,0 - 4,5]	[2,7 - 3,6]

Mosquitos capturados durante MLR tiveram sua probabilidade de sobrevivência e expectativa de vida calculada com seus intervalos de confiança.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2.6 Fase de pré-supressão

Esta fase compreende a liberação de um número pré-definido de mosquitos machos no ambiente, independentemente do número de mosquitos selvagens no ambiente. Dessa forma foi possível observar o efeito de uma liberação de transgênicos no ambiente.

4.2.6.1 Aprimoramentos na criação em massa de mosquitos transgênicos

A fim de aprimorar a criação em massa foi realizada a estimativa da quantidade de ovos de mosquito em um grama. Quatro pesagens distintas foram feitas de ovos com 0,25g, 0,5g, 1,0g e 1,5g em pelo menos três repetições biológicas. Essas quantias foram colocadas para eclodirem seguindo protocolo descrito anteriormente (item 3.1.4). Três amostras de 01 ml tiveram o número total de larvas, a taxa de eclosão e a estimativa do número de ovos registrados de nove campos aleatórios para cada amostra, a média para cada pesagem é apresentada na tabela 13.

Tabela 13 –Estimativa do número total de ovos em cada uma das amostras de peso

Peso dos ovos	Número de larvas	Taxa de eclosão	Número de ovos
0,25g	18.959	79	29.341
0,50g	36.115	84	51.701
1,00g	73.018	78	113.147
1,50g	97.366	73	160.141
2,00g	93.148	82	138.412

Cada amostra teve suas larvas eclodidas e calculado a taxa de eclosão estimando o número final de ovos baseado nesta porcentagem de ovos eclodidos e não eclodidos para cada uma das pesagens estabelecidas.

Fonte: Carvalho (2012)

Baseado no número total de larvas e na diferença da taxa de eclosão foi realizado a estimativa da quantidade total de ovos calculando-se a diferença que não eclodiu e somando ao total de larvas para cada uma das diferentes pesagens. Com estes dados foi realizada uma regressão (gráfico 05) que mostra a relação do número de ovos com a quantidade de gramas pesado através da fórmula (03), sendo o valor de R^2 é igual a 0,711. Sendo assim, a quantidade de ovos esperada para cada 01 grama é de 86.220 ovos.

$$y = 0,00001x + 0,1378 \quad (03)$$

Gráfico 06 – Regressão linear entre o número de ovos e peso em gramas

Contagem do número de larvas e estimativa do número de ovos por classe de peso para determinação da reta e regressão.

Fonte: Carvalho (2012)

Para cada liberação foi determinado que fossem usados 1.000 machos por hectare de área a ser tratada, o bairro de Itaberaba foi dividido em três áreas, área controle, área de transição e área de tratamento. Dessa forma a área de tratamento com 11 ha (0,11 km²), receberia então por volta de 11.000 machos por liberação. A partir da estimativa de ovos/grama, para atingir o número necessário de mosquitos machos por hectare foram eclodidos 1,30g de ovos tendo uma margem de segurança de 20%.

Para manter uma liberação constante em campo, três liberações semanais foram estabelecidas, seguindo um esquema de eclosão/alimentação/separação para que antes do término de um ciclo outro já estivesse em andamento, assim o intervalo entre cada uma das liberações era em média de 2,3 dias tempo estimado durante os experimentos de longevidade onde ainda se encontravam mosquitos marcados. A fase de pré-supressão teve 18 lotes de liberações ao longo de seis semanas produzindo por volta de 20 mil machos (gráfico 07), iniciando-se no dia 25 de abril de 2011 com a eclosão do primeiro lote e finalizada em 02 de junho de 2011 com a eclosão do último lote. Foram produzidos em torno de 372.443 machos com uma mortalidade média de 9,7% registrada através do controle de mortalidade nos potes de liberação.

Gráfico 07 – Produção de machos ao longo das liberações

Baseados na meta de produção e no estabelecimento da mesma de forma constante as produção de machos teve um número maior do que o número utilizado nas liberações.
 Fonte: Carvalho (2012)

4.2.6.2 Liberação de machos transgênicos em campo.

Após o acondicionamento das pupas macho nos potes de liberação, dois dias depois, os potes eram drenados fazendo-se um pequeno corte com auxílio de um estilete próximo à base e pressionando-o para o escoamento de toda água. Do total de potes a serem liberados, oito deles eram aleatoriamente escolhidos para contagem do número de pupas (mortas e vivas) remanescentes e adultos (mortos) que por ventura viessem a sair durante o processo de drenagem da água (controle pré-liberação). Para cada um desses potes controles a água era colocada em um recipiente em separado para contagem. Após a drenagem os potes eram acondicionados em caixas de isopor (172 litros) para seguirem ao campo e serem liberados. Os potes usados como controle (controle pré-liberação) foram mantidos para contagem do restante do material após a liberação (controle pós-liberação).

A liberação ocorria em veículo tipo picape. As caixas de isopor eram acomodadas na parte traseira do automóvel e um técnico acompanhava na caçamba realizando a abertura dos potes e liberando os mosquitos com o carro ainda em movimento a uma velocidade de 05 km/h próxima aos pontos previamente estabelecidos a partir das 16 horas nas vias públicas do bairro. (figura 19). Dois conjuntos de pontos estratégicos de liberação foram propostos (figura 19) para que fossem usados alternadamente entre as liberações e dessa forma uniformizar a quantidade de machos em toda área, mesmo levando em consideração sua dispersão.

Separavam-se os potes marcados (controle pós-liberação) que eram encaminhados ao laboratório para contagem do controle pós-liberação.

Figura 19 – Mapa guia para liberação em campo de machos transgênicos no bairro Itaberaba

Pontos no mapa representam os locais onde os potes de liberação eram abertos e os mosquitos liberados na área de tratamento (destacada em vermelho), que tem 0,11 km². Para cada dia de liberação um grupo de pontos da mesma cor era utilizado para que houvesse uma distribuição uniforme na área.

Fonte: Carvalho (2012)

A fase de pré-supressão ocorreu de entre 09 de maio a 13 de junho de 2011 com a liberação de 184.621 mosquitos com três liberações semanais com aproximadamente 10.000 mosquitos machos na média (gráfico 08) na área de tratamento.

Gráfico 08 – Número de machos liberados semanalmente durante a pré-supressão

Potes contendo as pupas de macho foram levados a campo e a liberação de machos seguiu um número mais uniforme próximo a meta de liberação.

Fonte: Carvalho(2012)

4.2.6.3 Comparação entre os métodos de marcação

Os dois métodos de marcação testados neste projeto foram comparados entre si, a principal razão foi pelo número de passos de manipulação entre a separação das pupas e liberação no campo, além de tentar facilitar a maneira como o material era manipulado. Dessa forma foi comparado o método do floco de isopor (descrito no item 3.3.1.1) com o método do pote marcado (descrito no item 3.3.1.2). Foi possível determinar que entre mosquitos marcados e não marcados (ambos os métodos) não houve diferença estatística com o teste de Mann-Whitney com $p=0,164$ e $0,589$ para o método floco de isopor e pote marcado, respectivamente no que diz respeito a taxa de mortalidade. Sabendo que a marcação não teve nenhum tipo de influência na mortalidade dos mosquitos, foram comparadas as duas metodologias com o mesmo teste (Mann-Whitney) como mostra a tabela 08 e verificou-se que da mesma forma não houve diferença estatística entre os dois métodos ($p=0,149$). Os dados da taxa de mortalidade ao longo do tempo são mostrados no gráfico 09.

Gráfico 09 – Taxa de mortalidade entre os dois tipos de marcação

Mosquitos marcados e não marcados de cada experimento foram liberados em gaiolas (as mesmas usadas pela colônia de produção de ovos) e foram observados por dez (10) dias, contando-se o número de mortos.

Fonte: Carvalho (2012)

Em relação ao tempo que permaneceram na gaiola pós-liberação, os mosquitos de forma geral (tanto quanto aos métodos de marcação quanto a marcação com pó fluorescente) apresentaram uma alta mortalidade por volta do sétimo dia após a liberação nas gaiolas. Após esse período a taxa volta a diminuir (gráfico 09). Acredita-se que exista um ponto crítico por volta do sétimo dia, onde os machos que sobreviverem permanecerão por mais tempo no ambiente, uma vez que a taxa de mortalidade cai após o sétimo dia. A maior taxa de mortalidade para o método floco de isopor foi de 6,0% e para o método pote marcado foi de 5,3%, estes valores de acordo com o montante inicial de 1000 indivíduos representam 157 e 178 indivíduos respectivamente. Visto que não há diferença estatística entre os métodos de marcação, optou-se por utilizar o método do pote marcado nos próximos experimentos que envolvam a técnica de marcação-liberação-recaptura, por ser mais prático e possibilitar uma liberação com um número muito maior de potes e consequentemente de indivíduos.

Tabela 14 – Taxa de mortalidade entre os métodos de marcação

Dias	Método 01 ¹		Método 02 ¹	
	Marcado (%) ²	CTRL (%) ²	Marcado (%) ³	CTRL (%) ³
1	0,2	0,3	0,3	0,3
2	0,5	0,6	0,6	0,3
3	0,7	0,7	0,7	0,4
4	1,0	1,3	1,5	0,3
5	1,6	1,8	2,3	0,9
6	3,0	3,3	2,6	2,5
7	6,0	6,5	5,3	5,0
8	2,5	3,3	5,2	4,9
9	0,7	1,0	2,9	2,3
10	0,5	0,9	1,3	1,0

Teste realizado em triplicata para cada um dos métodos de marcação seus respectivos controles (sendo estes somente sem adição de pó fluorescente). Valores de p para o teste estatístico de Mann-Whitney onde ¹ - $p=0,149$; ² - $p=0,164$; ³ - $p=0,589$.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2.6.3 Visão geral da fase pré-supressão

Ao longo de 18 liberações foi possível, através do monitoramento semanal, perceber a introdução e o contínuo aumento do número de larvas fluorescentes encontradas nas ovitrampas conforme mostrado no gráfico 10. A porcentagem de larvas transgênicas encontrada nas armadilhas teve seu pico em 17% com liberações de aproximadamente 30.000 machos por semana.

Após as seis semanas de liberação (totalizando 18 liberações) foi possível notar que a porcentagem de larvas transgênicas encontradas decresceu uma semana após a última liberação ocorrida em 13 de junho de 2011 como mostra o gráfico 10. Dessa forma iniciaram as adequações para iniciar a fase de supressão, que de forma geral visa reduzir e se possível eliminar a espécie da área em questão aumentando a quantidade de mosquitos liberados semanalmente.

Gráfico 10 – Relação entre liberação e larvas transgênicas

A partir dos dados de mosquitos liberados, os dados obtidos durante as coletas de ovitrampas foram cruzados em função do tempo de estudo.

Fonte: Carvalho (2012)

4.2.6.4 Índice de esterilidade relativa - IER

Embora a linhagem transgênica não seja estéril, um meio de se calcular a sua eficiência é pelo índice de esterilidade relativa (IER) (MCINNIS et al., 1996) dado pela fórmula (04). Este índice aponta a eficiência da linhagem em realizar a supressão em uma dada população. Para se calcular este índice outros dados complementares precisaram ser calculados. Durante os experimentos MLR foi calculada a taxa entre os mosquitos transgênicos e selvagens capturados nas aspirações. Para determinar essa taxa é necessário calcular a taxa sexual dos mosquitos capturados no campo. A taxa sexual está baseada no princípio de a proporção entre machos e fêmeas seja de 1:1, sabendo dessa proporção se calcula a taxa para a área controle e de tratamento e assim comparam-se os valores da área tratamento para machos OX513A e machos selvagens.

$$IER = \frac{E_R}{E_R + E_W \frac{N_R}{N_W}} \quad (04)$$

Os mosquitos adultos coletados das áreas controle e de tratamento tiveram a sua taxa sexual determinada nas duas áreas, e essas taxas refletem um quadro alterado quando comparadas entre si. De forma geral a área controle apresentou a taxa de 0,35 machos por fêmea, enquanto que na área de tratamento, a taxa foi de 2,15 por fêmea (tabela 15). Isso indica o aumento do número de machos por fêmea no campo, logo como o número de machos

liberado foi maior e constante, é de se esperar que na área de liberação tenha uma proporção maior de machos para cada fêmea do que na área controle, onde não foram realizadas liberações.

Tabela 15 – Taxa sexual entre as áreas controle e de tratamento

Área	Machos	Fêmeas	Taxa Sexual
Controle	20	57	0,35
Tratamento	893	415	2,15

Dados entre machos e fêmeas foram divididos um pelo outro para se obter a razão entre eles em cada uma das áreas dessa forma se pode estimar a quantidade de machos por cada fêmea nas diferentes áreas.

Fonte: Carvalho (2012)

A partir da taxa sexual foi possível determinar a taxa entre machos OX513A e machos selvagens. Para isso foi utilizada a fórmula: taxa sexual da área tratada/taxa sexual da área controle - 1. A partir disso temos a proporção de machos OX513A contra machos selvagens da mesma área. Assim uma proporção entre o macho transgênico foi de 5,13 para cada macho selvagem (5,13:1). Isso apenas reforça o aumento de machos na área em questão como já havia sido comentado anteriormente. Com esse aumento no número de machos e sabendo que este número é cinco vezes mais transgênico do que selvagens, logo as chances de uma fêmea ser cortjada por um macho transgênico é maior.

A eficiência dessa técnica pode ser avaliada através da eficácia dos machos transgênicos de copularem com fêmeas selvagens e de transmitirem seu gene à prole a partir das liberações consecutivas. Esse cálculo se inicia pela determinação da densidade entre os mosquitos recapturados durante as coletas da MLR. Para estimar esta densidade utiliza-se a taxa sexual da área controle para estimar a quantidade de machos selvagens na área de tratamento pela multiplicação desta taxa pelo número de fêmeas capturadas da área tratada. A densidade de machos transgênicos se dá pela subtração da densidade de machos selvagens pelo total de machos recapturados na área de tratamento (tabela 16).

Tablea16– Densidade de machos e número de ovos da área tratada durante MLR

	Densidade de Machos	Número de ovos
Selvagem	145,6	5970
Transgênico	747,4	835

A densidade de machos foi obtida através da multiplicação do número de fêmeas da área tratada e da taxa sexual da área controle, resultando no número de machos da área de tratamento, a densidade de machos transgênicos foi obtida pela subtração da densidade de machos selvagens do total capturado na área. Já o número de ovos foi obtido através das coletas semanais de ovitrampas com a análise em luz fluorescente desse material.

Fonte: Carvalho (2012)

Sabendo-se da densidade entre os machos no período de coleta a competitividade entre machos pode ser calculada pela fórmula (05) de competitividade (MAYER et al., 1998), onde N_w é a densidade de mosquitos selvagens, N_R é a densidade de mosquitos transgênicos e P é a proporção de ovos fluorescentes de OX513 dado pela fórmula (06), onde E_w é o número de ovos selvagens triados e E_R é o número de ovos transgênicos (fluorescente) triados.

$$C = \frac{PN_w}{1 - P N_R} \quad (05)$$

$$P = \frac{E_R}{E_R + E_w} \quad (06)$$

De acordo com as fórmulas de proporção de ovos fluorescentes (06) o resultado obtido foi de 12,3%, logo para a competitividade entre machos (fórmula 05) temos o valor de 0,027. O índice de esterilidade relativa (fórmula 04) foi igual a 0,027, idêntico ao valor de competitividade entre machos. Dessa forma o valor encontrado para a linhagem apresentada esta entre os valores encontrados para outros programas que utilizam outros insetos com SIT e que obtiveram sucesso, por exemplo, *Cochliomyia hominivorax* com valor obtido de 0,2 e de 0,01 para o programa de *Ceratitis capitata* (MAYER et al., 1998; RENDON et al., 2004).

4.2.7 Supressão de população

Baseado nos resultados obtidos durante a fase de pré-supressão, o número de mosquitos machos liberados no campo foi modificado para que pudesse atingir mais de 50% de larvas transgênicas no campo, e com isso se iniciou a fase de supressão. Embora, os processos de produção e liberação foram idênticos ao descritos durante a fase de pré-supressão (itens 3.1.4.2 e 4.2.6.2). Concomitantemente, o monitoramento também descrito anteriormente foi mantido durante todo o período de atividade na comunidade.

A partir de 01 de julho de 2011 iniciaram as liberações de aproximadamente 60.000 machos por liberação, isso se deu pelo aumento em aproximadamente cinco vezes a capacidade de produção para um quadro onde pudéssemos atingir o máximo de larvas transgênicas na área de tratamento e por fim gerar supressão populacional. Sendo assim o contínuo processo de liberação ainda seguiu ao longo do segundo semestre de 2011 e primeiro semestre de 2012 (gráfico 11). Foram liberados até 28 de janeiro de 2012 mais de sete milhões de machos na área de tratamento.

Gráfico 11 –Liberação de machos no bairro de Itaberaba entreabril de 2011 a janeiro de 2012

Liberação de machos transgênicos no ambiente com o aumento da produção para início da supressão.

Fonte: Carvalho (2012)

O bairro de Itaberaba, como mencionado anteriormente, não depende da sazonalidade para manutenção do ciclo de vida do mosquito e tem quantidade suficiente de mosquitos ao longo de todo ano para ser um dos bairros também indicados pela prefeitura para realizar o tratamento utilizando essa técnica. Dados meteorológicos (temperatura, umidade relativa e pluviosidade) foram obtidos da estação meteorológica no distrito de Mandacaru (válida para todo o município de Juazeiro) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) do Semiárido. A temperatura média durante o período de coleta de ovitrampas foi de 26 °C com umidade relativa de 73% e pluviosidade média de 51 mm, sendo o mês de dezembro de 2010 com maior volume de água precipitado (175 mm). Com esses dados foi possível demonstrar que não houve correlação entre o número de ovos e a temperatura média (gráfico 12A) através do teste de Spearman com $r = 0,321$ e valor de $p = 0,181$. Com relação a umidade relativa do ar (gráfico 12B), também não houve correlação com o número de ovos coletados com $r = -0,113$ com $p = 0,644$. Em relação a pluviosidade (gráfico 12C) também não houve correlação apresentando valor de $r = 0,144$ e valor de $p = 0,556$ em relação ao número de ovos. De forma geral a presença do mosquito na região não tem ligação às variáveis climáticas aqui analisadas, ou seja, o desenvolvimento do ciclo de vida do mosquito para esta região de estudo esta ligada a outros fatores.

Gráfico 12 – Número de ovos e larvas em relação a três variáveis climáticas

Dados climáticos obtidos da estação meteorológica da EMBRAPA Semiárido; A – número de ovos e larvas em relação a temperatura (°C); B – número de ovos e larvas em relação a umidade relativa (UR%); C – número de ovos e larvas em relação a pluviosidade (mm).

Fonte: Carvalho (2012)

5 CONCLUSÃO

O processo de supressão de uma população esta baseada na estimativa da densidade populacional durante o período de atuação, no modelo de liberação e principalmente na produção em larga escala dos mosquitos machos. Dessa forma para implantação de todas essas etapas o tempo disponibilizado para o programa de pós-graduação para obtenção do título de mestre não foi suficiente para finalizar o processo de supressão na localidade. Porém, mesmo não podendo apresentar o resultado de supressão populacional, este projeto teve continuidade com a última fase para alcançar a supressão populacional, tanto na localidade apresentada, como também em mais três outros distritos no mesmo município. Embora, nesta dissertação somente foi possível avaliar do início ao fim o processo de liberação de uma linhagem transgênica para supressão de população.

A comparação laboratorial entre as linhagens transgênica e selvagem (neste caso linhagem de laboratório - Higgs) mostra que nos itens avaliados (número de ovos e larvas, taxa de eclosão dos ovos e a preferência das fêmeas selvagens) as duas linhagens possuem números similares e que não apresentam diferença estatística. Isso significa que a inserção do transgene não trouxe desvantagem (e também nenhuma vantagem) sobre esses aspectos analisados que pudessem ser notados durante a avaliação. Lee et al. (2009) mostram que a linhagem OX513A não possui diferenças em parâmetros similares quando comparada com uma linhagem selvagem da Malásia testada em laboratório. Logo, a linhagem OX513A não mostrou diferença significativa no que diz respeito a fisiologia do inseto quando comparada em duas situações diferentes e com populações selvagens de diferentes linhagens.

Estudos anteriores mostraram que outras espécies e linhagens de mosquitos transgênicos podem ou não ter alguma vantagem sobre o equivalente organismo selvagem, ou seja, da mesma espécie. E o fator que confere tal variabilidade da característica pode estar relacionado com o local onde o transgene foi inserido, o fato de a linhagem estar em homozigose (o que somente é possível por endocruzamentos) e/ou pelo tipo de construção utilizada (elementos de transposição e outros), além do papel no estado funcional do transgene (IRVIN et al., 2004; MARRELLI, et al. 2006; 2007). No caso da linhagem OX513A, a mesma já se encontrava em homozigose a mais de 65 gerações antes de ser estabelecida uma colônia em território nacional e não apresentou nenhum tipo de alteração ou modificação genética que tenha conferido alguma vantagem ou desvantagem que não tenha sido predita pela construção inserida no genoma, mesmo durante sua utilização ao longo do período de execução desse projeto (aproximadamente de 2 anos).

Embora Bargielowski et al.(2011) comentem que a linhagem RIDL OX513A de *Aedes aegypti* possa ter uma redução no fitness por conta da transformação do tipo do elemento de transposição usado (piggyBac) e também pelos cruzamentos em endogamia para obtenção de linhagem homozigota. O estudo também comenta que provavelmente exista uma pequena redução na longevidade causada pela ausência de consumo de tetraciclina na fase adulta, entretanto isso não foi detectado. No entanto, esta mesma redução também foi observada por Lee (2009), utilizando a mesma linhagem em laboratório, embora tal redução na longevidade não apresentasse diferença estatística com a linhagem selvagem testada. Testes laboratoriais são importantes para servirem de base para iniciar testes em campo, pois dessa forma autoridades e população podem se basear nos resultados laboratoriais imaginando o resultado esperado em campo.

Com relação aos dados de monitoramento obtidos em campo, a armadilha ovitrampa é amplamente utilizada como método de detecção de vetor, além de ter sido apontada como um método de maior precisão do que outros índices na detecção em baixa densidade populacional do vetor. O monitoramento realizado pelas ovitrampas é uma das formas de avaliar o andamento do estudo, isso se dá pelo acompanhamento do número de ovos coletados e também do aumento do número de larvas portadoras da marcação genética. Este é o indicativo que os machos liberados realizaram cópula, e, portanto com o aumento de larvas portadoras no ambiente e na ausência de tetraciclina, esta população transgênica está pré-determinada a entrar em colapso e não alcançar a fase adulta reduzindo a população selvagem (CHADEE, 2009; ESTALLO et.al 2011; GOVELLA, 2011; SILVA, 2009).

O bairro de Itaberaba consegue manter o ciclo do mosquito durante o ano todo sem depender da época chuvosa. Uma possibilidade para a manutenção do número de ovos nesta área é a presença de reservatórios de água utilizados pela população humana para armazenamento de água, e que promove o constante desenvolvimento dos mosquitos na área de estudo. Além disso, como nesta região do país a temperatura é sempre elevada, mesmo durante o inverno (por volta dos 25°C), esse fator não é capaz de interromper o desenvolvimento do mosquito significativamente (CODECO, 2009; ESTALLO et al., 2011). Williams et al. (2010) comentam que criadouros, tais como estes reservatórios de água, podem contribuir para o aumento populacional da espécie sendo indiferente à sazonalidade. E que a remoção desses criadouros, seja pela implantação do fornecimento de água, por exemplo, pode reduzir significativamente a disponibilidade de criadouros e contribuindo na diminuição da densidade populacional da espécie.

De acordo com os dados de dispersão determinou-se a média de distanciamento do ponto de liberação dos mosquitos. Alguns autores comentam que a distancia média de dispersão para esta espécie é de 200 metros, assim como no experimento de MLR apresentado, e comentam também que as fêmeas têm a capacidade de dispersão de até 2 km do ponto de liberação em busca de criadouros (HONORIO et al., 2003; MUIR; KAY, 1998; REITER et al., 1995). O fato do curto distanciamento pode estar relacionado à antropofilia realizada pela espécie, pois na presença de edificações, criadouros e da presença humana o mosquito não tem necessidade de se deslocar por longas distancias em busca de melhores condições para dar continuidade ao ciclo de desenvolvimento (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1998; PAUPY et al. 2010). E tendo as duas linhagens os mesmos parâmetros, isso mostra a capacidade de ambos os machos (transgênicos e selvagens) de se dispersarem em busca de fêmeas para tentativa de se realizar pelo menos uma cópula.

A fase de pré-supressão foi fundamental para estabelecimento de parâmetros para iniciar a fase de supressão que teve início em julho (ainda em andamento). Em especial gerar dados suficientes para a análise e futura expansão do número de mosquitos machos a serem liberados, dessa forma a ampliação foi de aproximadamente 10 mil machos para 60 mil machos e posteriormente 100 mil machos alcançando o limite de produção do biotério atualmente utilizado. Para iniciar o processo de supressão populacional é necessário ter a proporção de 10:1 (transgênicos:selvagem) para que em poucas gerações possa ter o efeito esperado (DYCK et al., 2005). O que confirma os dados obtidos pelas ovitrampas, onde foi possível apontar a variação no número de larvas transgênicas e verificar que um aumento na quantidade de mosquitos a serem liberados era necessário, pois segundo Harris et al. (2011) para gerar o quadro de supressão populacional seria necessário atingir 50% de larvas transgênicas, enquanto que durante a fase de pré-supressão apenas 17% de larvas foi alcançado. Segundo Dame et. al. (2009) para provar que a técnica funcione não é absolutamente necessário eliminar a espécie alvo da área de interesse.

O aumento da produção semanal de mosquitos foi colocado a prova, mesmo contando com a experiência de outros profissionais na área de criação, pois, nenhum outro projeto ou biofábrica conseguiu produzir (e ainda produz) esta quantidade de mosquitos machos por semana. O mais interessante é que os mesmos problemas apontados por outros estudos (BENEDICT et al., 2009) também se tornaram problemas durante a execução deste projeto e foi possível verificar que para cada unidade de produção um novo desafio será gerado, sendo necessária a procura de ajustes para cada situação. Problemas com fungos, densidade larval em bandejas de criação de larvas e densidade em gaiolas de adultos, quantidade de sangue

oferecido para fêmeas e a metodologia utilizada (pois ficaria inviável alimentação com camundongos ou cobaias para 60 gaiolas duas vezes na semana). Além da dificuldade de encontrar fornecedores de todo tipo de material necessário para manter a produção em níveis aceitáveis para liberação.

A determinação da taxa transgênico:selvagem é obtida através da taxa sexual entre cada uma das populações da área controle e tratada para determinar a proporção entre os dois sexos. Baseado neste dado é realizado uma nova proporção, sabendo-se quantos machos selvagens seriam esperados para cada fêmea é possível inferir a diferenças entre estes dois machos e determinar a taxa entre RIDL:Selvagem. A proporção esperada para a população selvagem é de 1:1 (macho e fêmea) para alcançar a supressão aconselha-se 10:1 (macho transgênico:macho selvagem) (DYCK et al., 2005; KNIPLING et al., 1968).

Quanto ao esclarecimento populacional, este foi realizado utilizando a todas as estratégias às quais tivemos alcance e também aquelas que eficientemente atingissem o objetivo de informar a população sobre a utilização dessa tecnologia para controle do mosquito transmissor da dengue. A boa aceitação deste projeto se deve pelas experiências anteriores de todos os tipos, baseados em tentativas realizadas com o mesmo tipo de projeto em outros países/regiões, com o compartilhamento de informações com especialistas na área, e principalmente da transparência e clareza de que se trata de uma linhagem transgênica (BENEDICT et al., 2008; LAVERY et al., 2008; 2010). Além de ter apoio dos representantes governamentais em todas as instancias (municipal, estadual e federal), a aprovação do órgão responsável pela regulamentação de organismos transgênicos no Brasil, foi de extrema importância para iniciar as atividades, pois sem aprovação legal e sem autorização da comunidade, o estudo não tem validade, uma vez que cabe aos responsáveis do estudo agir com ética legal e principalmente social (LAVERY et al., 2008; TINDANA et al., 2007). A experiência obtida com durante todo o processo, servirá como referência para futuras ações que envolvam utilização e/ou liberação de organismos geneticamente modificados no ambiente.

A avaliação de novas técnicas de controle de vetores é fundamental para garantir que a população humana não entre em contato com o agente etiológico e que passe para o quadro de doença. A crescente resistência a inseticidas e falta de conscientização da população auxilia a propagação do vetor e consequentemente do vírus no ambiente. Ampliar o campo de atividades que possam controlar eficientemente o vetor é essencial para bloquear a transmissão da doença (MARSHALL, et al. 2010).

A linhagem transgênica OX513A apresenta fatores que agregam vantagens na utilização da técnica RIDL, por não utilizar radiação e produtos químicos nocivos à saúde. Mesmo em casos extremos com liberações indevidas ou acidentais, os mosquitos liberados sobreviveram por apenas uma geração, pois o gene letal condicional não permite que o transgene seja incorporado na população selvagem na ausência da condição necessária, ou seja, caso as larvas oriundas da liberação indevida, cheguem ao ambiente elas não sobreviverão na ausência de tetraciclina.

Assim como roga o manejo integrado, aconselha-se o uso dessa tecnologia agregado com as demais estratégias de controle para obtenção de uma redução populacional capaz de prevenir significativamente o contato da população humana com o vírus dengue.

REFERÊNCIAS*

- ADELMAN, Z. N. et al. RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome. **J.Virol.** 76(24), v.12 (9), p.25-33, 2002.
- ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1243-1247, 2002.
- ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 121, n. 2, p. 173-178, 2002.
- ALPHEY, L. et al. Insect population suppression using engineered insects. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 627, p. 93-103, 2008.
- ASMAN, S. M. et al. Field studies of genetic control systems for mosquitoes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 26, p. 289-318, 1981.
- BARGIELOWSKI, I. et al. Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20699, 2011.
- BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Mol. Ecol.**, v. 15, n. 11, p. 3087-3113, 2006.
- BENEDICT, M. et al. Guidance for contained field trials of vector mosquitoes engineered to contain a gene drive system: recommendations of a scientific working group. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 8, n. 2, p. 127-166, 2008.
- BENEDICT, M. Q. et al. Colonisation and mass rearing: learning from others. **Malar. J.**, v. 8, p. 2-4, 2009.
- BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends. Parasitol.**, v. 19, n. 8, p. 349-355, 2003.
- BOYER, S. et al. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. **Bull. Entomol. Res.**, p. 01-17, 2011.
- BRACKEN, G. K.; DONDALE, C. D. Fertility and survival of *Achaearanea tepidariorum* (Araneida: Theridiidae) on a diet of chemosterilized mosquitoes. **Can. Entomol.**, v. 104, n. 11, p. 1709-1712, 1972.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epid. Serv. Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRYANT, J. E., et al. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

BUONACCORSI, J. P. et al. Estimation and comparison of mosquito survival rates with release-recapture-removal data. **J. Med. Entomol.**, v. 40, n. 1, p. 6-17, 2003.

CANTON, P. E. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 595-600, 2010.

CARTER, V.; HURD, H. Choosing anti-Plasmodium molecules for genetically modifying mosquitoes: focus on peptides. **Trends. Parasitol.**, v. 26, n. 12, p. 582-590, 2010.

CARVALHO, M. S. L. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Rev. de Saúde Pública**, v. 38, p. 623-629, 2004.

CATTERUCCIA, F. et al. Transgenic technologies to induce sterility. **Malar. J.**, v. 8, p. 2-7, 2009.

CHADEE, D. D. Oviposition strategies adopted by gravid *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) as detected by ovitraps in Trinidad, West Indies (2002-2006). **Acta Trop.**, v. 111, n. 3, p. 279-283, 2009.

CODECO, C. T. et al. Seasonal dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the northernmost state of Brazil: a likely port-of-entry for dengue virus 4. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 614-20, 2009.

COLEMAN, P. G.; ALPHEY, L. Genetic control of vector populations: an imminent prospect." **Trop. Med. Int. Health**, v. 9, n. 4, p. 433-437, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. 228p.

CURTIS, C. F. Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations. **Nature**, v. 218, n. 5139, p. 368-369, 1968.

CURTIS, C. F. et al. Comparative field cage tests of the population suppressing efficiency of three genetic control systems for *Aedes aegypti*. **Heredity**, v. 36, n. 1, p. 11-29, 1976.

DAME, D. A. et al. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. **Malar. J.**, v. 8, 2009.

DARRIET, F. et al. Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). **Parasit. Vectors**, v. 3, p. 88, 2010.

DE FIGUEIREDO, M. L. et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virol. J.**, v. 7, p. 152, 2010.

DYCK, V. et al. **Sterile insect technique**. Netherlands: Springer, p. 1-559, 2005.

ESTALLO, E. L. et al. Prevention of dengue outbreaks through *Aedes aegypti* oviposition activity forecasting method. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 11, n. 5, p. 543-549, 2011.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v. 26, p. 531-535, 1966.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica** - princípios gerais, morfologia e glossário taxonômico. São Paulo, EdUSP, 1996, 549p.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica** - identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo, Edusp, 2002, 594p.

FRANZ, A. W. et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 11, p. 4198-4203, 2006.

FU, G. et al. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n.3, p. 353-7, 2007.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, (FUNASA). **Dengue**. Ministério da Saúde. Brasília, Coordenação de Vigilância de Fatores de Riscos Biológicos: 84. 2001.

FURTH, P. A. et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 20, p. 9302-9306, 1994.

GONG, P. et al. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 4, p. 453-456, 2005.

GOSSEN, M. et al. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. **Current Opin. Biotechnol.**, v. 5, n. 5, p. 516-520, 1994.

GOVELLA, N. J. et al. Monitoring mosquitoes in urban Dar es Salaam: evaluation of resting boxes, window exit traps, CDC light traps, Ifakara tent traps and human landing catches. **Parasit. Vectors**, v. 4, p. 40, 2011.

GROSS, L. A. et al. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 22, p. 11990-11995, 2000.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUZMAN, A.; ISTURIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, n. 1, p. 40-42, 2010.

HARRINGTON, L. C. et al. Age-dependent survival of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) demonstrated by simultaneous release-recapture of different age cohorts. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 2, p. 307-313, 2008.

HARRIS, A. F. et al. Field performance of engineered male mosquitoes. **Nat. Biotechnol.**, v. 29, n. 11, p. 1034-1037, 2011.

HARRIS, A. F. et al. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 2, p. 277-284, 2010.

HAY, B. A. et al. Engineering the genomes of wild insect populations: challenges, and opportunities provided by synthetic Medea selfish genetic elements. **J. Insect. Physiol.**, v. 56, n. 10, p. 1402-1413, 2010.

HELINSKI, M. E. et al. Radiation biology of mosquitoes. **Malar. J.**, v. 8, p. 2-6, 2009.

HONORIO, N. A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n.2, p. 191-198, 2003.

HOY, M. A. Analysis of risks of transgenic insects for pest management: past and future guidelines. **Development**, v.7, p. 121-137, 2002. Apresentado no International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, 7, 2002, Beijing.

IRVIN, N. et al. Assessing fitness costs for transgenic *Aedes aegypti* expressing the GFP marker and transposase genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 3, p. 891-896, 2004.

JASINSKIENE, N. et al. Microinjection of *A. aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes. **J. Vis. Exp.**, v. 5, p. 219, 2007.

KNIPLING, E. F. et al. Genetic control of insects of public health importance. **Bull. World Health Org.**, v. 38, n. 3, p. 421-438, 1968.

KOKOZA, V. et al. Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 18, p. 8111-8116, 2010.

LAVERY, J. V. et al. Ethical, social, and cultural considerations for site selection for research with genetically modified mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 3, p. 312-318, 2008.

LAVERY, J. V. et al. Towards a framework for community engagement in global health research. **Trends Parasitol.**, v. 26(6), p. 279-83, 2010.

LEE, H. L. et al. Comparative life parameters of transgenic and wild strain of *Aedes aegypti* in the laboratory. **Dengue Bull.**, v. 33, p. 103-114, 2009.

LILLIE, T. H. et al. The dispersal of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in a salt marsh near Yankeetown, Florida. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 1, n. 4, p. 463-467, 1985.

LOFGREN, C. S. et al. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. 3. Field methods and population control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, n. 2, p. 288-297, 1974.

LYCETT, G. J. et al. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1781-1790, 2004.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Calculating the survival rate and estimated population density of gravid *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Publ.**, v. 24, n. 12, p. 2747-2754, 2008.

MACORIS, M. et al. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of São Paulo, Brazil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MARINI, F. et al. Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. **Med. Vet. Entomol.**, v. 24, n. 4, p. 361-368, 2010.

MARRELLI, M. T. et al. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 13, p. 5580-5583, 2007.

MARRELLI, M. T. et al. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 5, p. 197-202, 2006.

MARSHALL, J. M.; HAY, B. A. Inverse Medea as a novel gene drive system for local population replacement: a theoretical analysis. **J. Hered.**, v. 102, n. 3, p. 336-341, 2011.

MARSHALL, J. M. et al. Perspectives of people in Mali toward genetically-modified mosquitoes for malaria control. **Malar. J.**, v. 9, p. 128, 2010.

MATHUR, G. et al. Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 753-763, 2010.

MCGRANE, V. et al. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 39, n. 5, p. 502-510, 1988.

MCINNIS, D. O.; LANCE, D. R.; JACKSON, C. G. Behavioral resistance to the sterile insect release technique by the Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae) in Hawaii. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 89, p.739-744, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. NOTA TÉCNICA CGPNCD/DEVEP/SVS. Brasília. 2010. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>> Acesso em: 25 Mar. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tabulação de Dados - Dengue. 2011.

MORLAN, H. B. et al. Field tests with sexually sterile males for control of *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v. 22, n. 3, p. 295-300, 1962.

MUIR, L. E.; KAY, B. H. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 3, p. 277-282, 1998.

NASCI, R. S. A lightweight battery-powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. **Mosq. News**, v. 41, n. 4, p. 808-811, 1981.

NAZNI, W. A. et al. Susceptibility status of transgenic *Aedes aegypti* (L.) against insecticides. **Dengue Bull.**, v. 33, p. 124-129, 2009.

NIEBYLSKI, M. L.; CRAIG, G. B. Jr. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 10, n. 3, p. 339-343, 1994.

OLIVEIRA, S. L et al. Mosquito transgênico do paper para realidade. **Rev. Biol.**, v. 6b, p. 38-43, 2011.

PARIS, M. et al. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1184-1194, 2011.

PARIS, M. et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. **Pest. Manag. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 122-128, 2010.

PAUPY, C. et al. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, n. 4, p. 473-480, 2010.

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

REITER, P. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 2, p. 177-179, 1995.

RENDON, P. et al. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. **J. Econ. Entomol.**, v. 97, n. 5, p. 1547-1553, 2004.

RUSSELL, R. C. et al. Mark-release-recapture study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. **Med.Vet. Entomol.**, v. 19, n. 4, p. 451-457, 2005.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol.**, v. 7, p. 1-13, 2007.

SCHLEIER, J. J.; PETERSON, R. K. D. Toxicity and risk of permethrin and naled to non-target insects after adult mosquito management. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1140–1146, 2010.

SILVA, V. C. et al. Comparative study between larvitrap and ovitrap for evaluating the presence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Campo Grande, State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 6, p. 730-731, 2009.

SILVER, J. B. **Mosquito ecology: field sampling methods**. New York: Springer, 2008. 1477p.

SUAYA, J. A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 5, p. 846-855, 2009.

TAUIL, P. L. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cad. Saude. Publ.**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

THOMAS, D. D. et al. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science**, v. 287, n. 5462, p. 2474-2476, 2000.

TINDANA, P. O. et al. Grand Challenges in Global Health: Community Engagement in Research in Developing Countries. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1451-1455, 2007.

TOMA, L. et al. *Aedes aegypti*: risk of introduction in Italy and strategy to detect the possible re-introduction. Rome: Istituto Superiore di Sanità, 2011. Disponível em: <http://www.izs.it/vet_italiana/collana_di_monografie/mon23_2_Toma.pdf> Acesso em: 17 de Mar. 2011.

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

TRPIS, M. et al. Estimates of population size, dispersal, and longevity of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by mark-release-recapture in the village of ShauriMoyo in eastern Kenya. **J. Med. Entomol.**, v. 32, n. 1, p. 27-33, 1995.

UNIVERSIDADE DE ESTADUAL DE CAMPINAS, (UNICAMP). Ciclo de vida mosquito *Aedes aegypti*. Campinas, 2001.

VONTAS, J. et al. Transcriptomics and disease vector control. **BMC Biol.**, v. 8, p. 52-55, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>> Acesso em: 18 Mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Health topics – Dengue. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>> Acesso em: 19 Mar. 2011.

WILLIAMS, C. R. et al. The extinction of dengue through natural vulnerability of its vectors. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 12, p. e922, 2010.

WINDBICHLER, N. et al. Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. **Nucleic. Acids Res.**, v. 35, n. 17, p. 5922-5933, 2007.

YAHARA, K. et al. Evolutionary maintenance of selfish homing endonuclease genes in the absence of horizontal transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 44, p. 18861-18866, 2009.

ZHANG, Q. et al. Temporally and spatially controlled expression of transgenes in embryonic and adult tissues. **Transgenic Res.**, v. 19, n. 3, p. 499-509, 2009.

ANEXO A

Artigo 01 OLIVEIRA, S. L et al. Mosquito transgênico do paper para realidade. **Rev. Biol.**, v. 6b, p. 38-43, 2011.

Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade

Transgenic mosquito: from paper to reality

Soraia de Lima Oliveira^{1,2}, Danilo Oliveira Carvalho^{1,2}, Margareth Lara Capurro^{1,2,3}

¹Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INTC-EM), Brasil

Resumo. Doenças transmitidas por vetores são atualmente os maiores desafios da saúde pública no Brasil e no mundo, sendo as atuais medidas de controle ineficientes. Inovações no âmbito do controle vetorial apontam para uma nova perspectiva com a manipulação genética, já que podem interferir na transmissão da doença, seja impedindo que o patógeno complete seu ciclo no vetor, como reduzindo a população de mosquitos vetores. Apresentamos algumas diretrizes das principais ferramentas disponíveis, SIT e RIDL por exemplo. Abordamos ainda a forma como estas ferramentas funcionam, alguns riscos e benefícios.

Palavras-chave. Dengue, malária, controle de vetores, *Aedes aegypti*, transgênicos, RIDL.

Abstract. Vector-borne diseases are currently the worst challenge of public health in Brazil and worldwide, being the current control measures inefficient. Innovations concerning vector control point to a new perspective to handling with gene engineering, as they may interfere with disease transmission, preventing the pathogen to complete its cycle in the vector, ie, reducing mosquito population. We present some of the mean genetic tools available, SIT and RIDL for example. We discuss how these tools work, some risks and benefits.

Keywords. Dengue, malaria, vector control, *Aedes aegypti*, transgenics, RIDL.

Contato do autor:

³mcapurro@icb.usp.br

Recebido 18out010

Aceito 07jun11

Publicado

No contexto da entomologia médica, os mosquitos se enquadram entre os insetos que causam maior impacto à saúde pública no mundo e no Brasil. Estimativas apontam que mosquitos são responsáveis pela infecção de 700 milhões de pessoas no mundo, anualmente, atingindo principalmente regiões equatoriais, tropicais e subtropicais. (Gubler 1998, 2002; Mirzaian, et al. 2010).

As fêmeas desses insetos são as responsáveis pela transmissão desses patógenos, pois elas dependem da ingestão de sangue para completar o desenvolvimento dos ovos. Ao picar animais infectados, o mosquito ingere sangue contaminado e passa a hospedar esses patógenos, que escapam dos processos digestivos e se tornam capazes invadir e migrar para a glândula salivar onde irão permanecer até o próximo repasto sanguíneo, quando serão inoculados com a saliva do inseto. Pode ocorrer em alguns casos a transmissão transovariana de alguns arbovírus, assim as fêmeas infectam os ovos e a prole nasce infectada com o patógeno. (Mourya, Gokhale et al. 2001).

Entre as doenças veiculadas pelos mosquitos e que causam um grande impacto sócio-econômico e na saúde pública, destacam-se a malária e a dengue devido ao alto número de pessoas afetadas. O agente etiológico da malária é o protozoário do gênero *Plasmodium*. Ele está presente em 108 países, a maioria no continente Africano, e é veiculado principalmente por espécies do gênero *Anopheles*. Cerca de 40% da população mundial está sob risco malárico. Em 2008 foram registrados 247 milhões de casos de malária e aproximadamente um milhão de mortes.

(Killeen, et al. 2002; Maciel, et al. 2008; Marshall e Taylor 2009; Enayati e Hemingway 2010; Garcia, 2010)

A dengue, enfermidade causada por vírus da família Flaviviridae, afeta populações de mais de 100 países, distribuídos pelas Américas, África, Sudeste da Ásia, ilhas do oeste do Pacífico e leste do Mediterrâneo. Cerca de dois quintos da população mundial vive em áreas de risco infectadas pelo principal vetor da dengue, *Aedes aegypti*. A estimativa é que, mundialmente, 50 milhões de pessoas são infectadas todos os anos. Somente no Brasil, entre janeiro e junho de 2010, foram notificados 361.552 casos de dengue. (Who, 2009, 2010)

Além disso, nos deparamos com o ressurgimento de algumas das doenças transmitidas por artrópodes, como CHIKV (vírus chikungunya) que teve o primeiro grande surto urbano documentado na década de 1960 em Bangkok. Em 2004 foi registrado um outro grande surto que começou no Quênia e se espalhou por numerosas ilhas do Oceano Índico, na Índia e em pelo menos 18 países da Ásia, Europa e América do Norte, ocorrendo, inclusive, transmissão autóctone em alguns destes países. (Staples, et al. 2009)

A crescente mortalidade e morbidade causada por doenças transmitidas por vetores ao redor do mundo está relacionada à ausência de vacinas e medicamentos específicos e eficazes. Diante deste fato, o controle de doenças como dengue, malária e febre amarela passou a focar nos mosquitos transmissores.

O manejo integrado é a estratégia de combate ao ve-

tor que apresenta melhores resultados, pois compreende o uso de múltiplas atividades com diferentes focos para impedir a proliferação do vetor nas áreas afetadas. Podemos citar as seguintes estratégias:

1. Controle mecânico, no qual órgãos governamentais desenvolvem programas junto à comunidade com atividades preventivas, como a conscientização da população, e o mais importante a eliminação de possíveis criadouros;

2. Controle biológico, que utiliza outros organismos para o controle populacional da espécie, como a utilização de larvas predadoras (*Toxorhynchites* sp.), a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), e outros que possam se alimentar ou impedir o desenvolvimento do vetor;

3. Controle químico, com a aplicação de inseticidas, tanto para as formas adultas, quanto para as imaturas. (Forattini 2002; Tauil 2002).

Qualquer medida de controle torna-se ineficaz sem a contribuição da população em reduzir a disponibilidade de criadouros e das autoridades em realizar ações preventivas que impeçam surtos e epidemias. O custo de manutenção de programas públicos, agravado pelos efeitos adversos em organismos não-alvos com o uso de inseticidas, e, principalmente, a seleção de populações resistentes aos produtos químicos, tornam esses programas pouco eficientes e conseqüentemente falhos no combate ao vetor. Além disso, já foram registradas populações de *Aedes aegypti* que apresentam resistência ao uso de Bti, agravando ainda mais o quadro. (Bracco, et al. 1997; Macoris, et al. 1999; Lima, et al. 2003; Leite e Carneiro de Abreu 2009; Darriet, et al. 2010; Harris, et al. 2010; Paris, et al. 2010; Rivero, et al. 2010; Rajatileka, et al. 2011).

A alta capacidade reprodutiva dos mosquitos também é um dos principais fatores que dificultam o controle da população de vetores em uma área.

Cresce, então, a necessidade de se encontrar alternativas para o combate ao mosquito. Com base no entendimento da interação que ocorre entre o parasita, o vetor e o hospedeiro vertebrado, aliado ao desenvolvimento de ferramentas da biologia molecular, nasce uma alternativa que tem a manipulação genética como peça chave. (Hurd 1994; Kokoza, et al. 2000; Moreira, et al. 2002; Horn e Wimmer 2003; Speranca e Capurro 2007).

Essa manipulação utiliza genes quiméricos que variam nos mecanismos de ação contra o agente etiológico. Com a construção transgênica pronta, esse conjunto é inserido no genoma do vetor e passa a ser expresso de acordo com os promotores dessa construção (de Lara Capurro, Coleman et al. 2000; Nirmala and James 2003; Travanty, Adelman et al. 2004; Speranca and Capurro 2007).

Ainda em laboratório

Linhagens que visam a substituição da população, ou seja, inserir irreversivelmente um novo gene em uma população, podem apresentar muitas moléculas que foram descritas como tendo um papel importante no bloqueio da transmissão de agentes etiológicos. Em laboratório, algumas linhagens atingiram a eficiência de 99% no bloqueio da transmissão. É o caso da linhagem que expressa

um anticorpo contra uma proteína de membrana do parasita (*Plasmodium gallinaceum*) que o impede de alcançar a glândula salivar. Outra linhagem expressa o peptídeo SM1 que compete com as proteínas de superfície do parasita do gênero *Plasmodium* sp. impedindo que ele penetre nos tecidos e alcance a glândula salivar com eficiência de aproximadamente 80% no bloqueio da transmissão. (de Lara Capurro, et al. 2000; Ito, et al. 2002; Jacobs-Lorena, 2003; Nirmala e James, 2003).

O dilema enfrentado com o uso dessas linhagens é que, mesmo com reduções significativas, o agente etiológico ainda é capaz de ser disseminado e completar seu ciclo em novos hospedeiros e, conseqüentemente, gerar o quadro de doença. A solução encontrada foi agrupar mecanismos diferentes no mesmo transgene, formando um duplo transgênico que expresse mecanismos que individualmente tiveram resultados significantes, mas que não bloqueavam a transmissão. O duplo transgênico é capaz de inibir em 100% a transmissão do patógeno. (Jasinskiene, et al. 2007; Kokoza, et al. 2010).

Como a linhagem proposta usa o modelo de infecção laboratorial de *Aedes aegypti* e *Plasmodium gallinaceum* (malária aviária), esta linhagem não pode ser usada para controle de malária humana, pois o parasita é de outra espécie e não se sabe se o transgene pode bloquear da mesma forma. Além disso, *Aedes aegypti* não transmite malária ao homem, o vetor neste caso pertence a outro gênero, *Anopheles*, sendo *Anopheles darlingi* o principal transmissor no país. Outro ponto negativo é que esta linhagem também não poderia ser usada para o controle do vírus dengue, pois o transgene utilizado tem como alvo o parasita e não o vírus. (Deane 1986; Killeen, et al. 2002; Oliveira-Ferreira, et al. 2010).

A maquinaria do RNA de interferência (RNAi) é um dos mecanismos mais usuais contra o vírus dengue, e consiste em uma estratégia de bloqueio da replicação viral no mosquito. Componentes protéicos do RNAi reconhecem uma porção do RNA do vírus dengue tipo 02. Essa região do RNA é expressa pelo mosquito devido à construção transgênica, e quando houver infecção pelo vírus direcionará a destruição do RNA viral, impedindo a replicação do vírus nos tecidos do mosquito. Esta linhagem apresentou resultados significativos, embora alguns indivíduos ainda fossem capazes de transmitir o vírus dengue tipo 02. Infelizmente, a linhagem não teve o mesmo resultado quando colocada a prova com o vírus dengue tipo 04 (Adelman, et al. 2002; Travanty, et al. 2004; Franz, et al. 2006).

A maior dificuldade encontrada nessa abordagem genética é como realizar a introdução deste transgene na população alvo. A utilização de elementos de transposição é o recurso disponível atualmente, mas este sistema não é eficiente quando se trata de inserir um gene em uma população inteira. Alternativas que utilizem os “genes-egoístas” são o foco das atenções no momento. Entre eles estão o sistema de home endonucleases e MEDEA, que ainda não estão disponíveis para controle de doenças transmitidas por vetores. Estes sistemas baseiam-se no fato de que se o organismo não for portador deste gene, ele morre, e apenas quando for portador sobrevive. Ligando-se

o transgene de interesse a esse “gene-egoísta” garante-se que a prole portadora do “transgene-egoísta” resultante de um cruzamento entre selvagens e transgênicos seja a única sobrevivente, passando essa característica aos seus descendentes (Sinkins e Gould 2006; Windbichler, et al. 2007; Lorenzen, et al. 2008; Yahara, et al. 2009; Hay, Chen et al. 2010).

Saindo do laboratório

A manipulação genética pode atuar também reduzindo a população alvo. Dessa forma, a população de insetos é reduzida a níveis em que a disponibilidade de novos insetos, que possam ser infectados e aptos a transmissão dos agentes etiológicos, também seja menor. Esta metodologia, que já é empregada em alguns países, mostra resultados promissores, e pode ser utilizada no controle de mosquitos. (Alphey 2002; Alphey e Andreasen 2002; Coleman e Alphey 2004; Dyck, et al. 2005; Alphey, et al. 2008; Alphey et al. 2009).

Técnica do Inseto Estéril - SIT

A liberação de machos estéreis para suprimir a população já é uma técnica bastante utilizada na agricultura para controle de pragas, como exemplificado pela mosca das frutas do Mediterrâneo (*Ceratitis capitata*). Esta técnica, denominada SIT (do inglês – Sterile Insect Technique) baseia-se na criação massiva e liberação um grande número de insetos machos submetidos a doses de radiação, que promove a quebra irreparável do material genético tornando o inseto estéril. A vantagem dessa técnica é que ela se aproveita do comportamento do macho em procurar fêmeas para copular, não utiliza nenhum tipo de inseticida, é espécie-específica e ambientalmente segura. (Alphey 2002; Dyck, ichs et al. 2005; Phuc, Andreasen et al. 2007; Alphey, et al. 2008; Catteruccia, et al. 2009). Por outro lado, o sistema tende a ser instável e pode reduzir drasticamente o fitness dos machos, tornando-os menos competitivos e ineficientes para cópula. A separação entre machos e fêmeas também não é totalmente eficiente e permite que algumas fêmeas passem despercebidas pelo processo. Infelizmente essas fêmeas, mesmo recebendo as doses de radiação e permanecendo estéreis, são tão competentes para a transmissão dos agentes etiológicos quanto os insetos não-irradiados. (Alphey 2002; Alphey e Andreasen 2002; Benedict e Robinson 2003; Alphey, et al. 2008).

Liberação de machos carregando gene letal - RIDL

Conhecido como uma evolução da técnica do inseto estéril, o RIDL (do inglês – Release of Insect carrying Dominant Lethal gene) é um sistema transgênico espécie-específico que induz a letalidade nos organismos portadores do transgene. Como em SIT, mosquitos RIDL são produzidos em larga escala e apenas os machos são liberados. Com essas linhagens há diminuição na quantidade de adultos (fase em que ocorre a transmissão do patógeno) na ausência de um repressor que controla o sistema letal. Quando se reduz a população também se reduz os casos de doença.

O sistema repressível possui o ativador transcripcio-

nal tetraciclina - repressível (tTA)- que ativa o promotor de tetO que regula o gene efetor. O sistema é bloqueado quando existe a presença de tetraciclina no interior do mosquito, pois tTA tem mais afinidade por tetraciclina do que por tetO.

A linhagem OX513A de *Aedes aegypti* usa o sistema representado na figura 1, onde o aumento exacerbado dos níveis de tTA promove mortalidade nas células, pois tetO funciona em retroalimentação positiva (feedback positivo) estimulando ainda mais a expressão de tTA no interior das células. Desta forma, machos RIDL homozigotos que são liberados copulam com fêmeas selvagens e toda a prole será portadora do transgene e morrerá por toxicidade causada pelos altos níveis de tTA nas células. Atualmente esta linhagem desenvolvida para o combate do vírus dengue é a mais preparada e estudada para iniciar os testes de campo em áreas infestadas pelo vetor e que tenha ocorrência do vírus. (Alphey e Andreasen 2002; Gong, et al. 2005; Fu, Condon et al. 2007).

Figura 01. Sistema tTA - tetO repressível apresentado pela linhagem OX513A de *Aedes aegypti*. (A) ausência de tetraciclina permite o sistema de retroalimentação e causa a morte do inseto; (B) presença de tetraciclina bloqueia o sistema por afinidade entre as moléculas. et al. 2000).

Os gráficos 01 e 02 representam modelos teóricos de como a tecnologia RIDL para a linhagem OX513A funciona em campo. No gráfico 1 observamos uma situação onde a população de mosquitos não depende da sazonalidade pluviométrica, pois há uma flutuação populacional constante durante todo o ano. Neste caso a introdução dos machos RIDL deve ser intensa e mantida para que a população não volte a subir e atinja os níveis necessários para reiniciar a transmissão do patógeno.

Por outro lado, em regiões onde o regime de chuvas está intimamente ligado com a flutuação populacional, como mostra o gráfico 2, a liberação ocorre quando há o menor índice populacional (período de seca) na região para que esse índice se mantenha baixo ou se possível seja

reduzido ainda mais.

Recentemente a linhagem OX513A chegou ao Brasil e foram iniciados testes de compatibilidade com linhagens brasileiras e testes de competitividade entre machos transgênicos e selvagens com fêmeas selvagens. Outros parâmetros que compreendem a tabela de vida também estão sendo avaliados. A realização desses estudos em laboratório mostrou que não existe preferência por parte das fêmeas da linhagem Higgs (linhagem exclusiva de laboratório) entre machos Higgs selvagens e machos transgênicos RIDL (OX513A). De fato, o resultado encontrado foi que 47% das fêmeas preferiram os machos RIDL, e 53% preferiram machos Higgs.

Gráfico 1. Modelo de flutuação populacional independente da sazonalidade pluviométrica.

Esta linhagem atualmente está sob fase de teste de campo no município de Juazeiro no estado da Bahia em cinco localidades, como previsto pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio) que autorizou os testes de campo. Em fevereiro de 2011 foi realizada a primeira liberação de mosquito transgênico da América do Sul (dados ainda não publicados).

Com a mesma linha de pensamento, a construção conhecida como Flightless (OX3604) possui um fenótipo fêmea-específico repressível que afeta os músculos de voo, impedindo assim que a fêmea copule, seja capaz de se alimentar ou de realizar qualquer outra atividade inerente ao ciclo de vida. Esta linhagem ainda não apresenta resulta-

Gráfico 02: Modelo de flutuação populacional seguindo regime de chuva.

dos no campo (Fu, e col., 2009). Como a prole resultante do cruzamento entre transgênicos e selvagens, portadora do transgene não sobrevive, a construção não é inserida na população original. Isso permite um maior controle da liberação dos mosquitos e também permite utilizar este tipo de linhagem transgênica como uma nova ferramenta no manejo integrado de vetores.

O tema transgenia provoca inúmeras reações nas diferentes classes da população humana, e geralmente organismos geneticamente modificados enfrentam forte ceticismo. Esta é a razão de se apresentar à população informações suficientes quanto ao uso dessa tecnologia, pois a aceitação pública é prioritária e essencial para quaisquer testes com mosquitos transgênicos em campo e estes testes devem estar de acordo com as exigências das autoridades responsáveis (Dyck, et al. 2005; Marshall, et al. 2010).

Considerações Finais

Em conjunto com as ações e ferramentas disponíveis, o uso de mosquitos transgênicos contribui na redução do número de casos das doenças veiculadas por esses vetores. Os avanços tecnológicos alcançados até agora têm potencial em aumentar a eficácia e eficiência do controle genético de vetores (Fu, e col., 2009)

É importante que as questões éticas, sociais e políticas sejam levadas em consideração, tais como informar a população humana incluída na área de estudo, órgãos governamentais responsáveis e cientistas locais sobre os riscos e benefícios da possível liberação de mosquitos transgênicos (Jacobs-Lorena, 2003; Alphey, 2002b).

Um estudo realizado em Mali, sobre a possível liberação de mosquitos transgênicos para o controle da malária surpreendente demonstrou que a maioria da população entrevistada é a favor da liberação. Parte dos entrevistados exigiu algum tipo de teste em outras regiões e/ou testes laboratoriais, além de um maior embasamento referencial sobre o assunto por parte das autoridades e da comunidade científica a respeito do assunto, somente uma minoria se mostrou contra a liberação (Marshall, 2000).

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer o suporte financeiro da FAPESP, CNPq, MCT/DECIT e INTC-EM.

Bibliografia

- Adelman, Z. N., I. Sanchez-Vargas, et al. (2002). "RNA silencing of dengue virus type 2 replication in transformed C6/36 mosquito cells transcribing an inverted-repeat RNA derived from the virus genome." *J Virol* 76(24): 12925-33.
- Alphey, L. (2002). "Re-engineering the sterile insect technique." *Insect Biochem Mol Biol* 32(10): 1243-7.
- Alphey, L. and M. Andreasen (2002). "Dominant lethality and insect population control." *Mol Biochem Parasitol* 121(2): 173-8.
- Alphey, L., M. Benedict, et al. (2009). "Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis." *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3): 295-311.

- Alphey, L., D. Nimmo, et al. (2008). "Insect population suppression using engineered insects." *Adv Exp Med Biol* 627: 93-103.
- Araújo, R. V. (2007). Estudo dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti*. Departamento de Parasitologia - ICB II. São Paulo, Universidade de São Paulo. Doutorado.
- Benedict, M. Q. and A. S. Robinson (2003). "The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique." *Trends Parasitol* 19(8): 349-55.
- Bracco, J. E., M. Dalbon, et al. (1997). "[Resistance to organophosphorous and carbamates insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*]." *Rev Saude Publica* 31(2): 182-3.
- Catteruccia, F., A. Crisanti, et al. (2009). "Transgenic technologies to induce sterility." *Malar J* 8 Suppl 2: S7.
- Coleman, P. G. and L. Alphey (2004). "Genetic control of vector populations: an imminent prospect." *Trop Med Int Health* 9(4): 433-7.
- Darriet, F., S. Marcombe, et al. (2010). "Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies)." *Parasit Vectors* 3: 88.
- de Lara Capurro, M., J. Coleman, et al. (2000). "Virus-expressed, recombinant single-chain antibody blocks sporozoite infection of salivary glands in *Plasmodium gallinaceum*-infected *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg* 62(4): 427-33.
- Deane, L. M. (1986). "Malaria vectors in Brazil." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81: 5-14.
- Dyck, V., J. Hendrichs, et al. (2005). History of the Sterile Insect Technique. *Sterile Insect Technique*, Springer Netherlands: 3-36.
- Dyck, V., J. Hendrichs, et al. (2005). Public Relations and Political Support in Area-Wide Integrated Pest Management Programmes that Integrate the Sterile Insect Technique. *Sterile Insect Technique*, Springer Netherlands: 547-559.
- Enayati, A. and J. Hemingway (2010). "Malaria management: past, present, and future." *Annu Rev Entomol* 55: 569-91.
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia Médica - Identificação, biologia e sistemática*. São Paulo, Edusp.
- Franz, A. W., I. Sanchez-Vargas, et al. (2006). "Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4198-203.
- Fu, G., K. C. Condon, et al. (2007). "Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing." *Nat Biotechnol* 25(3): 353-7.
- Garcia, L. S. (2010). "Malaria." *Clin Lab Med* 30(1): 93-129.
- Gong, P., M. J. Epton, et al. (2005). "A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly." *Nat Biotechnol* 23(4): 453-6.
- Gubler, D. J. (1998). "Resurgent vector-borne diseases as a global health problem." *Emerg Infect Dis* 4(3): 442-50.
- Gubler, D. J. (2002). "The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems." *Arch Med Res* 33(4): 330-42.
- Harris, A. F., S. Rajatileka, et al. (2010). "Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman." *Am J Trop Med Hyg* 83(2): 277-84.
- Hay, B. A., C. H. Chen, et al. (2010). "Engineering the genomes of wild insect populations: challenges, and opportunities provided by synthetic Medea selfish genetic elements." *J Insect Physiol* 56(10): 1402-13.
- Horn, C. and E. A. Wimmer (2003). "A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management." *Nat Biotechnol* 21(1): 64-70.
- Hurd, H. (1994). "Interactions between parasites and insects vectors." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 27-30.
- Ito, J., A. Ghosh, et al. (2002). "Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite." *Nature* 417(6887): 452-5.
- Jacobs-Lorena, M. (2003). "Interrupting malaria transmission by genetic manipulation of anopheline mosquitoes." *J Vector Borne Dis* 40(3-4): 73-7.
- Jasinskiene, N., J. Coleman, et al. (2007). "Genetic control of malaria parasite transmission: threshold levels for infection in an avian model system." *Am J Trop Med Hyg* 76(6): 1072-8.
- Killeen, G. F., U. Fillinger, et al. (2002). "Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa?" *The Lancet Infectious Diseases* 2(10): 618-627.
- Kokoza, V., A. Ahmed, et al. (2000). "Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9144-9.
- Kokoza, V., A. Ahmed, et al. (2010). "Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8111-6.
- Leite, M. E. and K. K. R. Carneiro de Abreu (2009). "Sistema de informação geográfica aplicada à distribuição do caso de dengue na microregião de Pirapora - MG." *HYGEIA* 5(9): 63 - 76.
- Lima, J. B., M. P. Da-Cunha, et al. (2003). "Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil." *Am J Trop Med Hyg* 68(3): 329-33.
- Lorenzen, M. D., A. Gnirke, et al. (2008). "The maternal-effect, selfish genetic element Medea is associated with a composite Tc1 transposon." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 10085-9.
- Maciel, C., V. X. de Oliveira Junior, et al. (2008). "Anti-*Plasmodium* activity of angiotensin II and related synthetic peptides." *PLoS One* 3(9): e3296.
- Macoris, M., M. T. Andrighetti, et al. (1999). "[Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil]." *Rev Saude Publica* 33(5): 521-2.
- Marshall, J. M. and C. E. Taylor (2009). "Malaria control with transgenic mosquitoes." *PLoS Med* 6(2): e20.
- Marshall, J. M., M. B. Toure, et al. (2010). "Perspectives of people in Mali toward genetically-modified mosquitoes for malaria control." *Malar J* 9: 128.
- Mirzaian, E., M. J. Durham, et al. (2010). "Mosquito-borne illnesses in travelers: a review of risk and prevention." *Pharmacotherapy* 30(10): 1031-43.
- Moreira, L. A., A. K. Ghosh, et al. (2002). "Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control." *Int J Parasitol* 32(13): 1599-605.
- Mourya, D. T., Gokhale, et al. (2001). "Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes." *Acta Virol* 45(2): 67-71.
- Nirmala, X. and A. A. James (2003). "Engineering *Plasmodium*-refractory phenotypes in mosquitoes." *Trends Parasitol* 19(9): 384-7.
- Oliveira-Ferreira, J., M. V. Lacerda, et al. (2010). "Malaria in Brazil: an overview." *Malar J* 9: 115.
- Paris, M., G. Tetreau, et al. (2010). "Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes." *Pest Manag Sci* 67(1): 122-8.
- Phuc, H. K., M. H. Andreasen, et al. (2007). "Late-acting

- dominant lethal genetic systems and mosquito control.” BMC Biol 5: 11.
- Rajatileka, S., J. Burhani, et al. (2011). “Mosquito age and susceptibility to insecticides.” Trans R Soc Trop Med Hyg.
- Rivero, A., J. Vezilier, et al. (2010). “Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem?” PLoS Pathog 6(8).
- Sinkins, S. P. and F. Gould (2006). “Gene drive systems for insect disease vectors.” Nat Rev Genet 7(6): 427-35.
- Speranca, M. A. and M. L. Capurro (2007). “Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review.” Mem Inst Oswaldo Cruz 102(4): 425-33.
- Staples, J. E., R. F. Breiman, et al. (2009). “Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease.” Clin Infect Dis 49(6): 942-8.
- Tauil, P. L. (2002). “[Critical aspects of dengue control in Brazil].” Cad Saude Publica 18(3): 867-71.
- Thomas, D. D., C. A. Donnelly, et al. (2000). “Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system.” Science 287(5462): 2474-6.
- Travanty, E. A., Z. N. Adelman, et al. (2004). “Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*.” Insect Biochem Mol Biol 34(7): 607-13.
- WHO (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control
- World Health Organization - WHO: 148.
- WHO. (2010). “Health topics – Dengue.” Retrieved March, 2011, 2011, from <http://www.who.int/topics/dengue/en/>.
- Windbichler, N., P. A. Papathanos, et al. (2007). “Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos.” Nucleic Acids Res 35(17): 5922-33.
- Yahara, K., M. Fukuyo, et al. (2009). “Evolutionary maintenance of selfish homing endonuclease genes in the absence of horizontal transfer.” Proc Natl Acad Sci U S A 106(44): 18861-6.

ANEXO B

Artigo 02 Carvalho, D.O. et al. Mass production of RIDL *Aedes aegypti* for field releases in. (ênfase de elaboração).

Mass production of RIDL *Aedes aegypti* for field releases in Brazil

Authors:

Danilo O. Carvalho, André B. B. Wilke, Derric D. Nimmo, Neil Naish, Andrew R. McKemey, Pam Gray, Mauro T. Marrelli, Jair F. Virginio, Luke Alphey and Margareth L. Capurro

Authors: institution(s)/affiliations(s) for each author:

Danilo O. Carvalho
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, BR
and Oxitec Ltd, UK
cdanilo@usp.br

André B. B. Wilke
Departamento de Epidemiologia
Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo, BR
andrewilke@usp.br

DerricNimmo
Oxitec Ltd, UK
derric.nimmo@oxitec.com

Neil Naish
Oxitec Ltd, UK
neil.naish@oxitec.com

Andrew R. McKemey
OxitecLtd,UK
andrew.mckemey@oxitec.com

Pam Gray
OxitecLtd, UK
pam.gray@oxitec.com

Mauro T. Marrelli
Departamento de Epidemiologia
Faculdade de Saúde pública
Universidade de São Paulo, BR
mmarelli@usp.br

Jair F. Virginio
Moscamed Brasil
Juazeiro, Bahia, BR
jair@moscamed.org.br

Luke Alphey

Oxitec Ltd, UK
and
Dept. of Zoology
University of Oxford. UK
luke.alphey@oxitec.com

Margareth L. Capurro
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, BR
and
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular
(INCT-EM), BR
mcapurro@icb.usp.br

Corresponding author:

Margareth L. Capurro

Keywords:

Aedes aegypti; mass rearing; population suppression; RIDL; SIT; transgenic; insect; mosquito; dengue.

Short abstract: (50 words maximum)

To achieve population suppression of *Aedes aegypti* using the RIDL[®] (Release of Insects carrying a Dominant Lethal) system, large numbers of male mosquitoes need to be released. This requires the use of mass rearing techniques and technology to provide optimised systems to obtain the maximum number of high quality male mosquitoes.

Long abstract (150 words minimum, 400 words maximum)

New techniques and methods are being sought to try to win the battle against mosquitoes. Recent advances in molecular techniques have led to the development of new and innovative methods of mosquito control based around the Sterile Insect Technique (SIT) (Alphey et al., 2010; Dyck et al., 2005a; Dyck et al., 2005b). A control method known as RIDL[®] (Release of Insects carrying a Dominant Lethal, (Thomas et al., 2000) is based around SIT, but uses genetic methods to remove the need for radiation-sterilisation. (Fu et al., 2007; Fu et al., 2010; Gong et al., 2005; Phuc et al., 2007). A RIDL strain of *Ae. aegypti* was successfully tested in the field in Grand Cayman (Harris et al, 2011, Harris et al, submitted); further field use is planned or in progress in other countries around the world.

Mass rearing of insects has been established in several insect species and to levels of billions a week. However, in mosquitoes, rearing has generally been performed on a much smaller scale with most large scale rearing being performed in the 1970's and 80's. For an RIDL program it is desirable to release as few females as possible as they bite and transmit disease. In a mass rearing programme there are several stages to producing the males for release; egg production, rearing the eggs through to pupae and then sorting the males for release. These males are then used for a RIDL control programme released as either pupae or as adults (Bailey et al., 1980; Benedict et al., 2009).

To suppress a mosquito population using RIDL a large number of high quality male adults need to be reared (Alphey, 2002; Alphey and Andreasen, 2002; Alphey et al., 2010; Alphey et al., 2008; Alphey, 2009; Atkinson et al., 2007; Wise de Valdez et al., 2011). The following describes the methods for the mass rearing of OX513A, a RIDL strain of *Ae. aegypti* (Phuc et al., 2007) for release, covering the techniques required for the production of eggs and RIDL males for a control programme.

Introduction:

Mosquitoes transmit many pathogens that can cause disease in humans. Mosquito control has been an on-going battle for centuries. Control strategies for insects based on chemical and biological control have had some notable successes, but in many cases control has not been sustainable in the long term. An example is Brazil that achieved the eradication of *Ae. aegypti* in the 50's and faces a new invasion of the mosquitoes. This can be attributed to many causes, including insecticide resistance, re-invasion, environmental damage and poor control programme implementation (Bracco et al., 1997; Campos and Andrade, 2003; Gubler, 1998; Harris et al., 2010; Lima et al., 2003; Paris et al., 2010). Currently many mosquito species are increasing in number and distribution; *Aedes aegypti* has reinvaded areas from which it was successfully removed and is infesting new areas at an alarming rate.

New techniques and methods are being sought to try to win this battle against mosquitoes. Recent advances in molecular techniques have led to the development of new and innovative methods of mosquito control based around the Sterile Insect Technique (SIT) (Alphey et al., 2010; Dyck et al., 2005a; Dyck et al., 2005b). A control method known as RIDL[®] (Release of Insects carrying a Dominant Lethal, (Thomas et al., 2000)) is based around SIT, but uses genetic methods to remove the need for radiation-sterilisation. RIDL strains have been constructed for several pest species including *Ae. aegypti* (Fu et al., 2007; Fu

et al., 2010; Gong et al., 2005; Phuc et al., 2007). A RIDL strain of *Ae. aegypti* was successfully tested in the field in Grand Cayman (Harris et al, 2011, Harris et al, submitted); further field use is planned or in progress in other countries around the world. To suppress a mosquito population using RIDL a large number of high quality male adults need to be reared (Alphey, 2002; Alphey and Andreasen, 2002; Alphey et al., 2010; Alphey et al., 2008; Alphey, 2009; Atkinson et al., 2007; Wise de Valdez et al., 2011).

Mass rearing of insects has been established in several insect species and to levels of millions a week. However, in mosquitoes, rearing has generally been performed on a much smaller scale with most large scale rearing being performed in the 1970's and 80's. To our knowledge no recent SIT-type programmes have been conducted on a significant scale against *Ae. aegypti*.

For SIT it is generally considered desirable to release only males. If females are not removed from the release stream, the released sterile males may then seek and court released sterile females rather than wild ones; the sterile females thereby 'distract' the sterile males and reduce programme effectiveness. In addition male mosquitoes do not bite or transmit disease. Male-only release was shown to be 3-5 fold more effective than mixed-sex release in large field experiments with irradiated Mediterranean fruit flies (Rendón et al., 2004). Furthermore, for mosquitoes, adult females bite but males do not, so removing females before release is also desirable to prevent any potential increase in biting. Large-scale separation of males from females requires a difference between the sexes. This may exist naturally, for example pupal size in *Ae. aegypti*, as used in the procedures described here. Alternatively it may be necessary to induce such a difference by use of genetics; strains which facilitate large-scale removal of one sex are called genetic sexing strains (Franz, 2005; Papathanos et al., 2009).

In a mass rearing programme there are several stages to producing the males for release. The first is to produce the eggs required for the release generation (Figure 1). The next stage is to rear the eggs through to pupae or adult, also separating the males from the females. These males are then used for a RIDL control programme released as either pupae or as adults (Bailey et al., 1980; Benedict et al., 2009).

The following describes the methods for the mass rearing of OX513A, a RIDL strain of *Ae. aegypti*(Phuc et al., 2007) for release, covering the techniques required for the production of eggs and RIDL males for a control programme.

ProtocolText:

Insectary requirements:

1. Overview

1. Mass rearing requires several distinct phases and a mass rearing unit comprises distinct areas within which these phases are performed. Figure 1 shows the main stages of rearing that occur in the mass rearing facility and their relationship. Each phase has slightly different rearing requirements and quality control.

2. Insectary conditions

2. Maintain temperature of all rooms at a constant 28°C ($\pm$ 2°C) with a relative humidity approximately 70 - 80% and a 12:12 hour light:dark cycle using fluorescent light strips.

3. Bio-security considerations for the insectary

- 3.1. The RIDL system uses conditional lethality; a dietary supplement (tetracycline) prevents the expression of the RIDL system allowing the insects to be mass reared, and without tetracycline the mosquitoes die. Tetracycline is not found in the breeding sites of *Ae. aegypti* in the wild so any offspring produced from escapees will not survive. This adds an extra level of security over using wild-type (WT) insects sterilised by other methods (i.e. radiation).
- 3.2. Use double-door entry, “Authorised Personnel Only” signs and insect screens in the insectary, to avoid contamination of the colony with WT insects. In addition all the windows are sealed and protected for a external displays.
- 3.3. Local regulations and authorities may have specific additional or alternative requirements. The relevant authorities should be contacted for information/guidance at an early stage, and all necessary permits and approvals secured before establishing the RIDL strain in an insectary.
- 3.4. The mass rearing insectary should only be used for RIDL rearing. No other strains or insects should be present. This is to avoid contamination of the RIDL strain and contamination with pathogens that may affect fitness and survival, reducing the productivity and effectiveness of released males.

4. Insectary design

- 4.1. Figure 2 shows a plan of the insectary used in Brazil at Moscamed.

- 4.2.** This blueprint can be modified according to specific space requirements, for example the scale of the release will determine overall size. However the egg production, rearing and sorting, Quality Control (QC) and releases should be separated into four distinct areas; Egg Production colony, Release Generation, QC and Adult Storage for Release.
- 4.3.** The Egg Production Colony room (approximately 20m²) is used to produce eggs for the release generation.
- 4.4.** The Quality Control area is where the insects in the Egg Production colony are checked for signs of reduced fitness. These tests include fluorescent screening, PCR, measurements of hatch rate, pupae numbers, pupa size and measuring effectiveness of sorting and removing females.
- 4.5.** The Release Generation room (approximately 36m²) requires adequate space for trays and the sorting of larvae and pupae. The trays are held in purpose-built aluminium racks. A large work area and sink are required for rearing and sorting. A large sink is also required for washing of trays and cages.
- 4.6.** An area is required for the storage of adults for release (Adult Storage for Release, Figure 2).

5. Production methods for mass rearing RIDL

The Egg Production colony produces the eggs that are used to produce adults in the Release Generation (Figure 1). There are some similarities in the rearing methods but also some distinct differences. The rearing methods are mainly described for the Egg Production colony and any differences are subsequently described for the Release generation rearing.

6. FilterColony

6.1. Larval production

- 6.1.1.** The Egg Production colony generates homozygous OX513A (Phuc et al., 2007) RIDL eggs for the release generation. High quality control ensures the viability, fitness and strain integrity of the eggs supplied.
- 6.1.2.** The stimulus for hatching is submersion in water with a low level of dissolved oxygen. To reduce the oxygen level in the water heat until it boils and immediately place into glass jars, fasten the lid securely and leave at room temperature for several hours to cool.

- 6.1.3.** Put the eggs into the jars of boiled water, re-seal and leave overnight under insectary conditions.
- 6.1.4.** Determine the hatch rate by imaging the eggs after hatching using a digital camera (the macro mode on most digital cameras is sufficient as long as a tripod and good lighting are used). ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) can be used to count hatched eggs using the cell counting function; hatched eggs can be identified as those which have the anterior portion missing and recorded by eye using ImageJ. A hatch rate of more than 70% is considered satisfactory.
- 6.1.5.** Determine the hatch rate by taking three aliquots of 0.1 ml each. Place the volume into a Petri dish and from three different regions count the number of hatched and non-hatched eggs. Sum these numbers to obtain the total number of eggs of each sample and divide the number of hatched eggs by the total number; the result is the hatch rate. A hatch rate of more than 70% is considered satisfactory.
- 6.1.6.** Place the hatched larvae into a known volume of water and stir using a magnetic stirrer and flea for sufficient time to take aliquots; stirring too long damages larvae and should be avoided. The standard volume used to hatch larvae is one litre, however densities of more than 300 larvae per ml are hard to count and may be damaging. Therefore do not hatch more than about 300,000 eggs per litre of water.
- 6.1.7.** Take one ml aliquots and place into five black weigh boats (larvae are white and therefore more readily visible against a black background) and count the number of live larvae present by eye (the use of a counter is recommended). The average number of larvae per ml is then be used to calculate the volume of water to add to each tray to get the desired number of larvae.
- 6.1.8.** There can be large differences in the density at which larvae can be reared between strains and species. It is also desirable to compare RIDL adult male size compared to wild type males from the control site; ideally you want similar to larger sized RIDL males that can compete successfully with wild males. In addition, for the Egg Production colony larger females will tend to produce more eggs. Therefore for each RIDL strain the ideal density of larvae needs to be determined in a trade-off against space constraints for rearing and the scale of production. Densities ranging from 0.1-1 larva per ml give the best combination of production and quality.

- 6.1.9.** Add the desired number of larvae to trays measuring about 53x37x8 cm (LxWxH). After addition of larvae, add 4 litres of water to the trays. In this conditions we use 9,000 larvae/tray.
- 6.1.10.** Add a stock solution of tetracycline (3 mg/ml in water) to the trays at a 1:100 dilution to obtain the required final concentration of 30µg/ml. Feed larvae flake fish food daily, which has been crushed to a fine powder (www.sera.de).
- 6.1.11.** Table 1 shows the typical feeding regime in mg of food per larvae per day. Larvae are fed daily until the appropriate day of sorting under the insectary conditions described above.

6.2. Sorting Larvae from pupae and Male and Female Pupae

- 6.2.1.** Sort larvae from pupae 8 days after hatching by separating the larvae from the pupae. Then sex-sort the pupae for males. A device known as a plate separator (Bailey et al., 1980; Focks, 1980a) can sort larvae from pupae and male from female pupae. Figure 3 illustrates the use of a plate separator to separate males from larvae and female pupae.
- 6.2.2.** Using a measure spoon with a mesh on the bottom, calibrate it with 500 pupae and use it to set up cages and estimate the total amount of males and females pupae.
- 6.2.3.** On the first day of sorting (day 8) most of the pupae are males, so place the sorted larvae back into a tray and rear through to the following day when most of the pupae are females (figure 4). Repeat the sorting process each day as described in Steps 6.2.1 to 6.2.3 until all the larvae have pupated.
- 6.2.4.** On day 8, take 1000 male pupae (using the measure spoon) and place in a cage and on day 9 add 3,000 female pupae to the same cage (we use 30 cm diameter PVC pipes adapted with mesh top and bottom and a netted access hole, but 30x30x30 cm plastic cages are also available from BugDorm). From a cage of 3,000 females we would expect to get about 100 - 130,000 eggs over a week and during the first gonotrophic cycles; the cage is kept for two weeks and blood fed twice a week. Provide 10% sucrose solution on wet cotton *ad libitum*.
- 6.2.5.** Allow adults to mate at least for 2 days and offer a blood meal.

6.3. BloodFeeding

- 6.3.1.** The Hemotek feeding system (details available from hemotek@discoveryworkshops.co.uk) is used to supply cages with blood twice a week (Figure 5). The blood we use for feeding is from a local abattoir; as these animals are for human consumption they are tested to avoid the presence of pathogens.
- 6.3.2.** Three days after blood feeding, provide an oviposition site for the females to lay their eggs. The oviposition site is a round plastic container with filter paper soaked in water covering the inside; this is removed two days later. For maximum egg production, make sure the filter paper covers the entire available surface inside the container.
- 6.3.3.** Remove the egg paper and place onto absorbent paper to dry under insectary conditions; eggs require a period of conditioning at high humidity (over 70%) of at least 48 hours after being laid. Eggs can be left in the insectary for up to 3 months with minimal decrease in hatch rate, as long as the humidity is kept high.
- 6.3.4.** The egg production colony needs to be of sufficient size to provide the number of eggs required on a weekly basis for the release programme. The facility described above can produce approximately 5 million eggs a week (figure 6).

7. Release Generation

7.1. Larval production

- 7.1.1.** The hatching, rearing and sorting for the release generation are identical to the previously described method for the Egg Production colony, except that the number of eggs, larvae and pupae are larger. This requires more trays and more effort for sorting.

7.2. Sorting Larvae from pupae and Male and Female Pupae

- 7.2.1.** After sorting the male pupae it is important to check for female contamination before release; there should not be more than 1% females present. Take three aliquots of 500 pupae and count the number of female pupae present. Females can be identified since they are generally larger than males and also from the genital lobe shape (Figure 7). If there is greater than 1% females they should be sorted again.
- 7.2.2.** Use only the males from day 8 for release, the females and remaining larvae are disposed of by autoclaving. Do not use the female pupae or larvae from the

release generation for the egg production colony because of quality control and contamination risks.

7.3. AdultStorage for Release

7.3.1. Place males into release devices to emerge and mature before release. The details of the release devices are not covered in this paper.

8. Representativeresults:

The expected pupation results for production are shown in figure 4. The males pupate first, peaking on day 8 and the females peak on day 9 after hatching. It is important to measure this pupation curve to know the best time to sort for males and females for each stage of rearing. For example for release only males are required and collection of males should be optimised whilst having as few females as possible. Since March 2011, the Egg Production colony has been able to produce up to 5 million eggs in a week, averaging about 4,5 million (figure 6). From about 7 million eggs hatched so far about 1,1 million adult males were collected (figure 8). Therefore we were able to recover about 16% of males from the total eggs hatched. Knowing this percentage production of males from eggs allows the estimation of the number of eggs required for a trial, given the number of adult males needed.

9. QualityControl

9.1. Transgene phenotypecontrol

In order to verify if the gene expression two controls are done, the first one is to check if the fluorescent protein is being expressed as expected. 2,000 first instar larvae are taken during aliquoting trays phase and they are submitted under fluorescent light of a stereomicroscope and the number of fluorescent and non-fluorescent larvae is recorded from each batch (suppression and colony). The expected result is that all larvae show the fluorescent marker.

The second control made about the gene expression is to keep first instar larvae in absence of tetracycline, this will allow the transgene to proceed with the lethal system, killing the larvae before it reaches adulthood. A extra tray is set up separately and no tetracycline is add on it. The feeding regime is the same as used for trays with tetracycline but about day 6 after hatching no more food is added. From day 7 to 9 pupae is recovered using the same sorting system described previously and the number

of larvae and pupae are recorded and the pupae are kept to see if any imago will emerge. It is expected that up to 3% of the pupae will become adults.

9.2. Additional Controls

Four trays randomly are also marked to be sorted separately. The number of males and females pupae is recorded from each tray, this way we can check the proportion of each sex on each tray per sorting day.

9.2.1. Pupae Measurements

From each batch and every sorting day take around 50 pupae (of both sexes) and place them in a dish with a graticule scale and take a picture using a digital camera (the macro mode on most digital cameras is sufficient as long as a tripod and good lighting are used). Open the picture using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) which pupae can be measured setting up the graticule scale distance (mm) as the pattern to measure objects on the picture (correspondent pixels). Measure the size of the cephalothorax of at least 30 pupae randomly and calculate the mean value and keep records of each batch. For males, the size between 0.9 – 1.0 mm are expected and for females around 1.1 – 1.2mm.

10. Discussion

RIDL is an effective, cost-efficient and environmentally safe method of controlling mosquitoes (Alphey et al., 2010; Alphey et al., 2008; Alphey et al., 2011; Atkinson et al., 2007). In combination with conventional control methods including larvicides, breeding site reduction and adulticides it has the potential to substantially reduce *Ae. aegypti* populations around the world. This method describes how to produce up to 500,000 RIDL male pupae per week for use in the control of *Ae. aegypti*. To our knowledge this is the first description of the production of transgenic mosquitoes for release on this scale. There were some comparable production systems developed for *Ae. aegypti* in the 1960's and 70's (Ansari et al., 1977; Fay et al., 1963) for laboratory wild type strains. However there has been no comparable production on this scale with *Ae. aegypti* since then. The techniques described above have been used in two separate laboratories in Brazil and the UK to produce RIDL eggs. In the Cayman Islands around 3.3 million RIDL males were released over a 6 month period (Harris et al., 2011) and in Brazil around 6.3 million males have been released so far.

The numbers of males to be release in an area is dependent on a number of factors including the size of wild *Ae. aegypti* population, the dispersal, survival and mating

competitiveness of RIDL males after release, and environmental conditions. Previous studies have shown that RIDL can reduce a population of mosquitoes by at least 70%.

Disclosures: No conflicts of interest declared.

Acknowledgments: We would like to thank Biofábrica Mosca med Brasil, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) for financial support. We also would like to thank the following people for their assistance: Miriam dos Santos, Gildeane Silva, Gessilane dos Santos, Fabio Gonçalves, John Paul Oliveira, Luiza Garziera and José Carlos Valença.

Table and Figures:

Figure 1: Stages of mass rearing mosquitoes for use in a RIDL SIT programme. The Egg Production colony has a high level of quality control to ensure the quality of the eggs supplied to the release generation. Eggs are reared through to pupae in the release colony, where the males are sorted from the females. The male adults are then used for the RIDL control programme.

Figure 2: Schematic of the rearing facility for the production of RIDL males for a release programme. High quality eggs are continually produced in the egg production colony room and are then reared through to pupae in the release generation room. The larvae and pupae are then separated and the pupae sex-sorted for males. The males are then placed into release devices and stored for release in the adult storage and release room.

Figure 3: Separating larvae, male and female pupae using a plate separator (Focks, 1980b). The plate separator uses the size difference between larvae, male pupae and female pupae to sort these three different life stages; larvae tend to be smaller than male pupae which are in turn smaller than female pupae. The instrument comprises two glass plates; one is fixed to a slanted metal frame and the other sits on top of the first plate and can be moved relative to the first using four adjustment screws (A). The four adjustment screws allow the outer plate to be set at an angle to the back plate so a wedge shaped space is formed between the plates, tapering downwards. Larvae and pupae are poured into the top of the device (B) and gently washed between the plates using a wash bottle (C). By adjusting the angle of the plate, larvae, male pupae and female pupae can be separated (D). With continuous flushing with water using a hose, and adjustment of the plate angle the larvae can be flushed through first (into a sieve), followed by the male pupae and finally the female pupae.

Figure 4: Pupation curves for mass reared RIDL *Ae. aegypti*. This graph shows the average percentage pupation for mass reared RIDL male and female pupae. For collecting male pupae on day 8 for release we get on average 70% of the total male pupae in the tray with about 20% female contamination. Collecting the rest of the male pupae the next day is laborious because there are many more contaminating females and this is not normally performed.

Figure 5: The Hemotek blood feeding system. The general equipment for blood feeding is shown in picture A. Stretch the feeding membrane (we use animal intestine obtained from a butcher) over the feeding reservoir and secure with the rubber rings supplied (C). Using a 2.5ml pastette, fill the reservoir with 3ml of blood (we use sheep, goat, horse or donkey blood (B) from a local abattoir which is screened for pathogens). Fill at a slight angle to avoid introducing air bubbles (D + E). Plug holes in reservoir with plastic plugs provided (F). Attach reservoir to Hemotek feeding unit, and stretch Parafilm over the whole feeding surface of the Hemotek feeder (G). Breathe on the Parafilm and touch it on a human arm a few times to pick up human odours. Place the feeder on top of an adult cage (H) and breathe into the cage as carbon dioxide stimulates the females to feed.

Figure 6: Egg production for the period of June-July 2011 from the Egg Production colony.

Figure 7: Distinguishing male and female *Ae. aegypti* pupae. *Ae. aegypti* pupae can be reliably sexed by the genital lobe (at the end of the pupal abdominal segments just below the paddles). Males also tend to be much smaller than females.

Figure 8: Male RIDL pupae production from March to July 2011.

Table 1: General feeding regime for *Ae. aegypti* RIDL larvae (mg of food per larva per day). To calculate actual amount of food required multiply by the total number of larvae per tray. If rearing for more than 8 days the same amount of food per larva as day 8 is used until all larvae have pupated.

Day								
Amount of food per larvae (mg)	.06	.08	.16	.31	.64	.32	.32	.32

Table of specific reagents and equipment:

Equipment and consumables	Company	Catalogue number	Website	Comments
Vipan Premium	Sera GmbH	190	http://www.sera.de/uk/pages/products/product/sera-vipan-3.html	Fish food of high quality
Tetracycline	Sigma Aldrich	T7660	http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO BRAND_KEY&N4=T7660 SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC	Required for rearing RIDL larvae
Plate separator	J.W. Hock	5412	http://www.johnwhock.com/download/manuals/instr_5412_separator.pdf	Separating larvae and pupae
Hemotek blood feeder	Discovery Workshops, Accrington, UK		http://www.cylex-uk.co.uk/company/discovery-workshops-16067747.html	Blood feeding
Rearing pans for Release generation (53x38x8 cm)	Pleion	0757	http://pleion.actcenter.com.br/produtos.asp?opcao=1	Larval rearing Release generation
Fluorescent scope	Leica - microsystems	MZ10 F	http://www.leica-microsystems.com/products/stereo-microscopes-microscopes/fluorescence/details/product/leica-mz10-f/	Viewing fluorescent RIDL larvae
Adult cages	BugDorm	DP1000	http://bugdorm.megaview.com.tw/bugdorm-1-insect-rearing-cage-30x30x30-cm-pack-of-one-p-29.html	Cages for Egg production colony
Filter paper	CELAB	512-1004	https://uk.vwr.com/app/catalog/Product?article_number=512-1008	Filter paper for egg laying

References:

1. Alphey, L. (2002). Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1243-1247.
2. Alphey, L., and Andreasen, M. (2002). Dominant lethality and insect population control. *Mol Biochem Parasitol* 121, 173-178.
3. Alphey, L., Benedict, M.Q., Bellini, R., Clark, G.G., Dame, D., Service, M., and Dobson, S. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases – an analysis. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10, 295-311.
4. Alphey, L., Nimmo, D., O'Connell, S., and Alphey, N. (2008). Insect population suppression using engineered insects. *Adv Exp Med Biol* 627, 93-103.
5. Alphey, N. (2009). Modelling optimal strategies for novel genetics-based pest management. In Thesis - Department of Zoology (Oxford, UK, University of Oxford), pp. 253.
6. Alphey, N., Alphey, L., and Bonsall, M.B. (2011). A Model Framework to Estimate Impact and Cost of Genetics-Based Sterile Insect Methods for Dengue Vector Control. *PLoS ONE* 6, e25384.
7. Ansari, M., Singh, K., Brooks, G., Malhotra, P., and Vaidyanathan, V. (1977). The development of procedures and techniques for mass rearing of *Aedes aegypti*. *Indian J Med Res* 65, (Suppl) 91-99.
8. Atkinson, M.P., Su, Z., Alphey, N., Alphey, L.S., Coleman, P.G., and Wein, L.M. (2007). Analyzing the control of mosquito-borne diseases by a dominant lethal genetic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9540-9545.
9. Bailey, D.L., Lowe, R.E., Dame, D.A., and Seawright, J.A. (1980). Mass Rearing the Genetically Altered Macho Strain of *Anopheles Albimanus* Wiedemann. *Am J Trop Med Hyg* 29, 141-149.
10. Benedict, M.Q., Knols, B.G., Bossin, H.C., Howell, P.I., Mialhe, E., Caceres, C., and Robinson, A.S. (2009). Colonisation and mass rearing: learning from others. *Malar J* 8 *Suppl* 2, S4.
11. Bracco, J.E., Dalbon, M., Marinotti, O., and Barata, J.M. (1997). [Resistance to organophosphorous and carbamates insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*]. *Rev Saude Publica* 31, 182-183.
12. Campos, J., and Andrade, C.F. (2003). [Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides]. *Rev Saude Publica* 37, 523-527.
13. Dyck, V., Hendrichs, J., Robinson, A.S., Bakri, A., Mehta, K., and Lance, D. (2005a). Sterilizing Insects with Ionizing Radiation. In *Sterile Insect Technique* (Springer Netherlands), pp. 233-268.
14. Dyck, V., Hendrichs, J., Robinson, A.S., Klassen, W., and Curtis, C. (2005b). History of the Sterile Insect Technique. In *Sterile Insect Technique* (Springer Netherlands), pp. 3-36.
15. Fay, R.W., McCray, E.M., and Kilpatrick, J.W. (1963). Mass production of sterilized male *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 23, 210-214.
16. Focks, D. (1980a). An improved separator for the developmental stages, sexes, and species of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 17, 567 - 568.
17. Focks, D.A. (1980b). An improved separator for separating the developmental stages, sexes and species of mosquitoes. *Mosq News* 19, 144-147.
18. Franz, G. (2005). Genetic sexing strains in mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique Principles and practice in area-wide integrated pest management*, V.A. Dyck, J. Hendrichs, and A.S. Robinson, eds. (The Netherlands, Springer), pp. 427-451.
19. Fu, G., Condon, K.C., Epton, M.J., Gong, P., Jin, L., Condon, G.C., Morrison, N.I., Dafa'alla, T.H., and Alphey, L. (2007). Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nature Biotechnology* 25, 353-357.
20. Fu, G., Lees, R.S., Nimmo, D., Aw, D., Jin, L., Gray, P., Berendonk, T.U., White-Cooper, H., Scaife, S., Kim Phuc, H., *et al.* (2010). Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4550-4554.

21. Gong, P., Epton, M.J., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K.C., Condon, G.C., Morrison, N.I., Kelly, D.W., Dafa'alla, T., *et al.* (2005). A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nat Biotech* 23, 453-456.
22. Gubler, D.J. (1998). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging infectious diseases* 4, 442-450.
23. Harris, A.F., McKemey, A., Nimmo, D., Curtis, Z., Black, I., Morgan, S., Neira, M., Lacroix, R., Naish, N., Morrison, N., *et al.* (2011). Suppression of a field mosquito population by release of engineered male mosquitoes. In review.
24. Harris, A.F., Rajatileka, S., and Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83, 277-284.
25. Lima, J.B., Da-Cunha, M.P., Da Silva, R.C., Galardo, A.K., Soares Sda, S., Braga, I.A., Ramos, R.P., and Valle, D. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68, 329-333.
26. Papathanos, P., Bossin, H., Benedict, M., Catteruccia, F., Malcolm, C., Alphey, L., and Crisanti, A. (2009). Sex separation strategies: past experience and new approaches. *Malaria Journal* 8, S5.
27. Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., and David, J.P. (2010). Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci* 67, 122-128.
28. Phuc, H.K., Andreassen, M.H., Burton, R.S., Vass, C., Epton, M.J., Pape, G., Fu, G., Condon, K.C., Scaife, S., Donnelly, C.A., *et al.* (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC biology* 5, 11.
29. Rendón, P., McInnis, D., Lance, D., and Stewart, J. (2004). Medfly (Diptera:Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *Journal of Economic Entomology* 97, 1547-1553.
30. Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J., and Alphey, L.S. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287, 2474-2476.
31. Wise de Valdez, M.R., Nimmo, D., Betz, J., Gong, H.F., James, A.A., Alphey, L., and Black, W.C.t. (2011). Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4772-4775.

ANEXO C

Mídia contendo arquivos de áudio e tabela.

ANEXO C1 – Jingle do PAT – Projeto *Aedes* Transgênico

ANEXO C2 – Spot do PAT – Projeto *Aedes* Transgênico

ANEXO C3 – Tabela com todos os dados obtidos no projeto