AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* L. visando o seu controle através da técnica do inseto estéril

ANDRE RICARDO MACHI

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientador:
Prof. Dr. Valter Arthur**

**São Paulo
2019**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* L. visando
o seu controle através da técnica do inseto estéril**

ANDRE RICARDO MACHI

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Prof. Dr. Valter Arthur**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa desde que seja citada a fonte.

MACHI, Andre. R. *Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de Aedes aegypti L. visando o seu controle através da técnica do inseto estéril*. 2019. 75 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Ficha catalográfica

Machi, Andre Ricardo

Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* L. visando o seu controle através da técnica do inseto estéril. Andre Ricardo Machi. Orientador: Valter Arthur. São Paulo, 2019.

75 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear.

Área de concentração (Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo.

1. *Aedes aegypti*. 2. Irradiação. 3. Controle. 4. Dengue. 5. Técnica do Inseto Estéril. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Andre Ricardo Machi

Título: Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* L. visando o seu controle através da técnica do inseto estéril.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 13/02/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Valter Arthur (Presidente)

Instituição: Centro de Energia Nuclear na Agricultura -CENA/USP.

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Mario Eidi Sato

Instituição: Instituto Biológico de Campinas - IB.

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Leonardo Gondim de Andrade e Silva

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP.

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Márcia Nalesso Costa harder. Julgamento: Aprovado

Instituição: Faculdade de Tecnologia de São Paulo - FATEC.

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Gianni Queiroz Haddad. Julgamento: Aprovado

Instituição: Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas - PECEGE.

Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

**Ofereço aos meus pais *José Aparecido Machi*
e *Maria Bernadete da Silva Machi* por sempre me incentivarem a estudar.**

E dedico

À minha namorada *Fernanda de Cássia Neves Esteca*

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, sempre me concedendo saúde, paz, proteção e me ajudando nas horas mais difíceis, não somente na vida universitária, mas em todos os momentos de minha existência.

Ao Prof. Dr. Valter Arthur, meu estimado orientador, por estar sempre disponível para solução de dúvidas e problemas que surgiram durante o desenvolvimento do projeto, além da grande amizade construída durante todos esses anos.

Aos meus pais José Aparecido Machi e Maria Bernadete da Silva Machi por sempre me incentivarem a estudar, visando uma educação de qualidade e acima de tudo sempre respeitando o próximo; sem o incentivo, apoio e ajuda deles jamais teria chegado até aqui.

À minha namorada Fernanda de Cássia Neves Esteca, pela atenção, força, colaboração em vários momentos deste trabalho e principalmente sempre me incentivando a seguir em frente nos momentos atribulados durante meu doutorado.

Ao Márcio Adriani Gava pelas dicas, apoio, pelos insetos concedidos, ajudas nos experimentos e por sua amizade.

Ao frigorífico Angelelli e ao CENA/USP pela concessão do material biológico usado.

Agradeço aos colegas de Laboratório de Radiobiologia e Ambiente que estiveram comigo em parte do meu período de condução dos trabalhos de doutorado e que sempre me prestaram total apoio, Diogo, Juliana, Aline, Gianni e Dâmaris e todas as outras pessoas.

Às estagiárias, Raquel, Flávia e Mônica que me auxiliaram durante partes da condução de vários experimentos e a minha namorada, Fernanda Esteca, que me ajudaram prontamente nas avaliações dos experimentos.

À técnica Lúcia Cristina Aparecida Silva Santos pela contribuição ativa, pelas dicas, sugestões e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Josenilton Mandro, que auxiliou em vários experimentos, dando dicas, apoio, incentivo e acreditando no meu potencial.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação do IPEN pelas informações e conhecimentos transmitidos que contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos colegas das disciplinas cursadas.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências e Tecnologia Nuclear Aplicações do IPEN pela oportunidade concedida.

À todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação do IPEN e do CENA.

Ao CNEN, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento desta pesquisa.

EPÍGRAFE

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

MACHI, Andre. R. *Efeitos da radiação ionizante nas fases do ciclo evolutivo de Aedes aegypti L. visando o seu controle através da técnica do inseto estéril*. 2019. 75 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Aedes aegypti L. é um dos principais insetos causadores de doenças no mundo, sendo assim, é importante trabalhos envolvendo o seu manejo. O objetivo do projeto foi avaliar os efeitos da radiação gama do Cobalto-60 nas fases do ciclo evolutivo de *A. aegypti*, visando a aplicação da TIE. O trabalho foi realizado no Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) em Piracicaba- SP. A criação do *A. aegypti* foi mantida nas instalações do laboratório, sob condições de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR 50-70% e fotofase de 12 horas. A irradiação de todas as fases do ciclo foi realizada em uma fonte de Cobalto-60 tipo Gammacell-220, instalada no CENA/USP, nas seguintes doses: 0 (controle) até 70 Gy sob uma taxa de dose de 0,356 kGy/hora. Quando ovos foram irradiados, avaliou-se viabilidade contando o número médio de larvas L4, pupas e adultos fêmeas e machos emergidos. Foi também avaliado a porcentagem de eclosão em larvas L1 da geração F1. Para larvas irradiadas, avaliaram-se a o número médio de larvas L4, pupas, adultos fêmeas e machos emergidos, porcentagem de eclosão em larvas L1 e larvas L4 F1. Das pupas irradiadas, avaliaram-se a média de eclosão de larvas F1, de larvas L4 F1, porcentagem de pupas F1 e média de adultos machos e fêmeas F1. Em adultos irradiados, avaliaram-se a média de eclosão de larvas F1, larvas L4 F1, pupas F1 e adultos machos e fêmeas F1. Avaliaram-se parâmetros de competitividade e longevidade de machos F1. Os resultados mostraram que as doses esterilizantes para as fases irradiadas: ovo, larva e pupa foram de 15 Gy, 20 Gy e 60 Gy, respectivamente. Já para adultos da geração F1 as doses de 45 Gy e 50 Gy para macho e fêmea. Para a fase adulta, doses de 40 Gy e 45 Gy foram esterilizantes para machos e fêmeas. No teste de competitividade, a proporção de 10 machos estéreis: 1 macho não irradiado: 1 fêmea não irradiada causou 92,2% de ovos inviáveis, na dose de 50 Gy. A longevidade dos machos foi reduzida em pupas e adultos irradiados com a dose de 40 Gy.

Palavras chave: *Aedes aegypti*, irradiação, controle, Dengue, Técnica do Inseto estéril

ABSTRACT

MACHI, Andre. R. *Ionizing radiation effects on stages of evolution cycle of Aedes aegypti l. aiming the control across of the insect sterile technique*. 2019. 75 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Aedes aegypti L. is one of the main insects that cause diseases in the world. The objective of the project was to evaluate the gamma radiation effects in the phases of the evolutionary cycle of *A. aegypti*, aiming the application of SIT. The work was performed at the Radiobiology and Environment Laboratory of the Center for Nuclear Energy in Agriculture (CENA/ USP) in Piracicaba - SP. The establishment of *A. aegypti* was kept at the laboratory under conditions of 25 ± 2 ° C, RH 50-70% and photophase of 12 hours. Irradiation of all phases of the evolutionary cycle was performed in a Gammacell-220 type Cobalt-220 source, installed in CENA/ USP, at the following doses: 0 (control) to 70 Gy at a dose rate of 0.356 kGy/ hour. When the eggs were irradiated, the viability was evaluated by counting the mean number of L4 larvae, pupae, and adult females and males emerged. The percentage of hatching of larvae L1 in F1 generation was also evaluated. When larvae were irradiated, the mean number of L4 larvae, pupae, adult and emergent males, larval L1 and L4 F1 larvae were evaluated. From the irradiated pupae, the average of larvae F1, L4 F1 larvae, pupae F1 percentage and average female and male adults F1 were evaluated. From the irradiated adults, mean F1 larvae, L4 F1 larvae, F1 pupae and F1 male and female larvae were evaluated. The parameters of male competitiveness and longevity of F1 males were evaluated. The results showed that the sterilizing doses for a irradiated phases: egg, larva and pupa were 15 Gy, 20 Gy and 60 Gy, respectively. Already for adults of the F1 generation were the doses of 45 Gy and 50 Gy for male and female. For adults doses of 40 Gy and 45 Gy were sterilizing for males and females. For the competitiveness test, the proportion of 10 sterile males: 1 Non-irradiated male: 1 Non-irradiated caused 92.2% unviable eggs, at the dose of 50 Gy. The longevity of males was reduced when pupae and adults were irradiated with a dose of 40 Gy.

Key words: *Aedes aegypti*, irradiation, control, Dengue, Sterile Insect Technique

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número médio e porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 200 ovos/ repetição em diferentes doses (N=1000).	45
Tabela 2. Número médio ou porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 250 larvas/ repetição em diferentes doses (N=1250).	46
Tabela 3. Número médio ou porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 250 pupas/ repetição em diferentes doses (n=1250).	48
Tabela 4. Número médio ou porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 10 casais/ repetição em diferentes doses (N=50 casais/tratamento).	50
Tabela 5. Experimento de competitividade entre machos de <i>Aedes aegypti</i> irradiados (ME) e não irradiados (MNI) para o acasalamento com fêmeas não irradiadas (FNI) em condições simuladas de campo e longevidade média (LM).	52
Tabela 6. Valores médios ($\pm$ EP) das variáveis ambientais durante o teste de competitividade dos machos estéreis de <i>Aedes aegypti</i> , em campo simulado	53
Tabela 7. Longevidade média em dias (d) ($\pm$ SE) de machos provenientes de pupas irradiadas (1) e adultos irradiados (2).	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 2. Estágios de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 3. Evolução da Dengue nas Américas entre 1980 -2010.	22
Figura 4. Irradiador de armazenamento à seco.	31
Figura 5. Irradiador panorâmico.	32
Figura 6. Interações das Radiações Ionizantes	34
Figura 7. Pote plástico para postura de ovos do mosquito.	36
Figura 8. Equipamento usado para separação de pupas.	38
Figura 9. Placas de alumínio revestidas com Parafilm® contendo sangue.	39
Figura 10. Alimentador dos mosquitos da gaiola	41
Figura 11. Armadilha para oviposição das fêmeas de <i>A. aegypti</i>	41
Figura 12. Gaiola de utilizada para o experimento de competitividade em condições de semi-campo.	42
Figura 13. Ovos de <i>Aedes aegypti</i> danificados pelo efeito da radiação.	44
Figura 14. Danos em larvas irradiadas de <i>Aedes aegypti</i> de terceiro e quarto instares.	46
Figura 15. Mutações letais em pupas irradiadas e em adultos F1.	48
Figura 16. Mutações letais em adultos irradiados de <i>Aedes aegypti</i>	50

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	14
2 ASPECTO DE ORIGINALIDADE	15
3 OBJETIVO	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1.1 BIOLOGIA DO MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i> L.	17
4.1.2 Métodos de Controle Vetoriais.....	18
4.1.3 Iniciativas de Controle do Vetor <i>Aedes aegypti</i>.....	19
4.1.4 A Ressurgência do vetor <i>A. aegypti</i> e dispersão da Dengue.....	21
4.1.5 Breve histórico da Técnica do Inseto Estéril (TIE)	24
4.1.6 Uso da Técnica do Inseto Estéril em Pragas	26
4.1.7 Técnica do Inseto Estéril: Métodos e Técnicas	28
4.1.8 Irradiadores Usados Para Esterilização de Insetos	30
4.1.9 Efeitos Biológicos das radiações ionizantes.....	32
4.2.1 Controle de Qualidade de Machos Estéreis	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de ovo do <i>A. aegypti</i>.....	36
5.2 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de larva do <i>A. aegypti</i>	37
5.3 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de pupa do <i>A. aegypti</i>	37
5.3.1. Coleta das pupas.....	37
5.3.2. Irradiação na fase de pupa.....	38
5.4 Avaliação do efeito da radiação gama na fase adulta do <i>A. aegypti</i>.....	38
5.5 Estudo do efeito da irradiação na competitividade de machos.....	40

5.6 Avaliação do efeito da radiação gama na longevidade de machos F1 provenientes de pupas e adultos irradiados	43
5.7 Sexagem dos insetos (Machos)	43
5.8 Análise estatística.....	43
 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	 43
6.1 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de ovo do <i>A. aegypti</i>.....	43
6.2 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de larva do <i>A. aegypti</i>	45
6.3 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de pupa do <i>A. aegypti</i>	47
6.4 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de adulta do <i>A. aegypti</i>	49
6.5 Estudo do efeito da irradiação na competitividade de machos	51
6.6 Avaliação do efeito da radiação gama na longevidade de adultos F1 provenientes de pupas e adultos irradiados	54
 7 CONCLUSÕES	 56
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 56

1 INTRODUÇÃO

Entre os principais insetos vetores mundiais, destaca-se o *Aedes aegypti* L., este o mosquito é o transmissor de inúmeras doenças como a Dengue, Chikungunya e mais recentemente o Zika vírus. A dengue foi introduzida no Brasil em 1980 e até hoje continua sendo um grande problema global de saúde pública com mais de 60 % dos casos confirmados no Brasil (NOGUEIRA et al., 2007; MORAES e DUARTE, 2009; CAVALCANTI et al., 2011; PASSOS e FIGUEIREDO, 2011; SIMMONS e FARRAR, 2012).

Após os casos de Dengue, em setembro de 2014, começaram a surgir os casos de chikungunya, em que as primeiras infecções autóctones foram confirmadas em Oiapoque, norte do Brasil, e em Feira de Santana, Nordeste do Brasil (POWERS e LOGUE, 2007; ROTH et al., 2014; SANTANA, 2014; TEIXEIRA et al., 2014).

Posteriormente, o Zika vírus foi descoberto (DYCKY et al., 2005; DUFFY et al., 2009; CAO-LORMEAU et al., 2014; IOOS et al., 2014). No Brasil, a primeira identificação deste vírus como o agente causador de um surto foi no nordeste do Brasil. Este caso representa a primeira transmissão autóctone de Zika no país. Ventura et al., (2016) concluíram que, desde então, foram observados casos de microcefalias e outras doenças, possivelmente relacionadas ao vírus zika (ZANLUCA et al., 2015).

Todos esses casos relacionados ao mosquito *A. aegypti* demonstram o quanto o controle é difícil, e o fator agravante é que até o momento não existe nenhum método eficiente e seguro, a não ser a eliminação dos criadouros (GUBLER e CLARK, 1994; DONALISIO e GLASSER, 2002; BHATT et al., 2013).

O uso indiscriminado de inseticidas químicos no controle do mosquito é tóxico com alto poder residual. Além disso, causam desequilíbrios nos ecossistemas, poluem o meio ambiente, são tóxicos aos seres humanos, podem causar ressurgência de pragas secundárias e os mosquitos já adquiriram resistência aos produtos mais utilizados (LIMA et al., 2003; BRASIL, 2004; MONTELLA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2013).

Portanto, uma das alternativas é o controle pela Técnica do Inseto Estéril - TIE, no qual o objetivo é criar em laboratório os machos, que são esterilizados por irradiação. Posteriormente, os insetos são liberados no ambiente para que acasalem com fêmeas silvestres, consequentemente não resultando na descendência de insetos. Se o número de insetos liberado for suficientemente grande (milhões), então a probabilidade das fêmeas encontrarem e acasalarem com um macho estéril é bem maior que a probabilidade de se

encontrarem e acasalarem com um macho silvestre fértil, consequentemente os machos estéreis provocam uma gradativa diminuição da população não irradiada (ARTHUR et al., 2012a).

O uso da radiação ionizante constitui-se em uma técnica atrativa e eficaz para o controle de pragas, por ser um método específico e não oferecer riscos aos inimigos naturais, aos polinizadores e ao meio ambiente (ARTHUR, 1997; SILVA et al., 2007).

A TIE é largamente empregada no controle de pragas, principalmente de dípteros, como moscas das frutas, e também de lepidópteros (KNIPLING, 1955; BLOEM e CARPENTER, 2001; BENEDICT e ROBINSON, 2003; DYCKY et al., 2005; IAEA, 2012), além disso, o controle é muito eficiente e até o momento tem-se obtido grande sucesso.

Além do uso para controle de pragas, aplicações de radiações ionizantes são utilizadas para tratamento quarentenário de produtos fitossanitários e como ferramenta em diversas pesquisas, como em estudos sobre interações em sistemas parasitoide-hospedeiro (SOLLER e LANZAREIN, 1996; ARTHUR, 1997; HOCH e SCHOPF, 2001; HELINSKI et al., 2009).

Considerando-se as vantagens da TIE no controle de pragas, este trabalho teve por objetivo verificar os efeitos da radiação gama do Cobalto-60 nas diferentes fases do ciclo evolutivo (ovo, larva, pupa e adultos) de *A. aegypti*, visando uma possível aplicação da técnica do inseto estéril como uma ferramenta adicional de controle dentro das táticas de manejo integrado desta praga.

2 ASPECTO DE ORIGINALIDADE

O mosquito *A. aegypti* é transmissor dos vírus causadores de muitas doenças de saúde pública. Nos últimos anos, além da dengue, os vírus Zika e Chikungunya e febre amarela vêm causando muitos casos de mortalidade. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, em mais de cem países vivem em regiões de alto risco de dengue. Sendo assim, esse mosquito vem causando muita preocupação em todo o mundo.

Desde 1996, o Brasil possui ação estruturada para o controle de populações do mosquito baseados em ações mecânicas em locais de criadouro com inseticidas químicos do grupo dos inibidores de crescimento, análogos de hormônios juvenis e piretroides. Entretanto, o uso indiscriminado desses inseticidas vem provocando diversos efeitos

indesejados, como: desenvolvimento de resistência, surgimento de pragas secundárias, poluição do meio ambiente e problema a saúde humana.

Para alterar esse cenário, vários estudos para desenvolver uma vacina contra estes arbovírus estão sendo realizados, porém até agora nada foi descoberto nesse sentido. Frente a essa situação, outros métodos de controle, como o uso de armadilhas para coleta massiva e eliminação de mosquitos, mosquitos transgênicos portadores de genes letais e mosquitos esterilizados, estão sendo estudados com o intuito de eliminar o mosquito em sua fase de ovo.

O uso de mosquitos estéreis atualmente empregados baseia-se na técnica desenvolvida na década de 1950, que propõe a liberação de machos estéreis irradiados para reduzir a população de insetos.

A técnica do Inseto Estéril (TIE) baseia-se na esterilização do macho, conseguida geralmente por radiação ionizante, na qual a dose correta induz mutações no espermatozoide e, portanto, causam esterilização com a finalidade de reduzir o potencial reprodutivo da população alvo, eliminando gerações subsequentes.

O uso de radiação ionizante é uma técnica atrativa e eficaz para o controle de pragas, pois é um método específico e não apresenta riscos para inimigos naturais, polinizadores, meio ambiente e seres humanos.

De acordo com a Agência Internacional de Energia Atômica, o TIE tem um grande potencial para uso efetivo em programas de manejo integrado de várias espécies de mosquitos, incluindo *A. aegypti*, *A. albopitius*, *Anopheles* sp. No presente estudo, o uso desta tecnologia ainda está no estágio inicial, com programas piloto bem sucedidos na Itália, Indonésia, Ilhas Maurício e China.

Portanto, o projeto de pesquisa é muito importante para essa espécie de inseto e os resultados obtidos são de suma importância, pois fornecem subsídios para um possível controle da população deste inseto praga via liberação de insetos estéreis no ambiente. Além de que, os estudos de biologia são de suma importância para determinação de qual estágio de vida deve ser irradiado para se conseguir uma efetiva esterilização e qual a dose é necessária para atingir esse objetivo.

3 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da radiação gama do Cobalto-60 nas diferentes fases do ciclo evolutivo (ovo, larva, pupa e adultos) de *A. aegypti*, visando

uma possível aplicação da Técnica do Inseto Estéril, como uma ferramenta adicional de controle dentro das táticas de manejo integrado desta praga e consequentemente diminuir a incidência de doenças causadas pelo mosquito.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1.1. Biologia do mosquito *Aedes aegypti* L.

O *A. aegypti*. é uma espécie é oriunda da África, que foi descrita inicialmente no Egito, encontra-se distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Sua distribuição e expansão geográfica são influenciadas por múltiplos fatores ambientais, sobretudo a temperatura (GLASSER e GOMES, 2002).

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

Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*.

Fonte: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/prioridades_invest/i2_tela7_2.htm

Este mosquito foi, possivelmente, introduzido no Brasil durante o período colonial, pelo do tráfego de escravos provenientes de regiões onde a praga já existia. A adaptação desta espécie aos ambientes urbanos esta associada à presença de múltiplas áreas

adequadas ao desenvolvimento de suas formas jovens e a seu elevado grau de domiciliação (ACIOLI, 2006). *A. aegypti* apresenta um curto ciclo de vida, o qual pode se completar no período de 15 a 30 dias em regiões tropicais, e seu desenvolvimento, compreende quatro estágios: ovo, larva (quatro estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 2). O tempo de desenvolvimento das larvas varia em função da temperatura.

Figura 2. Estágios de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

Fonte: <http://www.dengue.org.br>

4.1.2 Métodos de Controle Vetoriais

Um dos principais desafios da agricultura moderna e na área da saúde é controlar espécies pragas minimizando as consequências adversas ao ambiente e à saúde humana (ALPHEY, 2002).

Durante os primeiros setenta anos do século XX, o controle de pragas foi amplamente realizado por métodos químicos, e somente a partir da década de 70, o conceito de Manejo Integrado de Pragas começou a se popularizar. Atualmente, devido às vantagens ambientais, o controle biológico de pragas, juntamente com o desenvolvimento de variedades de cultivo resistentes, tem recebido mais atenção em programas de MIP (DYCK et al., 2005).

O controle biológico por meio do uso de peixes larvófagos e principalmente por biolarvicidas à base de bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus thuringiensis sorovar israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (atual *Lysinibacillus sphaericus*), se tornou bastante eficaz para o controle de diferentes espécies de dípteros aquáticos. Este meio alternativo de

controle tem sido utilizado em vários países, inclusive no Brasil para controle de simúlideos (borrachudos) e mosquitos (*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*) (ARAUJO-COUTINHO, 1995; DONALISIO, 2002; CAPALBO et al., 2008; MARDINI et al., 2000; REGIS et al., 2001; 2013).

Os biolarvicidas possuem características que favorecem sua utilização em programas de controle, tais como, modo de ação específico, segurança para o meio ambiente e facilidade de produção em larga escala (COUCH, 2000). *Bacillus thuringiensis* *sorovar. israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus*, são bactérias Grampositivas, saprófitas de solos e ambientes aquáticos e, quando submetidas a condições adversas, produzem cristais proteicos durante a sua fase de esporulação, em forma de protoxinas de alto poder inseticida (DE BARJAC, 1990). A adoção destes biolarvicidas representa um importante marco na história do controle de vetores em saúde pública (REGIS et al., 2001). Outro método de controle vetorial extremamente efetivo é o físico/mecânico, no qual ações de saneamento, coleta de resíduos sólidos do ambiente, regularidade no abastecimento de água e outras, levam a eliminação de criadouros reais e potenciais das formas aquáticas do mosquito. Além destas, outras medidas complementares de controle direcionadas às atividades preventivas (campanhas voltadas à população, recomendando práticas simples e eficazes direcionadas a eliminação de criadouros do mosquito) e ações de vigilância e monitoramento, também desempenham um papel decisivo na avaliação do impacto das medidas de controle sobre a população do inseto vetor e no redirecionamento destas ações no país (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

4.1.3 Iniciativas de Controle do Vetor *Aedes aegypti*

A primeira iniciativa para eliminar o *A. aegypti* foi realizada por William Gorgas em Havana Cuba em 1901 (GORGAS, 1905). Este pesquisador foi influenciado pela teoria de Carlos Finlay sobre o papel do mosquito como vetor da febre amarela apresentado em Havana, Cuba, em 1881 (FINLAY, 1881) e, mais tarde confirmado por Walter Reed e colaboradores. Em 1900, Reed seguiu a iniciativa de Gorga e conduziu programas semelhantes em Sorocaba, São Paulo, Brasil. Em 1901, Oswaldo Cruz iniciou trabalhos no Rio de Janeiro, e em 1903, Severo descreveu a técnica baseada no controle dos mosquitos por meio de fumigação e eliminação de focos do mosquito, destruindo recipientes abandonados (SEVERO, 1955).

Em 1928, após uma epidemia de febre amarela no Rio de Janeiro, o pesquisador Soper, descobriu, em 1932, a febre amarela da selva. Até então, pensava-se que a proteção completa às populações urbanas dependia da erradicação absoluta do *A. aegypti* (SEVERO, 1955).

A Fundação Rockefeller estabeleceu então uma campanha intensiva contra o vetor em colaboração com o Governo do Brasil, eliminando mosquitos em vastas áreas do país. Resultados semelhantes foram obtidos em outros países, como Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai e Peru (SEVERO, 1955).

Na década de 1940, a Conferência Pan-Americana de Saúde começou a destacar medidas de prevenção e controle contra o *A. aegypti* no Brasil (PAHO, 1942).

O advento do DDT promoveu a noção de erradicação do mosquito não apenas em escala nacional, mas em escala continental. Isso levou à aprovação, pela OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde), do Plano de erradicação Continental do *A. aegypti* em 1947 para combater a febre amarela urbana (PAHO, 1947).

Desde 1947, a Repartição Sanitária Pan-Americana (RSPA) promove intensamente campanhas em todos os países afetados, estabelecendo acordos de apoio cooperativo fornecendo pessoal e material para a execução do programa. O sucesso da campanha hemisférica da RSPA foi demonstrado em 1962, quando 18 países continentais e um número de ilhas do Caribe alcançaram a erradicação (PAHO, 1997).

Infelizmente, décadas de esforços humanos sem precedentes para erradicar o *A. aegypti* se desfez muito rapidamente. Entre 1962 e 1972, apenas três outros países ou territórios eliminaram o vetor apesar do compromisso reiterado da OPAS com a política de erradicação (PAHO, 1997).

A deterioração do programa de erradicação ao longo do tempo deveu-se principalmente à perda de importância política na maioria dos países que alcançaram a erradicação. Além disso, a vigilância diminuiu gradualmente, de modo que pequenas reinfestações não puderam mais ser detectadas, e a estrutura centralizada do programa resultou em uma resposta lenta às reinfestações. Além disso, os insuficientes saneamentos ambientais nos centros urbanos em rápido crescimento e a rápida expansão das viagens internacionais e domésticas favoreceram a dispersão do mosquito. Outros fatores que contribuíram para a deterioração do programa de erradicação incluem: o desenvolvimento da resistência do mosquito ao DDT e outros inseticidas organoclorados; altos custos de material e salário; participação comunitária insuficiente ou apoio do setor de saúde; e falta de vontade por parte de alguns governos em participar de programas simultâneos.

A Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) foi encarregada do controle de vetores e doenças em 1990. Sua primeira estratégia foi desenvolver o Plano de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa). No entanto, este plano falhou por causa das ações descoordenadas de cada município e por inconsistências na implementação de ações de combate ao vetor. A FUNASA desistiu de erradicar o mosquito e se concentrou em controlar o vetor pelo do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) em 2001. Algumas mudanças foram promulgadas em 2002, e o Plano Nacional Final de Controle da Dengue (PNCD) foi estabelecido (BRAGA e VALLE, 2007).

As autoridades brasileiras criaram este compêndio compilando diferentes estratégias para controlar a dengue no território nacional. O PNCD aborda componentes importantes para o controle da dengue, como vigilância epidemiológica, controle de vetores, atenção ao paciente, integração com atenção básica por meio de agentes de saúde pública, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recursos humanos, legislação política para a sustentabilidade social e avaliação de programas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O principal objetivo do PNCD é reduzir o *A. aegypti* e assim reduzir a incidência de dengue e suas manifestações hemorrágicas letais. As metas do PNCD são: (1) reduzir o índice de infestação predial em todas as cidades prioritárias consideradas inferiores a 1%; (2) reduzir em 50% o número de casos de 2003 em comparação com o número de casos em 2002 e sustentar um decréscimo adicional de 25% a cada ano e (3) reduzir a letalidade da febre hemorrágica da dengue para menos de 1% (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; PESSANHA et al., 2009).

4.1.4 A Ressurgência do vetor *A. aegypti* e dispersão da Dengue

A deterioração dos programas de controle durante a década de 1960 levou à reintrodução e expansão da distribuição geográfica do mosquito e aos surtos subsequentes causados por diferentes sorotipos de dengue em vários países.

Até 1977, o DENV-2 e o DENV-3 continuavam a circular. Surtos associados ao DENV-2 foram relatados na Colômbia em 1971–1972 (MORALES et al., 1973; GROOT, 1975) e na parte sul de Porto Rico, detectou-se o DENV-2 em 1972–73, onde os casos continuaram a ocorrer até 1975 (SCHNEIDER e DROLL, 2001).

Uma epidemia de DENV-3 também foi relatada na parte alta de Magdalena, Vale, Colômbia em 1975–1977 (GROOT et al., 1979). Em 1977, o DENV-1, genótipo III, foi

relatado pela primeira vez na região e causou um início epidêmico na Jamaica, expandindo-se para Cuba, Porto Rico e a maioria das ilhas do Caribe, PAHO (1979) e posteriormente para o resto dos países do norte da América do Sul, América Central e México em 1978, e Texas em 1980 (GUBLER, 1999). Países das Américas relataram ~702.000 casos durante 1977-1980, e DENV-1 foi o sorotipo predominante.

No início da década de 1980, o número de casos notificados começou a aumentar consideravelmente e essa tendência se manteve nas décadas seguintes (Figura 3).

Figura 3. Evolução da Dengue nas Américas entre 1980 -2010.

Fonte: Dick et al., (2012)

Em 1981, Cuba registrou uma epidemia com 344.203 casos, incluindo 10.312 casos de dengue hemorrágica e 158 óbitos (101 óbitos de crianças) (KOURÍ et al., 1989; GUSMÁN et al., 1984).

Essa epidemia foi causada pelo DENV-2, genótipo III, 14 e foi a primeira epidemia relatada pela DHF na região. Este surto é considerado um dos piores neste período por causa do número de casos, mortes e custos de controle (GUSMÁN, 2012).

Além disso, em 1981, o genótipo I DENV-4 foi introduzido nas ilhas do leste do Caribe e, posteriormente, expandido para o no Caribe, México, América Central e do Sul, causando, em muitos casos, epidemias em países que sofreram surtos de DENV-1 (PINHEIRO e CORBER, 1997, GUBLER, 1987).

Alguns desses surtos foram associados a casos esporádicos de dengue hemorrágica: Suriname (1982), México (1984), Porto Rico (1986) e El Salvador (1987) (GUBLER,

1987, LOROÑO et al.,1993). O vírus DENV-4 foi predominantemente isolado nessas epidemias, embora outros sorotipos também estivessem presentes (GUBLER, 1999).

Durante os anos 80 houve uma disseminação geográfica marcada da atividade da dengue nas regiões (PAHO, 1993). No Brasil, uma epidemia foi relatada em 1981–1982 no estado de Roraima, onde DENV-1 e DENV-4 foram identificados (OSANAI, 1983).

Em 1986, DENV- 1 foi introduzido no Rio de Janeiro, Brasil (SCHATZMAYR e NOGUEIRA, 1986; NOGUEIRA, 1989). Outros autores concluíram que esse vírus estava se espalhando para outras regiões do país (MIAGOSTOVICH et al.,1993; MORAES, 2003; SIQUEIRA et al., 2005).

O DENV-1 se expandiu e causou surtos em outros países que estavam, por décadas, livres de dengue ou não tinham experimentado a doença antes, como Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988) e Peru (1990) (PAHO, 1993).

Apesar de um número crescente de casos na região durante os anos 80, a incidência de dengue hemorrágica permaneceu baixa até 1989, quando uma segunda grande epidemia de dengue hemorrágica foi notificada na Venezuela entre 1989 e 1990, com mais de 6.000 casos e 73 mortes. Essa epidemia foi relacionada ao DENV-1, 2 e 4 e o DENV-2 foi predominante e especificamente associado a casos fatais (PAHO 1990).

Esse vírus foi o mesmo genótipo (genótipo III) do vírus que causou a epidemia em Cuba (LEWIS et al., 1993, RICO-HESSE et al., 1997) e também responsáveis por epidemias menores de FHD subsequentes na Colômbia, Porto Rico, México e Brasil (GUBLER, 1999).

O DENV-2, genótipo III, foi introduzido no Rio de Janeiro em 1990 durante um período de circulação do sorotipo DENV-1 (NOGUEIRA, 1990; 1993).

O DENV-2 se espalhou para outras partes do Brasil com apresentações clínicas mais graves, e os primeiros casos fatais foram causados por infecções secundárias por dengue (VASCONCELOS et al., 1993; 1995; NOGUEIRA et al., 1991; 1995). Uma epidemia causada por DENV-2, com o mesmo genótipo da cepa que esteve presente antes de 1981, ocorreu na região amazônica do Peru em 1995, no entanto, nenhum caso de dengue hemorrágica foi relatado (WATTS et al., 1999).

O vírus DENV-3, genótipo III, foi reintroduzido nas Américas em 1994, inicialmente relatado na Nicarágua e no Panamá (GUSMÁN et al., 1997; CDC, 1995). Na Nicarágua, 29.469 casos, incluindo 1.247 casos de dengue hemorrágico, foram registrados em 1994, 106.107 e 19.260 casos foram registrados em 1995 (PAHO, 2011).

O DENV-3 em seguida, expandiu-se para os países da América Central e México em 1995, Porto Rico em 1998 e outras ilhas do Caribe, causando grandes epidemias em vários países da América Central e México (FIGUEROA e Ramos 2000; PAHO, 1997) e depois para a América do Sul (NOGUEIRA et al., 2001, UZCATEGUI et al., 2003, OCAZONEZ et al., 2006).

Em 1996, a OPAS aprovou um Plano Continental para intensificar o controle de *A. aegypti*; no entanto, não foi totalmente implementado (PAHO, 1996), o que gerou um pequeno surto isolado de DHF / DSS causado por DENV-2, documentado em Santiago de Cuba, em 1997 (GUZMÁN et al., 2000).

Em 1998, um aumento significativo no número de casos foi relatado no continente (Figura 3) com ampla circulação da doença na maioria dos países. O Brasil registrou aproximadamente 500.000 casos com surtos generalizados em 16 estados e 95 epidemias foram relatadas em muitos países, incluindo a Argentina, onde a doença não havia sido registrada por 82 anos (AVILÉS et al., 2000; MASUH, 2008).

4.1.5 Breve histórico da Técnica do Inseto Estéril (TIE)

RUNNER (1916) demonstrou os primeiros efeitos da radiação ionizante em *Lasioderma serricorne* Fabricius (Coleoptera: Anobiidae). Este inseto é considerado praga das plantações de tabaco, considerada na época, o mais importante cultivo não comestível do mundo. Utilizando doses de raios X, Runner tornou estes insetos incapazes de se reproduzir (RUNNER, 1916; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1989; MASTRANGELO e WALDER, 2011).

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

Nos anos de 1950, no entanto, foi o momento em que a técnica do inseto estéril obteve o êxito mais significativo, quando a mesma foi integrada a um programa de controle de pragas que tinha como objetivo reduzir a população de *Cochliomyia hominivorax* (Coquetel, 1858), uma espécie de mosca que possui como característica, o hábito de depositar seus ovos em tecidos lesionados de animais de sangue quente para o desenvolvimento de suas larvas. Esta mosca possuía uma alta incidência no continente americano e afetava principalmente a bovinocultura da época (KLASSEN e CURTIS, 2005).

Desde 1930, já se faziam estudos sobre a *C. hominivorax*, tendo sido o primeiro inseto criado com dietas artificiais em laboratório, possibilitando sua criação em massa para estudos (MELVIN e BUSHLAND, 1936). Isto permitiu a Knipling, um dos pesquisadores responsáveis pela criação da técnica do inseto estéril e seus principais conceitos, em 1951, observar e estudar traços comportamentais da *C. hominivorax*, como por exemplo, o aspecto monogâmico das fêmeas desta espécie, que copulam uma única vez durante sua vida. Este fato possibilitou a formulação de um modelo, o qual considerava, que se a esterilidade fosse capaz de ser induzida em insetos machos, um grande número destes poderia ser liberado em campo, inviabilizando assim os descendentes da espécie (KNIPLING, 1955; OLIVEIRA, 2011).

Um estudo publicado por Bushland e Hopkins (1953) descreveu os resultados do uso de radiação ionizante (raios – X) em pupas de *C. hominivorax*. Os dois pesquisadores observaram que os machos adultos após serem submetidos a uma dose radioativa de 50 Grays (Gy) durante a fase de pupa, apresentavam morfologia aparentemente normal, porém, quando copulavam com fêmeas virgens, as mesmas não geravam ovos férteis (BUSHLAND e HOPKINS, 1953).

Em 1954 na ilha de Curaçao, localizada a 65 quilômetros da Venezuela, Knipling realizou a liberação de pupas irradiadas de *C. hominivorax* em uma área de aproximadamente 435 Km², com a liberação realizada duas vezes por semana. A liberação de machos estéreis alcançou uma frequência de 155 machos/ Km² /semana, promovendo um “valor estéril” inicial de 69%, que aumentou posteriormente, chegando a desejáveis 100%. Esta atividade foi mantida por 14 semanas, até obter um grau satisfatório de eliminação do vetor (KLASSEN e CURTIS, 2005).

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

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

4.1.6 Uso da Técnica do Inseto Estéril em Pragas

A Técnica do Inseto Estéril é oficialmente considerada um tipo de controle biológico (DYCK et al., 2005). Consistindo na supressão de populações de insetos pragas via liberação de insetos estéreis, a TIE é um método ambientalmente seguro, específico e que não gera impactos adversos em organismos não alvos. Pode ser integrada a outros métodos de controle biológico, tais como uso de predadores, parasitoides e patógenos (HENDRICH, 2000).

O princípio desta técnica está na maior sensibilidade das células germinativas à radiação em relação às somáticas. A esterilização de insetos irradiados resulta da fragmentação cromossômica nas células germinativas, levando à produção de gametas desbalanceados, e consequentemente, inibição da mitose e morte de embriões fertilizados. A intenção é selecionar uma dose de radiação que minimize os danos somáticos, e assim, permita o comportamento normal do inseto (BAKRI et al., 2005).

Em Lepidoptera, doses sub-esterilizantes podem ser selecionadas a fim de diminuir os danos causados pelas altas doses requeridas à sua esterilização. Estas doses resultam em esterilidade hereditária, na qual altos níveis são atingidos em fêmeas e machos nas gerações posteriores (BLOEM e CARPENTER, 2001).

Existem dois programas de controle de pragas utilizando a TIE para supressão de populações de lepidópteras pragas, sendo um para o controle de *Pectinophora gossypiella*, a lagarta rosada, nos Estados Unidos, e o outro para o controle de *Cydia pomonella*, a traça das frutas, no Canadá (BLOEM e CARPENTER, 2001).

Existem pelos menos 20 programas de manejo integrado de pragas no mundo que empregam a TIE no controle de moscas-das-frutas (ENKERLIN, 2005), assim como

existem alguns programas para o controle de pernilongos. No Brasil, o primeiro trabalho utilizando radiação ionizante em *A. aegypti* pernilongo transmissor da dengue, foi realizado recentemente por GAVA; ARTHUR; ARTHUR, 2012. Além disso, na literatura tem-se os artigos de jornais de (ARTHUR e GAVA 2012a, ARTHUR e GAVA 2012b) que estudaram os efeitos da radiação gama em pupas de *A. aegypti*, que concluíram que uma dose de 50 Gy foi suficiente para esterilizar os adultos irradiados na fase de pupa.

De um modo geral, a maioria dos trabalhos é unânime em afirmar que doses de até 150 Gy são suficientes para induzir a esterilização dos insetos dessas espécies. Michele et. al., 2006, utilizaram radiação gama para induzir a esterilidade nos estágios de pupa e adulto para o mosquito da malária, *Anopheles arabiensis*. SHARMA et al. (1978) estudaram os efeitos da radiação gama e produtos quimioesterilizantes sobre a fertilidade e esterilização de machos *Anopheles stephensi*. Diversos autores (DAVIS et al., 1959; ABDEL-MALEK, TANTAWY, WALKID, 1966 e 1967; TANTAWY et al., 1967; PROVERBS, 1969; CURTIS, 1971 e 1976; ALI e REZENBOOM, 1972; AKRAM e ARLAMKHAM, 1975; SHOUKRY, 1980; DAME et al., 1981; LACHANCE e GRAHAM, 1984; DAME, 1985; LINES e CURTIS 1985; THOMAS et al., 2000; SCOTT et al., 2002; ROBINSON, 2002; ANDREASEN e CURTIS, 2005; ALPHEY et al., 2002; HELINSKI et. al., 2006) trabalharam com radiação gama para induzirem a translocação cromossômica possibilitando a sexagem genética dos insetos visando principalmente a aplicação da técnica do inseto estéril para *Anopheles* sp.

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

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

4.1.7 Técnica do Inseto Estéril: Métodos e Técnicas

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

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

Inicialmente, os meios utilizados para induzir esterilidade na TIE consistiam no uso de radiação ionizante (raios – X e radiação gama) e quimioesterilizantes (alquilantes e triazinas) (BENEDICT E ROBINSON, 2003). Com a introdução de novas tecnologias, sobretudo na área de biologia molecular, utilizando bactérias simbiotes e organismos transgênicos, a TIE passou a ser classificada de acordo com o método esterilizante. Na TIE clássica, que tem esta denominação, pois, o emprego destas tecnologias é utilizado desde a concepção da técnica em 1950. Dentro da metodologia quimioesterilizante, utiliza-se cerca de 400 substâncias químicas que causam esterilidade reprodutiva em insetos (ARTHUR et al., 2015).

Alguns desses, aproximadamente 36 compostos, inibem o desenvolvimento ovariano ou induzem alterações na estrutura de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Os quimioesterilizantes podem ser aplicados diretamente sobre os insetos ou incorporados ao alimento dos mesmos. Alguns exemplos de quimioesterilizantes são: agentes alquilantes (metepa e afolato), antimetabólitos (fluorascila e aminopterina), organotinas, antibióticos (porfiromicina, ciclohexamida), alcaloides (monocrotalina e colchicina), triazinas (tiouréia), entre outros (ARTHUR et al., 2015).

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

A radiação ionizante constitui o método esterilizante mais antigo e utilizado em vários programas de controle vetorial, que utilizam geralmente raios X e gama. Desses, a esterilização por raios gama é a mais comum. Como fonte radioativa, são utilizados radioisótopos como o Cobalto 60 e a dose utilizada é calculada por irradiadores que determinam a taxa de dose (BAKRI et al., 2005).

O potencial da radiação ionizante de interagir com numerosos materiais, provocando a quebra e mudanças estruturais em várias moléculas, proporciona sua aplicação em várias áreas, sobretudo na técnica do inseto estéril (ALPHEY, 2002). O uso dessa radiação para esterilizar insetos inclui vantagens como: (1) O aumento de temperatura durante o processo é insignificante, (2) insetos estéreis podem ser liberados imediatamente após a irradiação, e (3) a radiação pode passar através de diversos materiais, permitindo que os insetos sejam irradiados, mesmo após terem sido embalados (BAKRI et al., 2005).

A TIE moderna, no entanto, utiliza tecnologias recentes de biologia molecular, como organismos transgênicos e paratransgênesis para impedir a reprodução de insetos. Os organismos paratransgênesis incluem a manipulação de organismos simbioses presentes na espécie-alvo para induzir esterilidade. Entre estes simbioses, o mais relacionado à indução de esterilidade em mosquitos é a bactéria *Wolbachia pipientis*. Este organismo está presente em 76% das espécies de inseto, e por esta relação simbiótica, é tida como um candidato ideal ao procedimento de paratransgênesis (HENDRICHS e ROBINSON, 2005). O fenótipo mais comum associado à infecção por *Wolbachia* em insetos é a incompatibilidade citoplasmática (IC), uma forma de falha reprodutiva pós-fecundação.

A IC é expressa quando um mosquito macho infectado acasala com uma fêmea não infectada. Embora o espermatozóide consiga penetrar com sucesso no óvulo, não há a descondensação correta dos cromossomos paternos, ocasionando a fusão com os cromossomos maternos antes da primeira divisão mitótica (SINKINS, 2004). Este fenômeno causa mudanças estruturais na cromatina, ocasionando a morte do embrião. (GUBLER e CLARK, 1994).

Apesar das *Wolbachia* spp. estarem presentes em 40% de todas as espécies de insetos (ZUG e HAMMERSTEIN, 2012), estas não são endossimbiontes naturais de *A. aegypti*. Assim, pesquisas recentes levaram ao desenvolvimento da linhagem desta espécie transfectadas com *Wolbachia*, wMel, com linhagem refratária à infecção por vírus causador da dengue (WALKER et al., 2011).

Testes para avaliar seu potencial como ferramenta de controle biológico estão em sendo desenvolvidos em diversos países, inclusive no Brasil, no âmbito do Programa Eliminate Dengue (www.eliminatedengue.org). A estratégia consiste em liberar uma grande quantidade de indivíduos portadores da *Wolbachia*, cujos machos infectados, ao copularem com fêmeas selvagens inviabilizarão suas proles, enquanto que as fêmeas infectadas acasaladas com machos selvagens produzirão novos descendentes infectados com a *Wolbachia*, de forma que, ao longo do tempo, ocorrerá a substituição da população natural. Apesar de não ser esperada a eliminação da presença de *A. aegypti* em campo, a substituição por uma linhagem refratária à infecção com o vírus Dengue, levará ao longo do tempo a uma redução do número de casos da doença (DUTRA et al., 2015).

O sistema genético – molecular também conhecido como sistema RIDL (liberação de insetos portadores de um gene letal dominante, originalmente no inglês “Release of Insects with Dominant Lethality”), é um dos métodos de esterilização mais recentes utilizado para o controle de vetores. Este sistema compreende a liberação de machos portadores de um gene letal que será expresso apenas em uma determinada condição ambiental. Os machos transgênicos, ao copularem com fêmeas selvagens, transmitem este gene letal para prole, impedindo o indivíduo de alcançar a fase adulta (OLIVEIRA, 2011).

4.1.8 Irradiadores Usados Para Esterilização de Insetos

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

Normalmente, há dois tipos de irradiadores gama usados em programas de liberação de insetos estéreis: irradiadores de armazenamento à seco e irradiadores panorâmicos de larga escala. Os irradiadores de armazenamento a seco (Figura 4) são os mais utilizados em laboratórios de pesquisa e indústrias de pequeno porte. Estes dispositivos abrigam a fonte radioativa dentro de um escudo protetor de chumbo e

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

Figura 4. Irradiador de armazenamento à seco.

Fonte: ARTHUR et al., (2015)

Os irradiadores panorâmicos de larga escala (Figura 5) são os mais adequados para um grande volume de amostras. A fonte radioativa consiste de várias hastes de Co^{60} dispostos em um plano e localizadas ao fundo de um poço coberto por água ou chumbo. No momento da irradiação, as amostras são colocadas em uma câmara, e em seguida, ao comando do operador, elas são direcionadas ao poço onde estão as hastes contendo a fonte radioativa e permanecem nesta condição pelo tempo definido pelo operador (BAKRI, 2005).

Figura 5. Irradiador panorâmico.

Fonte: UNITED STATES NUCLEAR REGULATORY COMMISSION (2014).

4.1.9 Efeitos Biológicos das radiações ionizantes

A radiação ionizante é uma onda eletromagnética de alta energia (raios X ou raios gama) que, ao interagir com a matéria, desencadeia uma série de ionizações, transferindo energia aos átomos e moléculas presentes no campo irradiado e promovendo, assim, alterações físico-químicas intracelulares (BIRAL, 2002; D'IPPOLITO e MEDEIROS, 2005).

Esta radiação pode interagir diretamente com os componentes celulares (efeito direto) ou de modo indireto (efeito de radiólise), resultando em alterações celulares e moleculares (Figura 6) (SEGRETO et al., 2000).

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

Os efeitos determinísticos ocorrem consequentemente após a exposição por altas doses de radiação em um curto período de tempo, onde existe um limiar de dose absorvida necessário para sua ocorrência e cuja gravidade aumenta com o aumento da dose radioativa (NAVARRO et al., 2008).

As reações teciduais são resultantes de doses altas radioativas e somente surgem quando ultrapassam o limiar de dose, cujo valor depende do tipo de radiação e do tecido irradiado. Um dos principais efeitos determinísticos é a morte celular (SEGRETO et al., 2000).

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

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

Em insetos, por exemplo, os efeitos da radiação gama, promovem danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) que podem ser fatais à célula. As lesões no DNA que não induzem a morte celular, devido aos mecanismos fisiológicos de reparação celular, podem ser transmitidas para as gerações de células futuras, iniciando-se o processo de neoplasia celular (DOWD e TILSON, 1999).

Podem ocorrer dois tipos de interações da radiação: na interação direta do organismo com o radioisótopo pode leva-lo a morte. Na ação indireta ocorrem sucessivas interações da radiação incidente com as diversas moléculas presentes no interior celular, destacando-se a água e o oxigênio (DOWD e TILSON, 1999). Essa interação é mais frequente do que a interação direta, devido à abundância de água presente no meio celular (METTLER JUNIOR e UPTON, 1995). A primeira etapa da ação indireta da radiação gama é o processo da radiólise da água. Neste processo, são geradas espécies reativas primárias ($\text{OH}^\bullet$, $\bar{e}_{\text{aq}}$, $\text{H}^\bullet$) e, produtos moleculares (H_2 , H_2O_2), denominados “produtos primários da radiólise da água”. Altamente reativos, os produtos primários interagem com as moléculas presentes no meio ou sofrem recombinações, desencadeando uma série de reações tóxicas para as células que promovem alterações químicas e biológicas (METTLER JUNIOR e UPTON, 1995)

A radiólise da água é um processo contínuo, e está representado pela seguinte equação:

Figura 6. Interações das Radiações Ionizantes

Fonte: Adaptado de BONATO e ELNECAVE (2011).

4.2.1 Controle de Qualidade de Machos Estéreis

De acordo com ROBINSON (2002), o controle de qualidade na criação e liberação de indivíduos estéreis pode ser dividido em duas categorias: (1) controle de qualidade na produção, que envolve equipamentos, reagentes, amostra biológica, processo de produção, como condições ambientais, taxa de infestação, separação larval, sexagem das pupas e dose de irradiação; (2) controle de qualidade do produto, etapa na qual, os insetos produzidos são avaliados por sua efetividade em completar o propósito pelos quais eles foram requeridos (ROBINSON, 2002).

Dado que a supressão populacional pela TIE é essencialmente o resultado de acasalamentos entre machos estéreis e fêmeas selvagens (ARTHUR et al., 2015), a capacidade dos machos estéreis liberados para competir por fêmeas é fundamental. A competitividade de machos estéreis é dada em função da sua propensão ao acasalamento e compatibilidade para acasalar, isto é, a tendência para localizar uma fêmea não irradiada, copular e inseminar, sendo, portanto, um componente essencial para avaliar a qualidade da técnica do inseto estéril (WHITE; ROHANI; SAIT, 2010).

A esterilidade genética ideal de insetos machos requer: (1) A produção de espermatozoide; (2) sua transferência para o sexo feminino não irradiada durante

acasalamento; (3) sua utilização na fertilização dos ovos e (4) a incapacidade do zigoto ser formado, evitando o desenvolvimento completo de um adulto fértil. Em outras palavras, um inseto macho irradiado deve ser capaz de realizar todas as funções de um inseto fértil normal (ROBINSON, 2002).

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

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, situado no Município de Piracicaba – SP. Os insetos usados nesse trabalho pertencem à linhagem *Rockefeller* e foram obtidos de uma criação massal do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – Rio de Janeiro – RJ.

Em seguida os insetos foram levados para a empresa Analytical Scientific Research – ASR, parceira desse trabalho, onde os insetos foram mantidos e criados de forma massal. Uma pequena parte dessa criação do mosquito *A. aegypti* foi mantida nas instalações do laboratório do CENA/USP, sob condições climatizadas de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 70-75% e fotofase de 12 horas, apenas para os testes e manutenção de uma criação para reprodução.

Inicialmente, dois tipos de gaiolas foram usadas, ambas revestidas com tecido tipo voile e o fundo das gaiolas foram forradas com papel “tipo resma” de (40 cm x 40 cm), porém, as duas possuem dimensões distintas. A gaiola de criação permanente de (100 cm x 100 cm x 60 cm), é utilizada para obtenção da postura dos ovos. Já as gaiolas de criação temporária, (40 cm x 40 cm x 40 cm) foram utilizadas apenas para a manutenção de insetos adultos que foram utilizados nos ensaios após a irradiação.

A irradiação de todas as fases do ciclo evolutivo (ovo, larva, pupa e adulto) foram realizadas em uma fonte de Cobalto-60 tipo Gammacell-220, instalada no Centro de

Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), sob uma taxa de dose de 0,356 kGy/hora nas doses de: 0 (controle) até 70 Gy.

5.1 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de ovo do *A. aegypti*

Após o segundo e o quarto dia posterior a cópula, as fêmeas adultas iniciam a postura. Para a obtenção desses ovos, foi introduzido no interior da gaiola de criação permanente, um recipiente de plástico, com dimensão de 250 mL, circundado com papel filtro nº 102, em contato com a água (Figura 7).

Figura 7. Pote plástico para postura de ovos do mosquito.

Fonte: Autor

Esse recipiente foi completado até a metade com água potável ou água deionizada proveniente da criação massal. Em seguida, neste recipiente foram introduzidas aproximadamente 3 pupas, para estimular a postura dos adultos.

Ao observar que o substrato (filtro de papel) estava preenchido de ovos, este era removido do recipiente com água e secado por 2 a 4 dias na própria sala de criação, podendo ser armazenados por longos períodos para posterior obtenção de novas larvas.

Para a avaliação do efeito da irradiação no primeiro estágio de vida do *A. aegypti*, foram usados lotes de 200 ovos, com idades de 36-48 h por repetição. Essa idade dos ovos foi escolhida por serem relatadas na literatura que essa fase é mais radioresistente. O ensaio contou com 5 repetições, totalizando 1000 ovos por cada tratamento, que consistiu das seguintes doses de irradiação: 0 (controle), 5, 10, 15 e 20 Gy.

Após a irradiação, foi avaliada a viabilidade contando-se o número médio de larvas L4, de pupas e de adultos fêmeas e machos emergidos. Foi também avaliado a porcentagem de eclosão de larvas L1 da geração F1.

5.2 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de larva do *A. aegypti*

As fitas de ovos provinda da postura dos adultos, sem passarem por irradiação, foram colocadas em bandejas plásticas com ampla área de superfície de contato, contendo água, previamente aclimatada a 27°C, e substrato alimentar, que consistia de uma quantidade adequada de ração de peixe (aproximadamente 5 mL). O alimento foi adicionado para que ocorresse a eclosão das larvas, considerando-se uma densidade média de 1 larva/mL, não ultrapassando a quantidade de 200 larvas por bandeja.

Para avaliação do efeito da irradiação no segundo estágio de vida do *A. aegypti*, foram separados lotes de 250 larvas entre 3 e 4º instares. O ensaio contou com 5 repetições, totalizando em 1250 larvas por cada tratamento, que consistiu das seguintes doses: 0 (controle), 20, 30, 40 e 50 Gy.

Após a irradiação, foi avaliada a viabilidade contando-se o número médio de larvas L4, de pupas e de adultos fêmeas e machos emergidos. Foi também avaliado a porcentagem de eclosão de larvas L1 e a porcentagem de larvas L4, da geração F1.

5.3 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de pupa do *A. aegypti*

5.3.1 Coleta das pupas

A realização da coleta de pupas foi realizada manualmente ou com o auxílio do separador de pupas (John W. Hock, Gainesville, FL), que consiste em um equipamento mecânico composto de duas placas de acrílico sobrepostas (Figura 8) com regulagem da espessura para a passagem de água contendo as pupas. Este equipamento possibilitou a separação das pupas, permitindo também a diferenciação de pupas que se tornaram adultos machos, de pupas que tornaram fêmeas, já que estas possuem um tamanho relativo distinto.

Figura 8. Equipamento usado para separação de pupas.

Fonte: Autor.

5.3.2 Irradiação na fase de pupa

Para avaliação do efeito da irradiação nas pupas, após o final do último estágio larval, as primeiras pupas surgiram e estas foram coletadas. Uma parte foi transferida para as gaiolas de criação e a outra separada em lotes de 250 pupas com idades entre 36 - 48 horas para realização do experimento. O ensaio contou com 5 repetições, totalizando em 1250 pupas por cada tratamento, que consistiu das seguintes doses: 0 (controle), 20, 30, 40, 45, 50 e 60 Gy.

Após irradiação, as pupas foram transferidas para potes de 1000 mL, estes, por sua vez, foram acondicionados em gaiolas. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: média de eclosão de larvas da geração F1, média de larvas no estágio L4 F1, porcentagem de pupas F1 e média de adultos machos e fêmeas F1.

5.4 Avaliação do efeito da radiação gama na fase adulta do *A. aegypti*

Para avaliação do efeito da irradiação nos adultos, após a emergência destes, foi fornecido aos mosquitos (fase alada), solução de mel a 10%, obtida da dissolução de 10 g de mel em 90 mL de água até obtenção de uma mistura homogênea.

Em seguida, a solução foi mantida em um tubo de ensaio com capacidade de 10 mL, vedados com tampa de algodão hidrófilo, fixado de forma invertida (ou seja, a parte de algodão permaneceu direcionada para baixo) na parte superior das gaiolas.

Para a obtenção das posturas nas gaiolas, três vezes por semana, sangue de ovinos era oferecido aos *A. aegypti* durante um período de 3 horas. Este sangue foi proveniente do

Biotério do Laboratório de Nutrição Animal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, que é registrado no CONCEA.

Para o fornecimento de sangue aos insetos presentes nas gaiolas, foram esticados pedaços de Parafilm® sobre placas de alumínio com relevo (10 x 10 cm). Esta placa continha uma abertura que possibilitava o preenchimento com 10 ml de sangue animal. Em seguida as placas foram colocadas com a parte do sangue voltada para gaiola, como pode ser visualizado na (Figura 9).

Esta metodologia foi adotada, porque em experimentos preliminares, foi observado que para o mosquito realizar a alimentação, o sangue precisava estar a uma temperatura semelhante à de um corpo de um ser vivo de sangue quente, já que os insetos não se alimentavam, quando o sangue oferecido estava à temperatura ambiente. Para solucionar esse problema, uma bolsa térmica de tecido, contendo 250 g de glicerol, foi aquecida em um forno de microondas por 15 segundos em potência máxima para atingir uma temperatura de aproximadamente 40°C. Após o aquecimento do sangue os mosquitos se alimentaram normalmente como se estivessem alimentando-se de cobaias (Observação Pessoal).

Figura 9. Placas de alumínio revestidas com Parafilm® contendo sangue.

Fonte: Autor

Após 3 dias da emergência dos adultos, as fêmeas iniciaram a alimentação. Em seguida, ou seja, do segundo ao quarto dia de repasto sanguíneo, as fêmeas iniciaram a postura nos recipientes plásticos, semelhantes ao citado anteriormente, contendo água e papel de filtro.

Após cinco dias do início da fase adulta (alada), os insetos da gaiola foram usados para os experimentos e os restantes foram transferidos para a gaiola de criação, já que os

mesmos não puderam ser utilizados para os testes por serem considerados mais velhos após esse período.

Para avaliação do efeito da irradiação nos adultos, foram utilizados 90 casais com idade entre 36 e 48 horas, após a emergência. Estes insetos foram anestesiados com CO₂ e separados em tubos de ensaio. O ensaio constou de 5 repetições com 10 casais cada. Os tratamentos consistiram das seguintes doses: 0 (controle) 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 Gy. Para isso, avaliaram-se os seguintes parâmetros: média de eclosão de larvas F1, média de larvas L4 F1, média de pupas F1 e média de adultos machos e fêmeas F1.

5.5 Estudo do efeito da irradiação na competitividade de machos

Após a determinação da dose esterilizante para os adultos machos provenientes de pupas irradiadas, foram realizados os testes de competitividade somente para essa fase. Para isso, os machos estéreis (ME) foram inseridos em uma gaiola telada (2 x 2 m), colocadas na área externa do laboratório de Radiobiologia e Ambiente, em local protegido da chuva mas, exposto às demais variáveis ambientais (temperatura, umidade, exposição solar), simulando condições de campo, contendo machos selvagens (MNI) e fêmeas não irradiadas (FNI), seguindo a metodologia proposta por LIMA (2015), que visa basicamente promover o encontro para o acasalamento dos ME e MNI com FNI da subpopulação, e verificar o percentual de inviabilidade de suas progênes.

Os ME irradiados com 40 e 50 Gy foram liberados no interior da gaiola junto com MNI e FNI com idade entre três e quatro dias. As fêmeas foram alimentadas com sangue de ovino, como citado anteriormente, 24 h antes de serem liberadas nas gaiolas para realização do experimento. As seguintes proporções foram testadas: a) 10 MNI: 1 FNI (100:10) N = 110, que corresponde ao tratamento controle; b) 10 ME: 1 MNI: 1 FNI (100:10:10) N = 120, submetidos a 40 Gy; c) 10 ME: 1 MNI: 1 FNI (100:10:10) N = 120, submetidos a 50 Gy. Os machos foram introduzidos na gaiola 15 minutos antes das fêmeas. Como fonte de carboidrato para os mosquitos, cinco alimentadores contendo algodão embebido em solução de mel a 10% foram afixados em diferentes pontos da gaiola, onde ficaram disponíveis durante todo o experimento e foram repostos por novos suportes a cada cinco dias (Figura 10).

Figura 10. Alimentador dos mosquitos da gaiola

Fonte: Autor

Para potencializar o processo de oviposição, após o 5º dia da liberação dos mosquitos, foram instaladas na gaiola quatro armadilhas para coleta de ovos (ovitrampa). A armadilha consistia de um recipiente de cor preta, preenchido com 750 mL de água com infusão de capim feno, dois pedaços de madeira porosa (eucatex) de 10 x 15 cm, que serviram às fêmeas como suportes para oviposição (Figura 11).

Figura 11. Armadilha para oviposição das fêmeas de *A. aegypti*.

Fonte: Autor

As ovitrampas descritas anteriormente foram distribuídas nos quatro ângulos da gaiola (Figura 12) e instaladas a 1 m do chão.

Figura 12. Gaiola de utilizada para o experimento de competitividade em condições de semi-campo.

Fonte: Autor

As armadilhas foram retiradas após dez dias da liberação dos mosquitos na gaiola. Os mosquitos presentes na gaiola foram capturados por aspiração mecânica e armazenados para identificação e contagem. Antes da contagem dos ovos, as palhetas ainda permaneceram em contato com a água por três dias para permitir a finalização da embriogênese dos ovos que, eventualmente, tivessem sido postos no dia de remoção das ovitrampas. Depois desta primeira contagem, as palhetas foram submersas em uma bandeja com água, para a eclosão das larvas, por dois dias consecutivos, com o intuito de verificar o percentual final de eclosão. Os experimentos para avaliação da competitividade foram realizados por um período de até 12 meses, considerando pré-testes (nos anos de 2017 a 2018), com duração de 20 dias para cada experimento. Para cada proporção testada foram realizadas três repetições. Durante os testes as fêmeas receberam apenas uma alimentação sanguínea.

Este experimento foi realizado para determinar a dose de irradiação que menor impacto provocou na competitividade, para isso avaliou-se o número médio de ovos colocados, número médio de larvas eclodidas, percentual de ovos inviáveis e número de mosquitos recapturados (após 15 dias) de machos e fêmeas quando gerados do cruzamento de machos não irradiados (MNI), machos estéreis (ME) e fêmeas não irradiadas (FNI) nas seguintes proporções: a) 10 MNI: 1 FNI (100:10) N = 110, que corresponde ao tratamento controle; b) 10 ME: 1 MNI: 1 FNI (100:10:10) N = 120, submetidos a 40 Gy; c) 10 ME: 1 MNI: 1 FNI (100:10:10) N = 120 submetidos a 50 Gy.

5.6 Avaliação do efeito da radiação gama na longevidade de machos F1 provenientes de pupas e adultos irradiados

Foi avaliada a longevidade de adultos, pois esse parâmetro é considerado um fator importante em programas de liberação de mosquitos no contexto da Técnica do Inseto Estéril – TIE. Para isso, após a irradiação de 250 pupas/ repetição e de 10 casais/ repetição nas doses de 20, 30, 35, 40 e 45 Gy, avaliou-se a longevidade média (em dias) das pupas e adultos F1 machos.

5.7 Sexagem dos insetos (Machos)

Para separação de pupas machos e fêmeas, foram realizadas diversas tentativas que basearam na construção de protótipos que fossem eficazes para separação destes. Porém, nenhum protótipo criado foi efetivo. Desta forma, para auxiliar a realização da sexagem, utilizou-se o separador de pupas desenvolvido por John W. Hock, Gainesville, FL, como descrito anteriormente. Estudos futuros são necessários para concretização de um equipamento que seja eficaz para tal finalidade.

5.8 Análise estatística

Em cada ensaio foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos inicialmente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, a 5% de nível de significância. Dados proporcionais foram analisados com um modelo linear generalizado com distribuição binomial. Os dados relativos ao número de médio de mosquitos seja no estágio de larva, pupa ou adulto, quando submetidos às diferentes doses de radiação gama, foram comparados usando a função *glht* do pacote *multcomp* no programa R (R Development Core Team 2013).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de ovo do *A. aegypti*

Na fase de ovos, foi observado que baixa doses foram suficientes para afetar significativamente os subseqüentes estágios de vida do mosquito *A. aegypti*.

Quando os ovos foram irradiados nas doses de 5 e 10 Gy, observou-se um ligeiro decréscimo no número de larvas eclodidas (137 ± 0.2 e 116 ± 0.1 , respectivamente), quando comparado ao número de larvas originária dos ovos que não receberam irradiação (142 ± 0.4) (Tabela 1).

Entretanto, efeitos significativos da irradiação na fase de ovo foram observados apenas na dose de 15 Gy, pois o número de larvas eclodidas foram significativamente inferiores (95 ± 0.1), sendo estatisticamente diferente em relação as outras doses. Já na dose de 20 Gy não foi observado eclosão das larvas.

De maneira geral, quando se avaliou os efeitos da radiação na taxa de eclosão das larvas na geração F1, apenas as doses de 15 e 20 Gy não atingiram o próximo estágio de vida. Entretanto, mesmo quando os ovos foram irradiados nas doses mais baixas, de 5 e 10 Gy, a porcentagem de eclosão das larvas na geração F1 foram estatisticamente diferentes ($P= 0.001$), obtendo uma eclosão inferior a 50 % em comparação a dose controle, com aproximadamente 90 %, como se pode observar na (Figura 13).

Figura 13. Ovos de *Aedes aegypti* danificados pelo efeito da radiação.

Fonte: Autor

Tabela 1. Número médio e porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 200 ovos/ repetição em diferentes doses (N=1000).

Doses (Gy)	Média de eclosão (P) ^a	Média de Larvas L4 (P)	Média de pupas (P)	Média de adultos (P)		Porcentagem de eclosão % (F1) ^b
				Macho	Fêmea	
0	142 $\pm$ 0,4	138 $\pm$ 0,3	132 $\pm$ 0,3	51 $\pm$ 0,2	73 $\pm$ 0,2	87,4 $\pm$ 0,3
5	137 $\pm$ 0,2	109 $\pm$ 0,2*	49,6 $\pm$ 0,2*	4,9 $\pm$ 0,1*	5,9 $\pm$ 0,1*	41,1 $\pm$ 0,2*
10	116 $\pm$ 0,1	41 $\pm$ 0,1*	2,7 $\pm$ 0,1*	0,3 $\pm$ 0,1*	1,1 $\pm$ 0,1*	21,1 $\pm$ 0,1*
15	95 $\pm$ 0,1*	12 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
20	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*

*Valores seguidos de asterisco nas colunas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

^aP= Geração Parental; ^bF1= Geração Progenie; Fonte: autor da tese.

Como já era esperada, a fase de ovos foram as mais susceptíveis a irradiação. Os resultados obtidos neste presente estudo concordam os de TERZIAN e STAHLER, (1958), pois os primeiros efeitos significativos na eclosão de larvas de *A. aegypti*, na geração F1, foram observadas logo na primeira dose de 5 Gy.

ASMAN e RAI (1972) também encontraram um decréscimo significativo na eclosão de larvas do mosquito nessa mesma dose, entretanto SHETTY et al. (2016) encontraram que 3 Gy já foi uma dose suficiente para causar uma redução significativa na eclosão.

6.2 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de larva do *A. aegypti*

Para larvas expostas aos diferentes níveis de radiação gama, observou-se que foram necessárias doses maiores de irradiação, em relação àquelas alcançadas para a fase de ovos, para causar um decréscimo significativo na sobrevivência (Tabela 2).

O número médio de larvas que sobreviveram após a maioria das doses irradiadas, mostrou diferenças significativas em comparação ao número médio de larvas que sobreviveram no tratamento controle. A dose de 20 Gy foi a única que provocou um número médio de larvas da geração parental estatisticamente igual ao do controle, 114 $\pm$ 0.2 e 127 $\pm$ 0.3, respectivamente.

A partir da dose de 20 Gy, a média de sobrevivência pupal foi estatisticamente diferente da dose controle (62 $\pm$ 0.1 e 116 $\pm$ 0.2, respectivamente). Além disso, não foi observado nenhum adulto macho e fêmea emergidos da geração parental, nenhuma porcentagem de eclosão das larvas F1 e nenhuma porcentagem de sobrevivência destas, ou seja, a partir da irradiação de 20 Gy observou-se uma mortalidade de 100 % das larvas. As

larvas nessa dose irradiada morreram em um período de até 48 horas, com algumas deformações no terceiro e quarto instares (Figura 14).

Nas doses, a partir de 30 Gy, não foram observadas pupas, embora houvesse a ocorrência de larvas. Por sua vez, essas não passaram do terceiro e quarto instares, diferindo significativamente em relação à dose controle e de 20 Gy. Além disso, para a dose 50 Gy foi observado que a maioria das larvas morreu em um período de até 24 horas.

Figura 14. Danos em larvas irradiadas de *Aedes aegypti* de terceiro e quarto instares.

Fonte: Autor

Tabela 2. Número médio ou porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 250 larvas/ repetição em diferentes doses (N=1250).

Doses (Gy)	Média de larvas L1 (P) ^a	Média de pupas (P)	Média de Adultos (P)		Porcentagem de eclosão (F1) ^b	Porcentagem de larvas L4 (F1)
			Macho	Fêmea		
0	127 $\pm$ 0,3	116 $\pm$ 0,2	40 $\pm$ 0,2	54 $\pm$ 0,3	89,0 $\pm$ 0,3	87,1 $\pm$ 0,3
20	114 $\pm$ 0,2	62 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
30	90 $\pm$ 0,2*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
40	22 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
50	0,3 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*

*Valores seguidos de asterisco nas colunas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

^aP= Geração Parental; ^bF1= Geração Progenie; Fonte: autor da tese.

Foi notado também que quando a larva foi irradiada, todas as fases posteriores sofreram um retardamento do ciclo, além disso, observou-se uma grande mortalidade das

larvas quando estas estavam passando para o estágio de pupa, devido ao efeito da irradiação.

ASMAN e RAI (1972) também observaram um retardo semelhante no desenvolvimento das larvas de *A. aegypti* irradiadas a partir da dose 5 Gy, enquanto que em nosso presente estudo esse efeito foi observado a partir da dose de 20 Gy.

6.3 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de pupa do *A. aegypti*

A fase de pupa exposta aos diferentes níveis de radiação gama mostrou-se mais resistente em relação às fases anteriores irradiadas. Para o estudo do efeito da radiação gama sobre a pupa, avaliou-se a média de eclosão de ovos F1, ou seja, advindos dos adultos emergidos das pupas irradiadas, assim como, contabilizou-se o número médio de larvas, pupas e adultos fêmeas e machos da geração F1. Esses parâmetros são muito utilizados para execução da Técnica do Inseto Estéril – TIE.

Foi observado um decréscimo gradual em todos os estágios subsequentes (ovos – adulto) na geração F1 quando as pupas foram irradiadas nas diferentes doses (Tabela 3). A partir da dose de 30 Gy, o número médio de eclosão das larvas F1 foi significativamente diferente do controle e da dose de 20 Gy.

Em relação ao número médio de larvas F1 que sobreviveram até o último estágio larval e porcentagem de larvas que se transformou em pupa F1, a dose a partir de 20 Gy provocou diferença significativa em relação ao tratamento controle para todos esses parâmetros.

Como pudemos observar, aproximadamente, 60 %, 30% e menos de 6 % das larvas F1 se transformaram em pupas F1, nas doses de 20 Gy, 30 Gy e 40 Gy, respectivamente, sendo estatisticamente diferente quando comparadas à dose controle, em que a sobrevivência foi de 80%.

A irradiação das pupas P na dose de 60 Gy provocou mortalidade de 100 % das larvas e conseqüentemente pupas F1. Além desses parâmetros, mutações em nas fases irradiadas também foram observadas (Figura 15).

Figura 15. Mutações letais em pupas irradiadas e em adultos F1.

Fonte: Autor

No geral, com aumento das doses esterilizantes em pupas, o número médio dos diferentes estágios da geração F1 decresceu proporcionalmente. Esse comportamento também foi observado por outros autores, tanto com estudos em mosquito, quanto em outros organismos (BLOEM e CARPENTER, 2001; LACHANCE e GRAHAM, 1984).

Outros autores têm reportado que para algumas espécies de mosquitos, incluindo gênero *Aedes*, o aumento das doses de radiação em pupas é proporcional a grande redução de machos adultos e mutações dos indivíduos nas gerações seguintes (BALESTRINO et al., 2010; OLIVA et al., 2012; TERZIAN e STAHLER, 1958).

Tabela 3. Número médio ou porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 250 pupas/ repetição em diferentes doses (n=1250).

Doses (Gy)	Média de Eclosão (F1) ^a	Média de Larva L4 (F1)	Taxa de pupas % (F1)	Média de adultos (F1)	
				Macho	Femêa
0	167 $\pm$ 0,4	160 $\pm$ 0,4	80,1 $\pm$ 0,3	31,1 $\pm$ 0,2	35,3 $\pm$ 0,2
20	121 $\pm$ 0,3	100 $\pm$ 0,3*	59,9 $\pm$ 0,2*	5,1 $\pm$ 0,2*	7,0 $\pm$ 0,2*
30	60 $\pm$ 0,2*	24,0 $\pm$ 0,2*	29,7 $\pm$ 0,2*	0,8 $\pm$ 0,1*	1,9 $\pm$ 0,1*
40	18 $\pm$ 0,1*	14,1 $\pm$ 0,2*	5,6 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,1*	0,7 $\pm$ 0,1*
45	13 $\pm$ 0,1*	9,1 $\pm$ 0,1*	1,4 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,3 $\pm$ 0,1*
50	8,0 $\pm$ 0,1*	1,6 $\pm$ 0,1*	0,1 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
60	3,1 $\pm$ 0,1*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*

*Valores seguidos de asterisco nas colunas diferem estatisticamente entre si (P < 0,05).

Nota: Dados médios de pupa e adultos na geração P não foram mostrados nessa tabela

^aF1= Geração Progenie; Fonte: autor da tese.

Nossos resultados são similares aos obtidos na Itália, em que os estudos mostraram que para ocorrer a esterilização de 100 % dos machos de *A. albopictus* foi necessária uma dose de 60 Gy, a dose foi similar à que foi alcançada em nosso estudo (BALESTRINO et al., 2010). Em *Anopheles pharoensis*, quando pupas foram irradiadas na dose de 20 Gy, nenhum efeito significativo em adultos machos foi observado, entretanto um significativo declínio foi observado até a dose de 70 Gy (ABDEL-MALEK, TANTAWY, WALKID, 1966).

Quando as pupas foram irradiadas na dosagem de 40 Gy, concluiu-se que o número médio de machos adultos F1 foi de 0.2 ± 0.1 , sendo que a dose necessária para alcançar 100 % de esterilização foi de 45 Gy. As fêmeas, por sua vez, se mostraram mais resistentes do que os machos, já que a dosagem de 45 Gy provocou um número médio de fêmeas F1 de 0.3 ± 0.1 , enquanto que para causar 100% de mortalidade a dosagem necessária foi de 50 Gy.

6.4 Avaliação do efeito da radiação gama na fase de adulta do *A. aegypti*

Os efeitos da radiação sobre a fase adulta do mosquito *A. aegypti* foram um pouco menor em relação à fase de pupa, porém de forma similar. A partir de 40 Gy, o número médio de eclosão das larvas F1 foi significativamente diferente do tratamento controle e da dose de 35 Gy.

Em relação ao número médio de larvas F1 que sobreviveram até o último estágio larval e o número médio de pupas, a partir da dose de 35 Gy, foi significativamente diferente em relação ao tratamento controle. Vale ressaltar, que nas doses de 55 e 60 Gy não foi observado a presença de larvas F1 e, para doses de 65 e 70 Gy, não houve eclosão dos ovos.

A partir de 40 Gy não foram observados machos adultos F1, mas notou-se um número médio de 2.1 ± 0.1 fêmeas F1. Outro resultado obtido foi que mesmo havendo pupas F1, a partir de dose de 45 Gy, nenhum mosquito adulto foi observado.

Durante o estudo, também foi observado que pupas e alguns adultos morreram após 2 a 3 dias, devido a ocorrência de malformações, tais como, tamanho menor e problemas na emergência, o que reduziu sua longevidade (Figura 16).

Figura 16. Mutações letais em adultos irradiados de *Aedes aegypti*.

Fonte: Autor

Na dose de 50 Gy, apesar de não ter ocorrido nenhum adulto F1 após a irradiação do adulto P, observou-se que a algumas pupas ainda sobreviviam (0.1 ± 0.1). Nas doses de 55 e 60 Gy, não foi observado nenhuma pupa F1, já que estas morriam após algumas horas (Tabela 4).

Tabela 4. Número médio ou porcentagem média ($\pm$ EP) de insetos obtidos a partir da irradiação de 10 casais/ repetição em diferentes doses (N=50 casais/tratamento).

Doses (Gy)	Média de Eclosão (F1) ^a	Média de Larva L4 (F1)	Média de pupas (F1)	Média de adultos (F1)	
				Machos	Fêmeas
0	$143 \pm 0,3$	$135 \pm 0,3$	$118 \pm 0,2$	$45 \pm 0,3$	$55 \pm 0,3$
35	$121 \pm 0,2$	$78 \pm 0,2^*$	$24 \pm 0,1^*$	$0,4 \pm 0,1^*$	$2,1 \pm 0,1^*$
40	$100 \pm 0,2^*$	$53 \pm 0,2^*$	$2,1 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$1,6 \pm 0,1^*$
45	$82 \pm 0,2^*$	$10 \pm 0,1^*$	$1,9 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$
50	$30 \pm 0,1^*$	$0,8 \pm 0,0^*$	$0,1 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$
55	$10 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$
60	$0,3 \pm 0,1^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$
65	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$
70	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$	$0,0 \pm 0,0^*$

*Valores seguidos de asterisco nas colunas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

Nota: Dados médios de adultos na geração P não foram mostrados nessa tabela

^aF1= Geração Progênie; Fonte: autor da tese.

Os resultados desse estudo mostram claramente que quando os adultos são irradiados há uma redução drástica no número médio de machos e fêmeas, já que a partir da dose de 40 Gy houve uma alta mortalidade desses insetos, ocorrendo apenas um número médio de 1.6 ± 0.1 fêmeas. A dose necessária para atingir 100 % de mortalidade de machos e fêmeas foi de 40 e 45 Gy respectivamente.

Outros estudos, com diferentes espécies de mosquitos frequentemente, usam doses variando entre 30 a 100 Gy para obter uma completa esterilidade dos insetos (BAKRI, 2005; OLIVA et al., 2012; MUNHENGGA et al., 2016).

6.5 Estudo do efeito da irradiação na competitividade de machos

Nos experimentos de competitividade, o número de ovos obtidos do acasalamento de machos não irradiados (MNI) e fêmeas não irradiadas (FNI) (tratamento controle) foram de 1217, enquanto o número de larvas foi de 1165, o que resultou numa porcentagem de ovos inviáveis de apenas 4 %. A porcentagem de machos recapturados das armadilhas ovitrampas foi de 25,5%, enquanto que de fêmeas foi de 70 % (Tabela 5).

Quando machos estéreis (ME), irradiados com 40 Gy, foram colocados em gaiolas na presença de MNI e FNI (na proporção de 100: 10: 10), o número de ovos obtidos foram de 567, enquanto o número de larvas foi de 96, o que resultou numa porcentagem de ovos inviáveis de 83,1 %. A porcentagem de machos recapturados das armadilhas ovitrampas foi de 19,0 %, enquanto que de fêmeas foi de 80 %.

Quando ME, irradiados com 50 Gy, foram colocados em gaiolas na presença de MNI e FNI (na proporção de 100: 10: 10), o número de ovos obtidos foram de 544, enquanto o número de larvas foi de 42, o que resultou numa porcentagem de ovos inviáveis de 92,2 %. A porcentagem de machos recapturados das armadilhas ovitrampas foi de 23,0 %, enquanto que de fêmeas foi de 60 %.

Sendo assim, conclui-se que os efeitos da radiação gama, nas doses de 40 e 50 Gy, nos machos estéreis, provocaram redução no número de ovos, larvas e percentual de ovos inviáveis quando comparados ao tratamento controle, já que estatisticamente esses valores foram diferentes.

Tabela 5. Experimento de competitividade entre machos de *Aedes aegypti* irradiados (ME) e não irradiados (MNI) para o acasalamento com fêmeas não irradiadas (FNI) em condições simuladas de campo e longevidade média (LM).

^a Proporção de mosquitos	Número de ovos/ teste	Número de larvas	Percentual de ovos inviáveis	Número de mosquitos recapturados (após 15 dias)
10 MNI: 1FNI	1217	1165	4,3%	26 Machos (25,5%) ^a LM= 24,4
(100:10)				7 Fêmeas (70,0%)
10 ME (40 Gy): 1 MNI: 1FNI	567*	96*	83,1%*	19 Machos (19,0%) LM= 14,3
(100: 10: 10)				8 Fêmeas (80,0%)
10 ME (50 Gy): 1 MNI: 1FNI	544*	42*	92,2%*	23 Machos (23,0%) LM = 7,1
(100: 10: 10)				6 Fêmeas (60,0%)

*Valores seguidos de asterisco nas colunas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

^aME = Macho estéril; MNI= Macho não irradiado; FNI = Fêmea não irradiada; LM = Longevidade média; Fonte: autor da tese.

MADAKACHERRY et al. (2013) em experimentos avaliando a competitividade com de machos de *A. albopictus* em laboratório e em testes de campo simulado, revelaram que proporções de 5:1, podem ser praticadas, mas que uma redução expressiva de ovos viáveis somente é alcançada com o uso de proporções maiores.

No trabalho realizado por LIMA, (2015) foi demonstrado que apenas proporções equivalentes ou superiores a 10:1 (macho irradiado: macho não irradiado), levaram a reduções significativas e próximas a 80% na produção de ovos viáveis, como usadas em nosso estudo.

LACROIX et al. 2012 e OLIVA et al. (2013) avaliaram que diversos fatores influenciam significativamente no processo de análise em testes de competitividade, tais como: inseminação múltipla já verificada para esta espécie de *Aedes*, alimentação, tipo de gaiola e manipulação humana.

Quando observamos os dados de variáveis ambientais em campo simulado, identificamos que a temperatura durante o estudo variou de $19 \pm 1,0$ a $31,6 \pm 1,4$ °C com

44,3 ± 1,3 a 97,1 ± 1,5 % de umidade relativa do ar, a velocidade do vento variou entre 0,7 ± 0,1 a 6,8 ± 1,4 m/s e 0,1 ± 0,1 a 14,4 ± 1,5 mm de pluviometria (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios (±EP) das variáveis ambientais durante o teste de competitividade dos machos estéreis de *Aedes aegypti*, em simulação de campo

^b Variáveis Ambientais		Simulação em campo/ ^a proporção de mosquitos/Período		
		10 MNI: 1 FNI (Controle)	10 ME: 1 MNI: 1 FNI (40 Gy)	10 ME: 1 MNI: 1 FNI (50 Gy)
		(01/12/2017 a 21/12/2017)	(02/01/2018 a 22/01/2018)	(24/01/2018 a 12/02/2018)
Temperatura (°C)	Valores			
	Min	19,4 ± 1,0	19,4 ± 1,1	19,0 ± 1,1
	Med	24,5 ± 1,2	23,5 ± 1,2	24,1 ± 1,2
	Máx	31,6 ± 1,4	29,9 ± 1,3	30,9 ± 1,3
Umidade relativa (%)	Min	44,3 ± 1,3*	80,9 ± 1,3	47,6 ± 1,3*
	Med	72,2 ± 1,4	54,1 ± 1,2*	73,9 ± 1,4
	Máx	92,8 ± 1,4	97,1 ± 1,5	94,3 ± 1,4
Velocidade do vento (m/s)	Min	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,9
	Med	1,7 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,8 ± 1,1
	Máx	6,8 ± 1,4	6,7 ± 1,3	6,4 ± 1,3
Pluviometria (mm)	Min	0,1 ± 0,1*	1,0 ± 0,9	0,1 ± 0,1*
	Med	2,2 ± 0,2*	7,4 ± 1,1	1,8 ± 1,1*
	Máx	10,7 ± 1,2	14,4 ± 1,5	13,1 ± 1,4

*Valores seguidos de asterisco nas linhas diferem estatisticamente entre si (P < 0,05).

^aME = Macho estéril; MNI= Macho não irradiado; FNI = Fêmea não irradiada.

^bDados de variações climáticas foram obtidos da estação automática do posto meteorológico da ESALQ/USP; Fonte: autor da tese.

Os dados mostram que a variável ambiental que mais sofreu alteração foi a umidade relativa do ar e que os valores mais altos foram observados nos dois últimos períodos, realizados nos meses de janeiro e fevereiro de 2018. No teste de simulado de campo foi ainda observado que a sobrevivência dos machos irradiados nas doses de 40 e 50 Gy não ultrapassou 15 dias, enquanto que os machos na dose controle foram recapturados com até 24 dias em média.

Assim, teoricamente, o percentual de recaptura de machos estéreis nos testes de campo simulado variou de 19,0 a 23,0 %. De um modo geral, estes valores revelam um baixo número de machos recapturados entre as diversas proporções, demonstrando que a

maioria dos machos irradiados possuem uma longevidade menor do que 20 dias diante das condições simuladas de campo apresentadas nesse estudo.

Fatores externos como altas temperaturas e baixas umidades relativa do ar, ventos fortes e alta pluviometria influenciam diretamente os mosquitos em parâmetros como capacidade de dispersão, aumento do metabolismo energético e consequentemente maior procura por carboidratos (PONLAWAT, 2009; OLIVA et al., 2012; BELLINI et al., 2013).

6.6 Avaliação do efeito da radiação gama na longevidade de adultos F1 provenientes de pupas e adultos irradiados

Os resultados mostraram um decréscimo na longevidade quando houve um aumento das doses de radiação, embora não ocorreram diferenças estatísticas entre a longevidade dos adultos F1 provenientes de pupas (1) e adultos irradiados (2). Entretanto, quando observamos a longevidade entre as doses, pudemos verificar que a irradiação de pupas e adultos afetou a longevidade dos adultos F1. A partir de 40 Gy, a longevidade dos adultos (1) e (2) tiveram uma redução significativa em comparação às demais doses. Na dose de 45 Gy, os adultos (1) e (2) sobreviveram menos de 16 dias (Tabela 7).

Tabela 7. Longevidade média em dias (d) ($\pm$ EP) de machos provenientes de pupas irradiadas (1) e adultos irradiados (2).

Doses (Gy)	Longevidade média (1)	Longevidade média (2)
0	27,1 $\pm$ 0,4	27,2 $\pm$ 0,4
20	26,6 $\pm$ 0,4	26,8 $\pm$ 0,4
30	25,8 $\pm$ 0,3	26,1 $\pm$ 0,3
35	25,4 $\pm$ 0,3	25,4 $\pm$ 0,2
40	18,2 $\pm$ 0,1*	18,5 $\pm$ 0,1*
45	15,2 $\pm$ 0,1*	15,4 $\pm$ 0,1*

*Valores seguidos de asterisco nas colunas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$); Fonte: autor da tese.

Outros autores também reportaram um efeito negativo significativo da irradiação sobre a longevidade de machos quando pupas de *A. albopictus* foram irradiadas em doses acima de 40 Gy (BAKRI, 2005; BALESTRINO et al., 2010). Entretanto, quando pupas de

A. pharoensis e *A. stephensi* foram irradiadas, longevidade de machos decresceu em doses acima de 100 Gy (HELINSKI; PARKER; KNOLS 2006; HELINSKI e KNOLS, 2008).

As possíveis causas da redução na longevidade podem ser devido a danos somáticos induzidos por tratamentos com radiação (PROVERBS e NEWTON, 1962; PORVERBS, 1969; YAMADA et al., 2014).

No entanto esse efeito negativo do tratamento por radiação aparentemente é muito forte durante os últimos dias de vida dos machos. Em nosso estudo, aproximadamente após 2 semanas esses efeitos também foram observados, entretanto outros autores não encontraram diferenças na longevidade estudando pupas de *A. pharoensis* (machos e fêmeas) irradiadas com doses de 4.8 – 68 Gy quando comparadas com pupas na dose controle.

HELINSKI, PARKER, KNOLS (2006) concluíram que pupas e adultos de *Anopheles arabiensis* irradiados com baixas doses (entre 4 – 15 Gy) provocam um aumento na longevidade de machos adultos. Esse fenômeno pode ser explicado pela hormesis por poder causar um efeito protetivo quando pupas e adultos são irradiados com baixas doses de radiação, o qual poderia estimular defesas do inseto, envolvendo mecanismos de reparação celular (FEINENDEGEN, 2005). Entretanto, nesse presente trabalho, esse fenômeno não foi observado, já que baixas doses não aumentaram a longevidade de adultos.

Em nosso estudo, as baixas e altas doses de radiação sejam em ovos, larvas, pupas ou adultos, afetaram significativamente o desenvolvimento das subsequentes fases até o mosquito adulto. LACHANCE e GRAHAM (1984) mostraram que qualquer dose de radiação aplicada induz mutações letais dominantes em células germinativas, embora tais mutações não afetem a maturação das células em um gameta ou a capacidade do gameta em formar o zigoto, essa irradiação pode causar a morte do embrião em desenvolvimento resultando em ovos inviáveis.

No geral, para fins de doses esterilizantes, o efeito da radiação em pupas foi menor do que quando comparados aos adultos que foram irradiados. Para insetos irradiados na fase adulta, as doses de 40 e 45 Gy foram esterilizantes para machos e fêmeas, respectivamente. Para insetos irradiados na fase de pupa, essa dose foi maior, ou seja, 45 e 50 Gy para machos e fêmeas, respectivamente.

Entretanto, a dificuldade de manuseio para irradiação da fase adulta é grande, assim torna-se mais conveniente por razões práticas, estimular estudos que priorizem a irradiação na fase pupal do mosquito, já que o manuseio desse estágio de vida é mais fácil, além do

mais, os insetos adultos são mais frágeis. Este presente trabalho foi extremamente relevante para programas de controle de espécies de mosquitos que incluem a tecnologia da Técnica do Inseto estéril - TIE no Brasil, para poder inserir no manejo integrado de pragas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a dose de 15 Gy foi esterilizante para insetos irradiados na fase de ovo. Para a fase de larva, a dose 20 Gy foi esterilizante. Para os insetos irradiados na fase de pupa, 60 Gy foi a dose esterilizante, já para adultos F1 a dose necessária foi de 45 Gy para macho e 50 Gy para fêmea. Para esterilização de adultos irradiados na fase adulta foi necessária uma dose de 40 Gy para machos e 45 Gy para fêmeas, respectivamente. Os resultados do experimento de competitividade mostraram que a proporção de 10 machos estéreis: 1 macho não irradiado: 1 fêmea não irradiada causou 92,2% de ovos inviáveis, na dose de 50 Gy. A longevidade dos machos foi significativamente reduzida quando se irradiou pupas e adultos em uma dose de 40 Gy.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MALEK, A.A., TANTAWY, A.O., WALKID, A.M. Studies on the eradication of *Anopheles pharoensis* by the Sterile-Male technique using cobalt-60. Biological effects of gamma radiation on the different developmental stages. *Journal of Economic Entomology*, v.59, p.672-678, 1966.

ABDEL-MALEK, A.A., TANTAWY, A.O., WALKID, A.M. Studies on the eradication of *Anopheles pharoensis* by the Sterile-Male technique using cobalt-60. III. Determination of the Sterile Dose and its biological effects on different characters related to "Fitness" components. *Journal of Economic Entomology*, v.60, p.20-23, 1967.

ACIOLI, R.D.O. *Uso de armadilhas de oviposição (ovitrapas) como ferramenta para monitoramento populacional do Aedes spp em bairros do Recife*. Dissertação (Mestrado

em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

AKRAM, M., ASLAMKHAM, M. Production of dominant lethal mutations by gamma-irradiation in the malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. *Pakistan Journal of Zoology*, v.7, p.177-184, 1975.

ALI, S.R., ROZENBOOM, L.E. Observations on sterilization of *Anopheles (C.) albimanus* Wiedemann by X-irradiation. *Mosquito News*, v.32, p.574-579, 1972.

ALPHEY, L., BEARD, C.B., BILLINGISLEY, P., COETZEE, M., CRISANTI, A., CURTIS, C. Malaria control with genetically manipulated insect vectors. *Science*, v. 298, p.119-121, 2002.

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

ANDREASEN, M.H., CURTIS, C.F. Optimal life stages for radiation sterilization of *Anopheles* for sterile insect releases. *Journal of Medical Veterinary Entomology*, v.19, p.238-244, 2005.

ARAÚJO, A.P.; DINIZ, D.F.A.; HELVECIO, E.; BARROS, R.A. DE.; OLIVEIRA, C. M.F. DE.; AYRES, C.F.J.; MELO-SANTOS, M.A.V. DE; REGIS, L.N.; SILVA-FILHA, M.H.N.L. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasites & Vectors*, v. 6, p. 297, 2013.

ARTHUR, V. Controle de insetos-praga por radiações ionizantes. *O Biológico*, V.59, p.77-79, 1997.

ARTHUR, V.; ARTHUR, P.B.; GAVA, M.A.; FRANCO, S. S. H.; MACHI, A. R. Uso de técnicas nucleares em entomologia no Brasil. In: BUSOLI, A. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; SOUZA, L. A.; KUBATA, M. M.; COSTA, E. N.; SANTOS, L. A. O.; NETTO, J. C.;

VIANA, M. A. *Tópicos em entomologia agrícola V*. Jaboticabal, SP: Gráfica e Editora Multipress, 2012a, p. 13-25.

ARTHUR, V; GAVA, M.A. Parceria produz mosquito transmissor da dengue estéril, *Journal de Piracicaba*, 2012a. Ciência, p. 5.

ARTHUR, V; GAVA, M.A. Controle do *Aedes*, *Gazeta de Piracicaba*, P 2012b. Pesquisa, p. 14.

AVILÉS, G., RANGEON, G.; BARONI, P.; PAZ, V.; MONTEROS, M.; SARTINI, J.L.; ENRÍA D. Epidemia por virus dengue-2 en Salta, Argentina, 1988. *Medicina (B Aires)* v. 60, p. 875–879, 2000.

ARTHUR, V.; MACHI, R. A.; MASTRANGELO, T. Ionizing Radiation in Entomology: In: NENOI, M. (Ed.). *Evolution of Ionizing Radiation Research*, II Ed., In Tech, 2015, n. 1, p. 1-17.

BAKRI, A.; HEARTHER, N.; HENDRICH, J.; FERRIS, I. Fifty years of radiation biology in entomology: lessons learned from IDIDAS. *Annals of the Entomological Society of America*, v.98, p.1-12, 2005.

BALESTRINO, F.; MEDICI, A.; CANDINI, G.; CARRIERI, M.; MACCAGNANI, B.; CALVITTI, M.; MAINI, S.; BELLINI, R. Gamma ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, p. 581–591, 2010.

BARRY, J.D.; SHELLY, T.E.; MCINNIS, D.O.; MORSE, J.G. Potential for Reducing Overflooding Ratios of Sterile Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) with the Use of Ginger Root Oil. *The Florida Entomologist*, v. 86, p. 29-33, 2003.

BELLINI, R.; BALESTRINO, F.; MEDICI, A.; GENTILE, G.; VERONESI, R.; CARRIERI, M. Mating Competitiveness of *Aedes albopictus* Radio-Sterilized Males in Large Enclosures Exposed to Natural Conditions, *Journal of Medical Entomology*, v. 50, p. 94-102, 2013.

BECKER, N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; DAHL, C.; LANE, J.; KAISER, A. *Mosquitoes and their control*. New York: Kluwer Academic: Plenum Publishers, 2003. 377 p.

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

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

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

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

BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A.W.; MOYES, C.L.; DRAKE, J.M.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; SANKOH, O.; MYERS, M.F.; GEORGE, D.B.; JAENISCH, T.; WINT, G.R.; SIMMONS, C.P.; SCOTT, T.W.; FARRAR, J.J.; HAY, S.I. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, p. 504–50, 2013.

BLOEM, S.; CARPENTER, J.E. Evaluation of population suppression by irradiated Lepidoptera and their progeny. *Florida Entomologist*, v.84, p. 165-171, 2001.

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

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

CAO-LORMEAU V.M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A.L.; MALLET, H.P.; SALL, A.A.; MUSSO, D. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases* v.20, p.1084-1086, 2014.

CARVALHO, D.O.; DERRIC N.; NAISH, N.; ANDREW R.; MCKEMEY, P. G.; WILKE, A.B.B.; MARRELLI, M.T.; VIRGINIO, J.F.; ALPHEY, L.; CAPURRO, M.L. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. *Journal of Visualized Experiments*, Cambridge, v. 83, p 1- 10, 2014.

CAVALCANTI, L.P.; VILAR, D.; SOUZA-SANTOS, R.; TEIXEIRA, M.G. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, p.132–134, 2011.

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

CAPALBO, D.; MORAES, I.; ARANTES, O.; REGIS, L.; FERNANDEZ-LARREA VEJA, O.; BENINTENDE, G.B.; GUIMARÃES, S.; ARRUDA, R.; MORAES, R.; Produção de bactérias entomopatogênicas na América Latina. In: Alves, S. B.; Lopes, R. B. (Ed.). *Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba: FEALQ*, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC) AND PREVENTION. *Dengue type 3 infection – Nicaragua and Panama*, October–November 1994. MMWR. v. 44, p. 21–24, 1995.

COUCH T.L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (eds), *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 297-314. 2000.

CURTIS, C.F. Radiation sterilization. Report on mosquito research. *Ross Institute of Tropical Hygiene*. v.1, p.76-31, 1976.

CURTIS, C.F. Induced sterility in insects. *Advanced Reproductive Physiology and Biotechnology*, v.5, p.120-165, 1971.

CLEMENTS, A. N. *The biology of mosquitoes*. London: CABI, 1992.

DAME, A.D.; CURTIS, F.C.; BENEDICT, Q.M.; ROBINSON, S.A.; KNOLS, G.J.B. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malaria Journal*, London, v. 8, p. 16-23, 2009.

DAME, D.A. Genetic control by sterilized mosquitoes. In: CHAPMAN R, BARR R, WEIDHAAS DE, LAIRD M. (Eds.). *Biological Control of Mosquitoes*. American Mosquito Control Association, Bulletin v. 6, p.159-172. 1985.

DAME, D.A.; LOWE, R.E.; WILLIAMSON, D.L. Assessment of Released Sterile *Anopheles albimanus* and *Glossina morsitans morsitans*. In: KITZMILLER, J. B.; KANDA, T. (Eds.). Cytogenetics and genetics of vectors. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier *Biomedical*, p. 231-248, 1981.

DAVIS, A.N.; GAHAN, J.B.; WEIDHAAS, D.E.; SMITH, C.N. Exploratory studies on gamma irradiation for the sterilization and control of *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal of Economic Entomology*, v.52, p.868-870, 1959.

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

DICK, B.O.; SAN MARTÍN, J.L.; MONTOYA, R.H.; DEL DIEGO, J.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G.H. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 87, p. 584-593, 2012.

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

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

DUTRA, H.L.C.; DOS SANTOS, L.M.B.; CARAGATA, E.P.; SILVA, J.B.L.; VILLELA, D.A.M.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; MOREIRA, L. A. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, p. e0003689, 2015.

DYCKY, A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. *The Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Heidelberg: Springer, 2005.

DUFFY, M.R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI, R.S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A.J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B.J.; FISCHER, M.; HAYES, E.B. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*. v.360, p.2536-2543, 2009.

ENKERLIN, W.R.; *Impact of Fruit fly Control programmes*. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Eds.). Heidelberg: Springer, 2005, p. 651-700.

FIGUEROA, R.; RAMOS, C. Dengue virus serotype 3 circulation in endemic countries and its reappearance in America. *Archives of Medical Research*., v. 31, p. 429–430, 2000.

FINLAY, C. El mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la fiebre amarilla. *Anales de la Real Academia de Ciencias Médicas, Físicas y Naturales de la Habana*., v.18, p. 147–169, 1881.

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

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

GORGAS, W. Sanitary conditions as encountered in Cuba and Panama and what is being done to render canal zone healthy. *Medication Reconciliation.*, 10p, 1905.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *Puerto Rico health sciences journal.* v.6, p. 107–111, 1987.

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

GUBLER, D.J., MELTZER, M. Impact on the dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Advances in Virus Research* v. 53, p. 35–70, 1999.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G.; MORIER, L.; FERNÁNDEZ, A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba 1981. *Bulletin PAHO*, v.18, p. 213–220, 1984.

GUZMÁN, M.G.; VÁZQUEZ, S.; MARTÍNEZ, E.; ALVAREZ, M.; RODRÍGUEZ, R., KOURÍ, G.; LOS REYES, J. DE.; ACEVEDO, F. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Pan American Journal of Public Health.* v. 1, p. 194–199, 1997.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G.; VALDES, L.; BRAVO, J.; ALVAREZ, M.; VÁZQUES, S.; DELGADO, I.; HALSTEAD, S.B. Epidemiologic studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *American Journal Epidemiology.* v. 152, p. 793–799, 2000.

GUZMÁN, M.G. Treinta años después de la epidemia Cubana de dengue hemorrágico en 1981. *Revista Cubana Medicina Tropical.* v.64, p. 5–14, 2012.

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

GROOT H. Dengue fever: present and potential problems in Colombia. *Indian Tropical Health.*, v.8, p. 94–103, 1975.

GROOT, H.; MORALES, A.; ROMERO, M.; VIDALES, H.; LESMES-DONALDSON, C.; MÁRQUEZ, G.; ESCOBAR DE CALVACHE, D.; SÁENZ, M.O. *Pan American Health Organization. Dengue in the Caribbean, 1977. Washington, DC: PAHO; 1979.*

Recent outbreaks of dengue in Colombia; pp. 31–39.

HELINSKI, M.; EL-SAYED, B.; KNOLS, B.G.J. The Sterile Insect Technique: can established technology beat malaria? *Entomologische berichten*. v.66, p.13-20. 2006.

HELINSKI, M.E.H.; PARKER, G.A.; KNOLS, G.J.B. Radiation biology of mosquitoes, *Malaria Journal*, v. 8, p. 23-39, 2009.

HENDRICH, J.; FRANZ, G.; RENDON, P. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only release for control of Mediterranean fruit-flies during fruiting seasons. *Journal of Applied Entomology*, v. 119, p. 371-377, 1995.

HENDRICH, J. Use of the Sterile Insect Technique Against Key Insect Pests. *Sustainable Development International* v. 2, p.75-79, 2000.

HOCH, G.; SCHOPF, A. Effects of *Glyptapanteles lipardis* (Hym. Braconidae) parasitism, polydnavirus and venom on development of microsporidia infected and uninfected *Lymantria dispar* (Lep: Lymantriidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.77, p.37-43, 2001.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Development of the Sterile Insect Technique for mosquitoes.** Disponível em: <<http://www.iaea.org/programmes/naal/agri/index.htm>> acesso em: 12 nov. 2018.

IOOS, S.; MALLETT, H.P.; GOFFART, I.L.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 44, p. 302-307, 2014.

KOURÍ, G.P.; GUZMÁN, M.G.; BRAVO, J.R.; TRIANA, C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin World Health Organization*, v. 67, p. 375–380, 1989.

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

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

KNIPLING, E.F. Possibilities of insect population control through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, v.48, p.459-462, 1955.

LACHANCE, L.E.; GRAHAM, C.K. Insect radiosensitivity: dose curves and dose-fractionation studies of dominant lethal mutations in the mature sperm of 4 insect species. *Mutation Research*, v.127, p.49-59, 1984.

LACROIX, R.; MCKEMEY, A.R.; RADUAN, N.; KWEE WEE, L.; HONG MING, W.; GUAT NEY, T.G.; SALMAN, S.A.A.S.R.; SUBRAMANIAM, S.; NORDIN, O.; ANGAMUTHU, C. Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS One*. v.7, no. 8, p.e42771, 2012.

LANCE, D. R.; MCINNIS, D. O. *Biological Basis of the Sterile Insect Technique*. In: DYCK V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Eds.). - The Netherlands: Springer, 2005.

LEWIS, J.A., CHANG, G.J., LANCIOTTI, R.S., KINNEY, R.M., MAYER, L.W., TRENT, D.W. Phylogenetic relationships of dengue-2. *Virology*. v. 197, p. 216–224, 1993.

LIMA, J. B.; DA-CUNHA, M.P.; DA SILVA, R.C.; GALARDO, A.K.; SOARES, SDA. S, BRAGA, I.A.; RAMOS, R.P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 68, p. 329-333, 2003.

- LINES, J.D.; CURTIS, C.F. Genetic sexing system in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*., v.78, p.848-851, 1985.
- LOROÑO PINO, M.A.; FARFÁN ALE, J.A.; Paredes, R.E.P.; Kuno, G.; Gubler, D.J. Epidemic dengue-4 in the Yucatán, Mexico, 1984. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.35, p. 449–455, 1993.
- MARDINI, L.B.L.; TORRES, M.A.N.; SILVEIRA, G.L.D.; ATZ, A.M.V. *Simulium* spp. control program in Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 211- 214, 2000.
- MADAKACHERRY, O.; LEES, R.S.; GILLES, J.R.L. *Aedes albopictus* (Skuse) males in laboratory and semi-field cages: release ratios and mating competitiveness. *Acta tropica*, v.132, pp.S124-S129, 2014.
- MASTRANGELO, T.; WALDER, J. Use of Radiation and Isotopes in Insects, Radioisotopes. *Applications in Bio-Medical Science*, v.2, p. 67-92, 2011.
- MEYER, N.; SIMPSON, O. *History of the Mexico and United States screwworm eradication programme*. New York: Vantage, 1995. v.1, 367p.
- MASUH, H. Re-emergence of dengue in Argentina: historical development and future challenges. *Dengue Bulletin*. v. 32, p. 44–54, 2008.
- MIAGOSTOVICH, M.P.; NOGUEIRA, R.M.; CAVALCANTI, S.M.B.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 35, p. 149–154, 1993.
- MICHELE, E.H.; PARKER, BART, A.G.; KNOLS, G.J. Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* *Malaria Journal*, v. 5, p.1186-1275, 2006.

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

METTLER JUNIOR, F.A.; UPTON, A.C. *Medical effects of ionizing radiation*. METTLER JUNIOR, F.A.; UPTON, A.C (Eds.) Philadelphia, P.A. Saunders Company. 1995.

MONTELLA, I. R.; MARTINS, A.J.; VIANA-MEDEIROS, P.F.; LIMA, J.B.; BRAGA, I.A.; VALLE, D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MORAES, G.H.; DUARTE, E.C. Reliability of dengue mortality data in two national health information systems, Brazil, 2000–2005. *Cadernos de Saúde Pública*, v.25, p. 2354–2364, 2009.

MORAES, L.T.F. Dengue in Brazil: past, present and future perspective. *Dengue Bulletin*. v. 27, p. 25–32, 2003.

MORALES, A.; GROOT, H.; RUSSEL, P.K.; MCCOWN, J.M.; Recovery dengue-2 virus from *Aedes aegypti* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.22, p. 785–787,1973.

MUNHENGGA, G.; BROOKE, B.D.; GILLES, J.R.L.; SLABBERT, K.; KEMP, A.; DANDALO, L.C.; WOOD, O.R.; LOBB, L.N.; GOVENDER, D.; RENKE, M.; KOEKEMOER, L.L. Mating competitiveness of sterile genetic sexing strain males (GAMA) under laboratory and semi-field conditions: Steps towards the use of the Sterile Insect Technique to control the major malária vector *Anopheles arabiensis* in South Africa. *Parasites & Vectors*, 2016.

NAVARRO, M. V. T., LEITE, H.J.D.; CRUZ A, J. DA.; COSTA, E.A. Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. *Histórias, ciências, saúde-Manguinhos*, v. 15, p. 4, 2008.

NOGUEIRA, R.M.; SCHATZMAYR, H.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FARIAS, M.F.; FARIAS FILHO, J.D. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 83, p. 219–225, 1989.

NOGUEIRA, R.M.; ZAGNE, S.M.; MARTINS, I.S. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 86, p. 69–274, 1991.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E.; SOUZA, R.W.; ZAGNE, SMO.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiology Infects* v. 11, p. 163–170, 1993.

NOGUEIRA, R.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SHCATZMAYR, H.G.; MORAES, G.C.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, J.; CERQUEIRA, V.; PEREIRA, M. Dengue type 2 outbreak in the south of the state of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 37, p. 507–510, 1995.

NOGUEIRA, R.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E.; SHCATZMAYR, H.G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. p. 85-253, 1990.

NOGUEIRA, R.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.; PEREIRA, M.A.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 96, p. 925–926, 2001.

NOGUEIRA, R.M.; ARAÚJO, J.M.G.; SHCATZMAYR, H.G. Dengue virus in Brazil, 1986–2006. *Revista Panamericana de Salud Pública*. v.22 p.358–363, 2007.

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

OLIVA, C.F.; DAMIENS, D.; VREYSEN, M.J.B.; LEMPERIÈRE, G.; GILLES, J. The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males. *PLoS ONE*, v. 7, p. 49414, 2012.

OCAZONEZ, R.E.; CORTES, F.M.; VILLAR, L.A.; GÓMEZ, S.Y. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 101, p. 725–731, 2006.

OLIVA, C.F.; DAMIENS, D.; BENEDICT, M.Q. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. *Acta Tropica*, v. 132, p. 12–19, 2013.

OSANAI, C.H.; TRAVASSOS DA ROSA, AP.; TANG, A.T, AMARAL, A.S, DO PASSOS, A.D, TAUIL, P.L. Outbreak of dengue in Boa Vista, Roraima: preliminary report. *revista do instituto de medicina tropical de são paulo*. v. 25, p.53–54, 1983.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION PAN AMERICAN SANITARY CONFERENCE; 1942. *Resolution CSP 11. R1 Sept. 1942 Pub.* 198, 3–4. 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Direct Council of the Pan American Health Organization. 1947. *Resolution CD1.R1. Continental Aedes aegypti eradication*. Sept–Oct 1947 Pub. 247, 3. Disponível em: <http://www.paho.org/English/GOV/CD/ftcd_1.htm#R1>. Acesso em: 26 set. 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION DENGUE IN THE CARIBBEAN, 1977. *Pan American Health Organization (PAHO)* v.375, p. 1–182, 1979.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiology Bulletin*. v.11, p. 7–9, 1990.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue in the Americas: an update. *Epidemiology Bulletin*. v.14, p. 1–3, 1993.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas. *Revista Panamericana Salud Publica*. v.1, p. 381–388, 1997.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Re-emergence of dengue in the Americas. *Epidemiology Bulletin*. v. 18, p. 1–6, 1997.

Pan American Health Organization (PAHO) (**Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion) from 1995 through 2010**). Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=264&Item=363&lang=en. Acesso em: 24 out. 2018.

PAPATHANOS, P. A.; BOSSIN, H. C.; BENEDICT, M. Q.; CATTERUCCIA, F.; MALCOLM, C. A.; ALPHEY, L.; CRISANTI, A. Sex separation strategies: past experience and new approaches. *Malaria Journal*, v. 8, p. 32-41, 2009.

PESSANHA, J.E.M.; CAIAFFA, W.T.; CÉSAR, C.C.; PROIETTI, F.A. Avaliação do Plano Nacional de Controle da Dengue. *Cadernos de Saúde Pública*, v.25, p. 1637–1641, 2009.

PASSOS, M.C; FIGUEIREDO, M.A.A. Mortalidade por dengue no Estado da Bahia. *Revista Baiana de Saúde Pública*, v.35, p.687–694, 2011.

PINHEIRO, F.P.; CORBER, S.J. *Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas*. World Health Stat Q. v.50, p. 161–169, 1997.

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

POWERS, A.M; LOGUE, C.H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*, v.88, n.9, p.2363-2377, 2007.

PROVERBS, M.D. Induced sterilization and control in insects. *Annual Review of Entomology*., v.4, p.81-102,1969.

REED, W.; CARROL, J.; AGRAMONTE, A.; LAZEAR, J.W. The etiology of yellow fever – preliminary note. *Philadelphia Medicine Journal*. v.6, p. 790–796, 1900.

REGIS, L.N.; SILVA-FILHA, M.H.; NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J.; FEGIS, L. N. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*, v.17, p. 377-380, 2001.

REGIS, L.N., ACIOLI, R.V.; SILVEIRA, J.R.; MELO-SANTOS, J.C.M.A.V.; SOUZA, W.V.; RIBEIRO, C.M.N.; DA SILVA, J.C.S.; MONTEIRO, A.M.V.; OLIVEIRA, C.M.; BARBOSA, R.M.; BRAGA, C. Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities. *PLoS ONE*, v. 8, p. 65-72, 2013.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.; SALAS, R.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; DE MESA, M.; NOGUEIRA, R.; ROSA, A.T. DE. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. v. 230, p. 244–251, 1997.

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

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

ROTH, A; MERCIER, A; LEPERS, C; HOY, D; DUITUTURAGA, S; BENYON, E; GUILAUMOTT, L; SOUARES, Y. Concurrent outbreaks of dengue, Chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance*, v.19, n.1. 2014.

R Development Core Team (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SANTANA, F. DE. **Secretaria Municipal de Saúde. Boletim da Febre do Chikungunya. Situação epidemiológica dos casos de chikungunya.** 2014. Disponível

em: <http://www.feiradesantana.ba.gov.br/sms/arq/Chikungunya_Feira.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2018.

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

SEVERO, O.P. Eradication of the *Aedes aegypti* **Mosquito from the Americas**. 1955. Disponível em: <http://jdc.jefferson.edu/yellow_fever_symposium/6>. Acesso em: 10 fev. 2018.

Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP. **Departamento de Engenharia de Biosistemas. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, LEB - ESALQ – USP**. 2018. Disponível em: <<http://www.leb.esalq.usp.br/leb/postoaut.html>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

SIQUEIRA, J.B.; MARTELLI, C.M.T., COELHO, E.G.; SIMPLICIO, A.C.R.DA, HATCH, D.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p. 48–53, 2005.

SILVA, L.K.F.; ARTHUR, V.; DE NAVA, D.; PARRA, J.R.P. Uso da radiação gama do Cobalto-60 visando ao tratamento quarentenário e à esterilização de *Stenoma catenifer* Walsingham (Lepidoptera: Elachistidae). **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v.32, p.507-512, 2007.

SIMMONS, C.P.; FARRAR, J.J.; CHAU, N.V.V.; WILLS, B. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v.366, pp.1423–1432, 2012.

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

SOLLER, M.; LANZREIN, B. Polydnavirus and venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae) induce developmental arrest in the pre-pupae of its host *Spodoptera littoralis* (Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v.42, p.471-481, 1996.

SCOTT, T.W.; TAKKEN, W.; KNOLS, B.G.; BOETE, C. The ecology of genetically modified mosquitoes. **Science**, v. 298, p.117-119, 2002.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. *A Time Line for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences*. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2001.

SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.; ROSA AP.T.DA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 8, p. 245–246, 1986.

SHOUKRY, A. X-ray induced sterility, dominant lethality and inherited semisterility in *Anopheles pharoensis* (Dipt., Culicidae). *Angewandte Entomologie*., v.89, p.98-504, 1980.

SHARMA, V.P.; RAZDAN, R.K.; ANSARI, M.A. *Anopheles stephensi*: effect of gamma-radiation and chemosterilants on the fertility and fitness for sterile male releases. *Journal of Economic Entomology*., 71:449-452, 1978.

TANTAWY, A.O.; ABDEL-MALEK, A.A.; WAKID, A.M. Studies on the eradication of *Anopheles pharoensis* by the Sterile-Male technique using cobalt-60. V. Mating competitiveness of radiosterilized males. *Journal of Economic Entomology*., v.60, p.696-699, 1967.

TEIXEIRA, M.G.; ANDRADE, A.M.; COSTA, M.C.; CASTRO, J.N.; OLIVEIRA, F.L.; GOES, C.S.; MAIA, M.; SANTANA, E.B.; NUNES, B.T.; VASCONCELOS, P.F. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, v.21, p.906–7, 2015.

THOMAS, D.D.; DONNELLY, C.A.; WOOD, R.J.; ALPHEY, L.S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, v.287, p. 2474-2476, 2000.

UZCATEGUI, N.Y.; COMACH, G.; CAMACHO, D.; SALCEDO, M; QUINTANA, C, DE M.; JIMÉNEZ, M.; SIERRA, G.; UZCATEGUI, R.C.; JAMES, W.S.; TURNER, S.; HOLMES, E.C.; GOULD, E.A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *Journal of General Virology*. 84, p. 1569–1575, 2003.

VASCONCELOS, P.F.; ROSA, E.S.T.DA.; ROSA, JF.T.DA.; FREIRAS, R.B.; RODRIGUES, S.G.; ROSA, AP.E.S.T.DA. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 35, p. 141–148, 1993.

VASCONCELOS, P.F.; MENEZES, D.B.DE, MELO, L.P.; PESSOA, P.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA E, TIMBÓ, M.J.; COELHO, C.B.; MONTENEGRO. F.; ROSA, J.T.DA.; ANDRADE, F.; ROSA, J.T.DA.A. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 37, p. 253–255, 1995.

VENTURA, C.V.; MAIA, M.; FILHO, B.V.; GÓIS, L.A. JR.; BELFORT, R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet*, v. 387, p.228, 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *XXXIX Directing Council of the Pan American Health Organization Resolution CD39.R11*. 1996. Disponível em: <http://www.paho.org/english/gov/cd/ftcd_39.htm>. Acesso em: 23 jul. 2018.

WALKER, T.J.; JOHNSON, P.H.; MOREIRA, L.A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRENTIU, F.D.; MCMENIMAN, C.J.; LEONG, Y.S.; DONG, Y.; AXFORD. J.; KRIESNER, P.; LLOYD, A.L. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, v. 476, p. 450–453, 2011.

WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; PUTVATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C.G.; HALSTEAD, S.B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. *The Lancet*, v. 354, p. 1431–1434, 1999.

WILKE, A.B.B.; NIMMO, D.D.; ST JOHN, O.; KOJIN, B.B.; CAPURRO, M.L.; MARRELLI, M.T. Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, v.17, p. 65-74, 2009.

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

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. DE.; MOSIMANN, S.A. L. P.; SANTOS, G. I. V. DOD; SANTOS, D. C. N. DOS; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.110, n.4, p.569-572, 2015.

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

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**