

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

OLÁVIO CAMPOS JÚNIOR

**ANALISE ULTRAESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA
REPRODUTOR MASCULINO DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) EXPOSTO À
RADIAÇÃO GAMA**

**Recife
2019**

OLÁVIO CAMPOS JÚNIOR

**ANALISE ULTRAESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA
REPRODUTOR MASCULINO DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) EXPOSTO À
RADIAÇÃO GAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves.

Coorientador: Prof^a. Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias

**Recife
2019**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Campos Júnior, Olávio.

Análise ultraestrutural do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposto à radiação gama. / Olávio Campos Júnior. – 2019.

113 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Luiz Carlos Alves.

Coorientador: Fábio André Bryner dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde, 2019.

Inclui referências.

1. *Aedes aegypti*. 2. Radiação ionizante. 3. Espermatozoides. 4. Proteômica. I. Alves, Luiz Carlos. (Orient.). II. Santos, Fábio Bryner dos. (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-113

OLÁVIO CAMPOS JÚNIOR

**ANALISE ULTRAESTRUTURAL DO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA
REPRODUTOR MASCULINO DE *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) EXPOSTO À
RADIAÇÃO GAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 25/10/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edvane Borges da Silva
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Lindomar José Pena
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Profa. Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Dedico este trabalho a todos os seres de bom coração, que buscam no amor recheiar a vida de muita luz, amor e paz. Vida, luz e amor é o que dá sentido a cada ser.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Mistério, por absolutamente tudo em minha vida. Por toda proteção, suporte e guiança. Por todos os mestres que cruzaram o meu caminho e por todas as situações, sejam elas consideradas boas ou ruins, sou grato pela mestria de cada momento na edificação do meu ser.

Gratidão a todos os meus ancestrais, que da semente primeira me conduziram por várias gerações até o presente momento... quanta força, quanto amor, quantas alegrias e estímulos, quanto instinto de sobrevivência que cada um deles teve dentro de si para que hoje nós estejamos aqui, vivos? Nós só existimos graças a tudo que cada um deles passou... honro-os!

Sou grato, dentro desse universo de ancestralidade, ao meu núcleo familiar atual. Aos meus avós, meus pais, minha irmã, aos pulsos de vida da minha filha Isadora e minha sobrinha Manuela. Sou o que sou porque somos nós.

Gratidão ao feminino presente em minha vida, que sempre me fez honrar e olhar para o feminino que há em mim. Por todo o exemplo indescritível que são as mulheres. A todas as mulheres presentes em minha história: minha mãe, minhas avós, minha irmã, minha filha Isadora e minha sobrinha Manuela, Cleópatra Campos, Madalena Campos, Elisabeth Neves, Dona Edinalda, Dona Marilene, Vera Lúcia (Verinha), Fernanda Dias, Amanda Vasconcelos, Flávia Monrone, Tercya Araújo, Maria Clara, Carlinha, Marina Caxtaxo, Kilma, Karla Ribeiro, Renata Campina, Gabriela Lins, Carolina Lins, Aline Larissa, Ana Beatriz, Maria Aparecida (Cida), Iasmim Lopes, Jana Sandes, Thainara Milena e Tainá.

Gratidão ao Bar do Peludo, na pessoa do Seu Neném (o Peludo), e ao Dog Lanches, nas pessoas do Flavio Aleixo (Véi) e família, pelos momentos de descontração, sorrisos, boemia, boa música e boa conversa.

Gratidão aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e Laboratório de Microscopia Eletrônica. Gratidão ao Mestre Keizo Asami, que de alguma forma está sempre presente com sua sabedoria, e aos Mestres Rafael Padilha e Sr. Otaviano, por toda torcida e ensinamentos!

Gratidão ao insetário do departamento de entomologia do IAM (Fiocruz-PE), ao Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes do Departamento de energia Nuclear (UFPE) e aos seres iluminados Elizangela Santos, Carlos Albuquerque e André Luiz Teixeira.

Gratidão aos amigos Nairomberg Portela (Peixinho Dourado), Anderson Silva, Thainara Milena, Tainá, Jorge Belém, Fernanda Lima, Karla Ribeiro, Deiviany Mota, Victor

Emanuel e Amanda Vasconcelos (Moglinha), pelo incentivo, apoio, sorrisos, parcerias, pelas vibrações positivas e por ninguém soltar a mão de ninguém.

Gratidão a Iasmim Lopes, Maria Aparecida e Roberto Afonso, por todo o suporte no desenvolvimento da análise proteômica, ao Dr. Michel Batista e à plataforma de proteômica/espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas, pela realização das análises de espectrometria de massas deste projeto.

Gratidão a Fernanda Carolina Dias, Amanda Vasconcelos de Albuquerque e Maria Aparecida Seabra, por estarem todos os instantes ao meu lado, com suas amorosidades, luz e competência.

Gratidão às professoras Edvane Borges e Maria Alice Varjal, pela parceria e cooperação que permitiram a concretização deste projeto.

Gratidão ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde – PPGBAS, pela excelente condução, orientação e auxílio ao pós-graduando, através da competência, humanidade e sensibilidade da Profa. Dra. Ana Porto e do secretário Fábio.

Gratidão ao apoio financeiro da FACEPE, que também possibilitou a realização deste trabalho.

Gratidão ao professor Dr. Luiz Carlos Alves pela orientação.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

RESUMO

Na busca do controle vetorial do *Aedes aegypti*, diversos protocolos vêm sendo desenvolvidos e testados. Dentre esses destaca-se a utilização de radiações ionizantes para a indução de esterilidade como controle das populações-alvo. Para isso, pupas de *A. aegypti* macho foram expostas ou não à radiação gama por cobalto-60 (Co-60). Foram avaliados os pesos, comprimento do cefalotórax das pupas (10 horas após irradiação), os comprimentos da asa e tórax dos adultos machos emergidos após 1 e 10 dias de pupas irradiadas (IR-1 e IR-10) ou não-irradiadas (nIR-1 e nIR-10). Foram avaliadas a capacidade espermática, morfometria dos espermatozoides, histomorfologia testicular, fertilidade e o perfil proteico do sistema reprodutor do mosquito macho por meio de análise de espectrometria de massa. Não foram observadas alterações no peso ou biometria das pupas ou mosquitos adultos irradiados. No entanto, a capacidade espermática variou e foi inicialmente maior nas pupas e nos mosquitos IR-1, aumentando, respectivamente, (31.3 %) e (32.0 %), e foi menor nos mosquitos IR-10 em 21.0 %. A morfometria espermática não foi alterada após a irradiação, apresentando categorias de 200-300 µm: nIR-1 (21.8 %), IR-1(23,6 %), nIR-10 (13.0 %), IR-10 (13.0 %); e espermatozoides na categoria 300-400 µm: nIR-1 (77.6 %), IR-1(75,8 %), nIR-10 (86.7 %), IR-10 (86.1 %). A morfologia testicular perdeu a integridade entre componentes somáticos e germinativos, com maior evidencia no grupo IR-10. As taxas de eclosão dos ovos produzidos a partir de fêmeas normais, acasaladas com machos IR-1 e IR-10, foram muito baixas ou nulas, sendo 0.8 % e 0.2 %, respectivamente. Esses resultados confirmam as respostas diferenciais dos componentes somáticos e germinativos e os efeitos da radiação ionizante ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti* na organização da microestrutura testicular e na capacidade espermática, reduzindo as taxas de fertilidade e eclosão em mosquitos irradiados com 50 Gy durante o estágio de pupa. Foram identificadas 1,012 proteínas nos grupos não-irradiados e irradiados. Entre eles, 75 proteínas estavam reguladas positivamente e 125 proteínas negativamente no grupo IR-1 quando comparado ao grupo nIR-1. Por outro lado, 53 proteínas foram reguladas positivamente, enquanto 115 proteínas foram reguladas negativamente no grupo IR-10 quando comparado ao nIR-10. A análise de ontologia genética categorizou proteínas funcionais reguladas positivamente nos grupos IR-1 e IR-10 com processos similares, representados por movimento celular baseado em microtúbulos, atividade motora de microtúbulo e ligações envolvendo ribonucleotídeos e nucleotídeos. Por outro lado, os processos regulados negativamente foram relacionados aos mecanismos celulares, principalmente metabolismo de ácidos carboxílicos, transcrição e translação proteica nos

grupos IR-1 e IR-10, respectivamente. Os resultados encontrados revelaram componentes moleculares e eventos associados com radiação ionizante no sistema de reprodução dos mosquitos machos *A. aegypti* quando utilizando a técnica do inseto estéril (TIE). Esses dados são úteis na elucidação de mecanismos relacionados ao processo da espermatogênese. Levando em consideração todos os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a irradiação, durante a fase de pupa, e a liberação de mosquitos um dia após a emergência dos mesmos seria vantajosa como TIE para reduzir as populações-alvo de *A. aegypti*.

Palavras chave: *Aedes aegypti*, Radiação ionizante, Espermatozoides, Proteômica.

ABSTRACT

Searching for *Aedes* vector control, several protocols have been developed and tested, among which it is possible to use ionizing radiation for sterility induction leading to the target population suppression. *A. aegypti* males emerged from pupae exposed or not to gamma radiation by cobalt-60 (Co-60). After irradiation, pupae cephalothorax weights and length (10 hours after irradiation), as well as wing and thorax length of emerged adults after 1 and 10 days of irradiated pupae (IR-1 and IR-10) or non-irradiated (nIR-1 and nIR-10) were evaluated. Then, sperm capacity, sperm morphometry, testicular histomorphology and fertility were measured. Male reproductive system protein profile throughout the life cycle was also evaluated by mass spectrometry analysis. No changes in weight or biometrics of pupae or adult mosquitoes were observed after irradiation. However, sperm capacity varied during the mosquito's life cycle and was highest in pupae and IR-1 mosquitoes, respectively (31.3 %) and (32.0 %), while sperm capacity was reduced in mosquitoes IR-10 at 21.0 %. Sperm morphometry was not altered after irradiation with sperm presence only in the 200-300 μm categories: nIR-1 (21.8 %), IR-1 (23.6 %), nIR-10 (13.0 %), IR-10 (13.0 %) and sperm in the 300-400 μm category: nIR-1 (77.6 %), IR-1 (75.8 %), nIR-10 (86.7 %), IR-10 (86.1 %). The testicular morphology was altered with loss of integrity between somatic and germinative components, with higher alterations observed in the IR-10 group. Larval eggs hatching rates from adult females mated with IR-1 and IR-10 males were very low or zero, being 0.8% and 0.2%, respectively. These results confirm differential responses of somatic and germinative components and the effects of ionizing radiation throughout *A. aegypti*'s life cycle, on the organization of the testicular microstructure and on the spermatic ability to perform a reduction in fertility rate and hatching rate in mosquitoes irradiated during pupal larval stage with a dose of 50 Gy. Mass spectrometry analysis identified 1,012 proteins in non-irradiated and irradiated groups. Among them, 75 proteins are up-regulated and 125 down-regulated proteins in the IR-1 group when compared to the nIR-1 group. On the other hand, 53 proteins were up-regulated, while 115 proteins were down-regulated in the IR-10 group compared to nIR-10. Genetic ontology analysis categorized up-regulated functional proteins in groups IR-1 and IR-10 with similar processes, mainly represented by microtubule-based cell movement, microtubule motor activity, and ribonucleotide and nucleotide binding. On the other hand, down-regulated processes were related to cellular mechanisms, mainly carboxylic acid metabolism, transcription and protein translation in groups IR-1 and IR-10, respectively. Results revealed molecular components and events associated with ionizing radiation in the

male reproductive system of *A. aegypti* when using a sterile insect technique (SIT). These data are useful in elucidating mechanisms related to the spermatogenesis process. Taken these data together, it is suggested that irradiation during a pupal stage and the mosquitoes release one day after they emerged are advantageous when applying the SIT to reduce target population of *A. aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*, Ionizing Radiation, Spermatozooids, Proteomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapeamento de distribuição global de dois vetores arbovirais <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> em 2018.	20
Figura 2 – Distribuição atual dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> com base nas condições climáticas atuais. As áreas em azul marinho foram consideradas adequadas e as áreas em cinza foram consideradas como inadequadas.....	21
Figura 3 – Fases que compõem o ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 4 – Trato reprodutivo feminino <i>Aedes aegypti</i> durante a inseminação.....	24
Figura 5 – Abdômen de <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 6 – Terminalia de macho de <i>Aedes aegypti</i>	27
Figura 7 – Sistema reprodutor interno de macho de <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 8 – Sistema reprodutor interno de macho de <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 9 – Irradiador de armazenamento a seco e seus componentes.....	32
Figura 10 – Representação esquemática de um tubo de raios X.....	32
Figura 11 – Consequências da irradiação da molécula de DNA.....	36
Figura 12 – Testículo de pupa macho de <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 13 – Espermatogênese de <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 14 – Plataforma de criação e manutenção de mosquitos	112

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	ARBOVIROSES IMPORTANTES À SAÚDE HUMANA	16
2.2	<i>Aedes Aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	22
2.3	ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR DE <i>Aedes Aegypti</i> Machos	25
2.4	ALTERNATIVAS AO CONTROLE DE INSETOS: UMA BREVE HISTÓRIA DA TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL, CONCEITO, MÉTODO E APLICAÇÃO.....	30
2.5	EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES	35
2.6	ESPERMATOGÊNESE E ESPERMATOGÊNESE EM <i>Aedes</i>	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	GERAL	42
3.2	ESPECÍFICOS	42
4	RESULTADOS	43
4.1	ARTIGO 1	43
4.2	ARTIGO 2	64
5	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A – PALATAFORMA EMERGÊNCIA DE MOSQUITOS E MANUTENÇÃO DE MOSQUITOS ADULTOS.....	112
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1	113

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as arboviroses vêm causando importantes epidemias e, conseqüentemente, prejuízos à saúde mundial, seja animal ou humana (GOULD; HIGGS, 2009; WEAVER; REISEN, 2010). Os patógenos da família Flaviviridae são de grande interesse médico, pois provocam doenças como zika, dengue, febre amarela, febre do Nilo Ocidental e encefalite japonesa (IOOS et al., 2014; WAGGONER; PINSKY, 2016). Flavivírus são um grupo de pequenos vírus envelopados que em sua maioria infecta mamíferos e aves (COLMANT et al., 2017). Os vírus da dengue e zika pertencem a essa família, enquanto o vírus chikungunya pertence à família Togaviridae (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). No ciclo de replicação desses vírus estão os mosquitos vetores *A. aegypti*, originário da África (WOMACK, 1993; WEAVER et al., 2016) e cuja expansão da distribuição de diferentes espécies invasivas é evidente em muitas áreas ao redor do mundo (SCHAFFNER; MATHIS, 2014; MEDLOCK et al., 2015). Diante da importância médica e do impacto social dessas doenças, o controle vetorial bem implementado, utilizando ferramentas existentes, reduz efetivamente a transmissão de vírus disseminados por esses vetores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Portanto, a compreensão da biologia reprodutiva dos mosquitos é essencial para estudos de comportamento, fluxo genético, estrutura populacional e controle genético (PONLAWAT; HARRINGTON, 2007).

Dentre as estratégias para o controle da população dos mosquitos há um interesse especial na produção de insetos machos estéreis. A técnica do inseto estéril (TIE) consiste nas etapas de produção em massa, separação sexual, esterilização por radiação ionizante e liberação no ambiente (HELINSKI; KNOLS, 2008). Apesar dos mosquitos machos não estarem diretamente envolvidos na transmissão de patógenos, sua estrutura física, ligada aos fatores como tamanho corporal e idade, é indicativo de sua qualidade espermática e sucesso reprodutivo (MAHMOOD; REISEN, 1994).

Na TIE, a esterilização de machos e fêmeas é conseguida por exposição a uma fonte de radiação ionizante, principalmente usando raios X ou raios gama, que possuem altos níveis de energia e grande poder de penetração para atravessar materiais (PARKER; METHA, 2007; HELINSKI; PARKER; KNOLS, 2009). Com relação à biologia reprodutiva dos machos, a radiação teve grande influência no número de espermatozoides presentes nos testículos de mosquitos machos adultos irradiados durante a fase de pupa, os quais tiveram significativamente menos espermatozoides em comparação aos machos não irradiados,

enquanto essa diferença não foi observada para os machos irradiados durante a fase adulta (HELINSKI; PARKER; KNOLS, 2009).

Os testículos dos mosquitos são estruturas fusiformes emparelhadas, cada uma consistindo em um único folículo dividido em vários cistos. Cada cisto contém um clone de células germinativas, que eventualmente se desenvolvem em espermatozoides maduros (WANDALL; SVENDSEN, 1985). São órgãos que possuem atividade celular intensa e sofrem danos somáticos e germinativos, proporcional à dose de irradiação. Quando a irradiação acontece em fases mais tardias do desenvolvimento do inseto, os danos somáticos diminuem à medida que a taxa de divisão mitótica celular também reduz (HELINSKI; PARKER; KNOLS, 2009).

Durante o acasalamento, além da transferência dos espermatozoides, ocorre também a transferência de proteínas do fluido seminal (PFS's) para a fêmea em inúmeras espécies de insetos, incluindo *A. aegypti* (ALFONSO-PARRA et al., 2014). Esses fluídos transferidos junto com os espermatozoides são frequentemente responsáveis por mudanças comportamentais e fisiológicas de curto e longo prazo na fêmea (VILLARREAL et al., 2018). Essas proteínas causam mudanças nas fêmeas, conhecidas coletivamente como a resposta pós-acasalamento (RPA) (GLIGOROV et al., 2013). As RPAs incluem taxas aumentadas de ovulação e postura, armazenamento de espermatozoides, receptividade diminuída para machos em corte, além de mudanças na longevidade, alimentação e padrões de sono (AVILA et al., 2011; SIROT et al., 2008).

Portanto, a compreensão da biologia reprodutiva após irradiação em mosquitos vetores de importância médica, apresenta-se de grande importância para um melhor entendimento no processo de controle vetorial nas arboviroses (ALFONSO-PARRA et al., 2014; HELINSKI; HARRINGTON, 2013), uma vez que a técnica do inseto estéril vem sendo bastante usada no combate às superpopulações de mosquitos vetores, além de se mostrar ambientalmente mais segura. O presente trabalho avaliou os efeitos da irradiação no desenvolvimento corpóreo, no aparelho reprodutor, possíveis alterações morfológicas e moleculares durante a produção de espermatozoides e fertilidade de machos de *A. aegypti* de laboratório.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ARBOVIROSES IMPORTANTES À SAÚDE HUMANA

As arboviroses, doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes, são de grande importância para saúde humana em quase todo o mundo (GOULD; HIGGS, 2009). Todos os arbovírus acometem animais selvagens, muitos causam doenças que são transmitidas para os seres humanos e para animais importantes na agricultura, denominados como hospedeiros acidentais, também chamados hospedeiros incidentais (TROUPIN; GRIPPIN; COLPITTS, 2017). Dentre as arboviroses que provocam epidemias na maioria dos países com importância econômica para saúde humana, encontram-se dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela (WEAVER; REISEN, 2010). Os arbovírus infectam milhões de pessoas, anualmente, em todo o mundo, onde quase metade da população está em risco de infecção com essas ameaças (KAMAL et al., 2018). O mosquito *A. aegypti* é predominante na transmissão e disseminação desses vírus, que se originou na África e espalhou-se para as regiões neotropicais nos séculos XVII e XVIII (WEAVER; REISEN, 2010). No continente africano existem três famílias de vírus transmitidos por mosquitos que afetam seres humanos: os Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), Togaviridae (gênero *Alphavirus*) e os Bunyaviridae (principalmente *Orthobunyavirus*, mas com alguns outliers importantes, como o *Phlebovirus* Rift Valley Fever) (BRAACK et al., 2018).

Muitos fatores causaram a expansão das arboviroses, tanto animal quanto humanas, e um deles foi a expansão urbana tropical, resultando em um maior contato entre o homem e o mosquito *A. aegypti* (WEAVER; REISEN, 2010). Na urbanização a proliferação de larvas se dá pelo acúmulo de água em recipientes usados para armazenamento, dentro e ao redor das áreas habitadas, e em pequenos recipientes descartáveis jogados no lixo, colaborando para o surgimento de ciclos endêmicos permanentes de DENV urbano e do CHIKV, assim como também da transmissão sazonal do vírus da febre amarela (BRONZATO, 2015).

A recente invasão do *A. albopictus*, um vetor secundário de grande importância na transmissão de CHIKV e DENV, nas Américas, Europa e África, aumentou a transmissão urbana desses vírus em regiões tropicais e temperadas, tornando-as assim arboviroses de grande importância para a saúde pública (WEAVER; REISEN, 2010). Os aumentos demográfico e de circulação internacional de pessoas, bagagens e utensílios poderão servir como reservatórios para vetores, vírus e fontes infecciosas, além do contato entre humanos, animais silvestres infectados ou vetores silváticos e locais de reprodução e habitats para vetores, como *A. aegypti* e *A. albopictus* (BRAACK et al., 2018), quadro que pode atingir

maior gravidade com cerca de 83 milhões de pessoas sendo adicionadas à população mundial a cada ano, atingindo 9,8 bilhões de pessoas no ano de 2050, um crescimento que deverá continuar mesmo supondo que os níveis de fertilidade continuem a declinar. (UNITED NATIONS, 2013).

A filogenia indica que a origem ancestral dos Flavivírus transmitidos por mosquitos e carrapatos é da África e acredita-se que surgiram de vírus de mamíferos, inicialmente não vetorizados (GOULD et al., 2003; MOUREAU et al., 2015). Os Flavivírus são distintamente agrupados em vírus transmitidos por carrapatos, por mosquitos e um grupo de vírus não vetorizados ou não-reconhecidos (GOULD et al., 2003; MOUREAU et al., 2015; HOLMES; TWIDDY, 2003; HUANG et al., 2014). No ambiente natural, os Flavivírus transmitidos por *Aedes* spp. tendem a picar primatas e/ou humanos, estando associados ao desenvolvimento de doença hemorrágica. Os vírus transmitidos por *Culex* spp. por outro lado, picam aves e roedores selvagens e animais domésticos. Em contraste com o *Aedes* spp., muitos dos vírus de *Culex* spp. estão mais caracteristicamente associados à doença encefalítica em humanos (GOULD et al., 2001).

Existe a premissa que, assim como o vírus da Febre amarela, o vírus da Dengue teve sua origem na África e foi dispersado para a América no período da escravidão (GERMAIN et al., 1982; KRAEMER et al., 2015). DENV, conhecidamente, com distribuição central na Ásia, pode também ter sua origem histórica na África Ocidental (HOLMES; TWIDDY, 2003). Apareceu pela primeira vez nos Estados Unidos aproximadamente no mesmo período da Febre Amarela, podendo ter sido transportado nos mesmos navios negreiros junto com o mosquito *A. aegypti* (GOULD et al., 2001). Formalmente descrito no Japão em 1943 e no Havaí em 1945, a epidemia teve abrangência desde a Índia até as Ilhas do Pacífico, propagando-se pela Ásia-Pacífico até as Américas, na década de 1970, e África, em 1984 (MESSINA et al., 2014). Posteriormente se expandiu, principalmente, para países tropicais e subtropicais, causando grave morbidade e mortalidade (KRAEMER et al., 2015; SEMENZA et al., 2014).

DENV é um complexo composto por quatro sorotipos filogeneticamente e antigenicamente distintos, que causam dengue e dengue hemorrágica em humanos (HOLMES; TWIDDY, 2003). Seu principal vetor entre humanos são o *A. aegypti* e o *A. Albopictus*, vetorizando, respectivamente, em áreas urbanas e em áreas periurbanas e rurais (BENEDICT et al., 2007; YAMAR et al., 2005; SEMENZA et al., 2014; DHAR-CHOWDHURY et al., 2016).

O vírus da Febre Amarela também tem origem na África e possivelmente disseminado junto com o tráfico de escravos (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; HUANG et al., 2014). Em Barbado, no Caribe, após infecção de escravos, os superintendentes também foram infectados durante as épocas de surto nos anos de 1647, 1650 e 1690. Esses homens brancos foram para América do Norte, onde estabeleceram um novo foco, e a febre amarela foi difundida também na América do Sul (MCNEILL, 2010). Durante a construção do Canal do Panamá, aproximadamente 30.000 pessoas morreram, assim como também no período da guerra Hispano-Americana, aproximadamente 80% das forças americanas em Cuba contraíram a febre amarela (SPIELMAN; D'ANTONIO, 2001). Em condições silvestres africanas, a transmissão da febre amarela acontece principalmente por *A. africanus*, *A. furcifer/taylori*, *A. Luteocephalus*, *A. Metálico*, *A. Vittattus* e *A. Opok* (HUANG et al., 2014; GERMAIN et al., 1982). Na América do Sul foi estabelecido um ciclo silvestre envolvendo vários mosquitos *Haemagogus*, *Aedes* e *Sabethes* (HUANG et al., 2014). Não houve transmissão urbana significativa nas últimas décadas nesta parte do continente, porém os hospedeiros do reservatório silvestre na América do Sul são macacos-prego (*Cebus* spp.), Aranha (*Ateles* spp.) e Bugio (*Alouatta* spp.) (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007). Ao ser infectado, o primata florestal tem um período de viremia de 1 a 6 dias, período em que pode transmitir o vírus para o mosquito e também desenvolver imunidade para toda a vida. Na América do Sul e Central, os macacos e saguis que são infectados morrem. Ao invés de desenvolverem imunidade, há o extermínio dos primatas focais, fazendo com que aconteça o término das epizootias (MEEGAN et al., 1991). A febre amarela é transmitida de uma forma maciça entre os seres humanos pelo *A. aegypti* como uma doença doméstica (GUBLER, 2004).

O ZIKV foi registrado pela primeira vez na Floresta Zika, em Uganda, na África, a partir de um macaco sentinela Rhesus, colocado nessa floresta em 1947, e em um mosquito *A. africanus* em 1948 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Esse vírus permaneceu endêmico na África e na Ásia por décadas, se espalhando pelos Estados Federados da Micronésia, pela Polinésia Francesa, por uma série de ilhas do Pacífico, chegando ao Brasil em 2015 (HADDOW et al., 2012; JOUANNIC et al., 2016; LANCIOTTI et al., 2016; ZINSZER et al., 2017). Na África, o ZIKV foi mantido por meio de primatas e mosquitos *Aedes*, representando o ciclo silvestre do vírus. Em outros lugares, aparentemente, os ciclos silvestres não existem, mas a transmissão se dá através de humano-mosquito-humano, em ambientes urbanos empobrecidos, tendo como vetores primários o *A. aegypti* e o *A. albopictus* (PETERSEN et al., 2016). Atualmente, a principal e mais preocupante sequela do ZIKV em

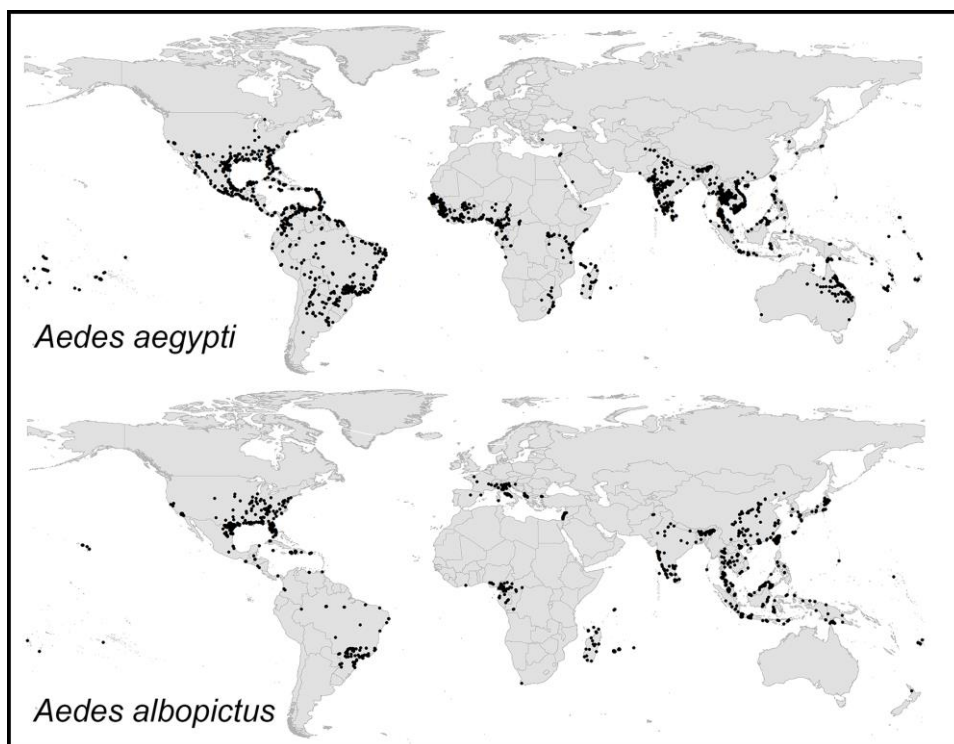
mulheres grávidas são as anomalias em bebês que vão desde deformidades oculares, cardíacas e neurológicas, como a microcefalia (PETERSEN et al., 2016).

Existe um grande grupo de vírus, transmitido por mosquitos, de grande importância médica, muito complexo na origem, dispersão, ecologia das espécies e membros, que é o gênero *Alphavirus*, da família dos *Togaviridae* (MCINTOSH et al., 1961). Diferentemente dos *Flavivírus*, os *Alfavírus* não têm relações evolutivas e ecológicas claras com grupos vetoriais específicos, eles são menos agrupados. Os mosquitos *Aedes* e *Culex*, juntamente com outros gêneros, tal como *Anopheles*, são vetores importantes para a sua transmissão (MCINTOSH et al., 1961).

O CHIV compõe o gênero *Alphavirus*, que foi diagnosticado pela primeira vez numa epidemia na Tanzânia em 1952 (WEAVER et al., 2016), havendo outros surtos subsequentes na África e Sudeste da Ásia em 1953 (POWERS et al., 2000; CAGLIOTI et al., 2013). Houve a reincidência nos anos 2000 e, com o surto, houve uma mutação no vírus e intensa multiplicação viral dentro do intestino médio dos mosquitos vetores, levando ao aumento na viremia dentro das glândulas salivares (ENSERINK, 2007; CAGLIOTI et al., 2013). A partir do ano 2004 houve surtos em escala global (TOWNSON; NATHAN, 2008; MOREIRA-SOTO et al., 2017) e, atualmente, se tornou uma ameaça à saúde pública (WEAVER; FORRESTER, 2015). Na África, os vetores silváticos importantes são os *A. africanus*, *A. furcifer*, *A. cordellieri* (JUPP, 1996; COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014), *A. taylori*, *A. neoafricanus* e *A. luteocephalus* (POWERS et al., 2000); em condições urbanas existem o *A. aegypti* e o *A. albopictus* como principais vetores (I-CHING et al., 2015); o *A. albopictus* é o mais importante vetor global para a infecção do Chikungunya (CHARREL; LAMBALLERIE; RAOULT, 2007), porém o *A. aegypti* tem maior impacto na infectividade (WEAVER; FORRESTER, 2015). Desde a disseminação na África para outras regiões, ciclos de endemia e epidemia têm sido registrados com *A. aegypti* e *A. albopictus*, transmitindo o vírus em um ciclo de humano-mosquito-humano, principalmente urbano (CAGLIOTI et al., 2013).

Segundo Kamal et al. (2018), existem diferenças na distribuição de ocorrência no mundo entre *A. aegypti* e *A. albopictus*. Geograficamente a distribuição de registros de *A. Aegypti* ocorreram na Ásia e nas Américas, com mais de 55%, principalmente no Brasil, Índia, Tailândia, México e Estados Unidos, enquanto que o *A. Albopictus*, a maioria dos registros ocorreu apenas em Taiwan, Estados Unidos e Indonésia, em mais de 67%. Essa distribuição é bem observada na Figura 1.

Figura 1 – Mapeamento de distribuição global de dois vetores arbovirais *A. aegypti* e *A. albopictus* em 2018.



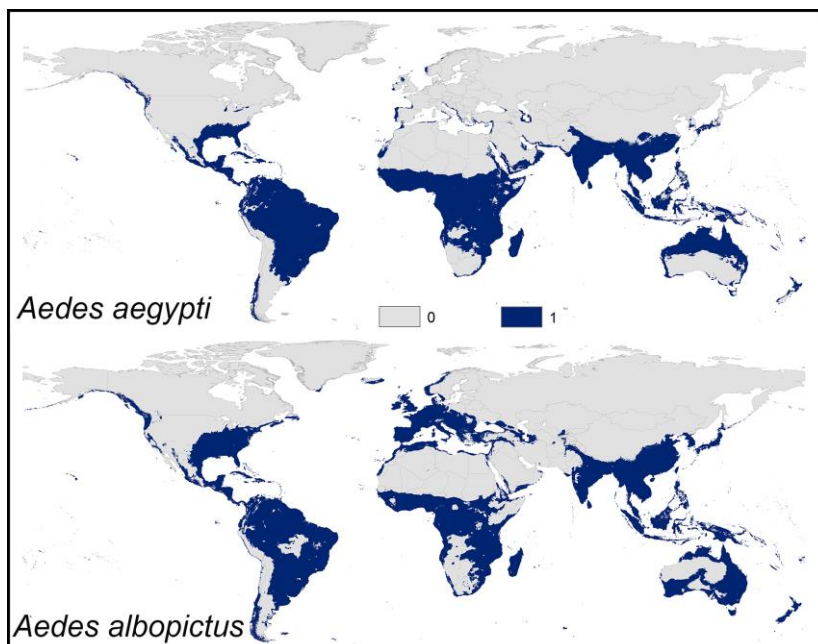
Fonte: Kamal et al. (2018).

A transmissão dos vírus pode ser horizontal, entre mosquitos, aves, seres humanos e outros vertebrados, como também vertical transgeracional. Em algumas espécies esses vírus infecciosos passam dos vetores adultos para os seus descendentes, como acontece com os mosquitos (ROSEN, 1988). O ovo raramente é infectado, aparentemente devido à presença do vírus só nos oviductos laterais e comuns, onde a contaminação poderia ocorrer. Nos Flavivírus, ovos são infectados por um mecanismo ainda não identificado totalmente, onde os folículos não estão envolvidos na infecção, mas o óvulo maduro é infectado durante a ovoposição (LEAKE, 1992). A transmissão vertical natural foi identificada no Nordeste brasileiro, na cidade de Fortaleza, em *A. aegypti* e *A. albopictus*, que foram criados a partir de larvas e pupas recolhidas em agregados familiares (MARTINS et al., 2012). No norte da Índia, aconteceu a transmissão vertical entre alfavírus do Chikungunya em *A. aegypti* (SINGH et al., 2016) e na Tailândia foi transmitida em condições experimentais para as gerações F5 e F6 dos *A. aegypti* e *A. albopictus* (CHOMPOOSRI, 2016).

Outra causa importante, além da transmissão através dos vetores, é a adaptação que os vírus e os vetores passam através de mutações, recombinação do segmento genômico e novas combinações de genes em cromossomos, fatores que contribuem para a ocorrência de doenças virais emergentes ou reemergentes (ELLIOTT, 2009). Os rearranjos efetuados pelos vírus

produzem novos vírus, epidemias, virulências, patologias, e pequenas mutações que afetam a suscetibilidade, aumento de eficiência ou mesmo ineficiência vetorial (WENGLER; WENGLER, 1993). Por exemplo, o CHIKV era transmitido, principalmente, por *A. aegypti* e atualmente é também transmitido por *A. albopictus* (WENGLER; WENGLER, 1993; VAZEILLE et al., 2007; GOULD; HIGGS, 2009). As mutações acontecem não somente nos vírus, mas também nos vetores. Os mosquitos, historicamente habitantes de florestas, passaram por adaptações e atingiram uma forma “domesticada”, amoldada à cidade. Como exemplo, o *A. aegypti*, que se espalhou por quase todas as partes do mundo e atualmente é o grande vetor das arboviroses (BROWN, 2011, MOORE et al., 2013). Outro exemplo de adaptação dos mosquitos é a resistência à tentativa de controle por inseticidas, amplamente observada em *A. aegypti* (ISHAK et al., 2015) e *A. albopictus* (MARCOMBE et al., 2014; ISHAK et al., 2015). Um dos fatores primordiais na contribuição de adaptação e reprodução de vetores e vírus são as alterações climáticas, as quais podem levar, conseqüentemente, a mudanças em aspectos geográficos (GOULD; HIGGS, 2009, VONESCH et al., 2016). Esses aspectos podem influenciar a distribuição dos mosquitos no mundo. Kamal et al. (2018) construíram uma previsão de distribuição do potencial atual dos mosquitos *A. Aegypti* e *A. Albopictus*, de acordo com as condições climáticas (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição atual dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* com base nas condições climáticas atuais. As áreas em azul marinho foram consideradas adequadas e as áreas em cinza foram consideradas como inadequadas.

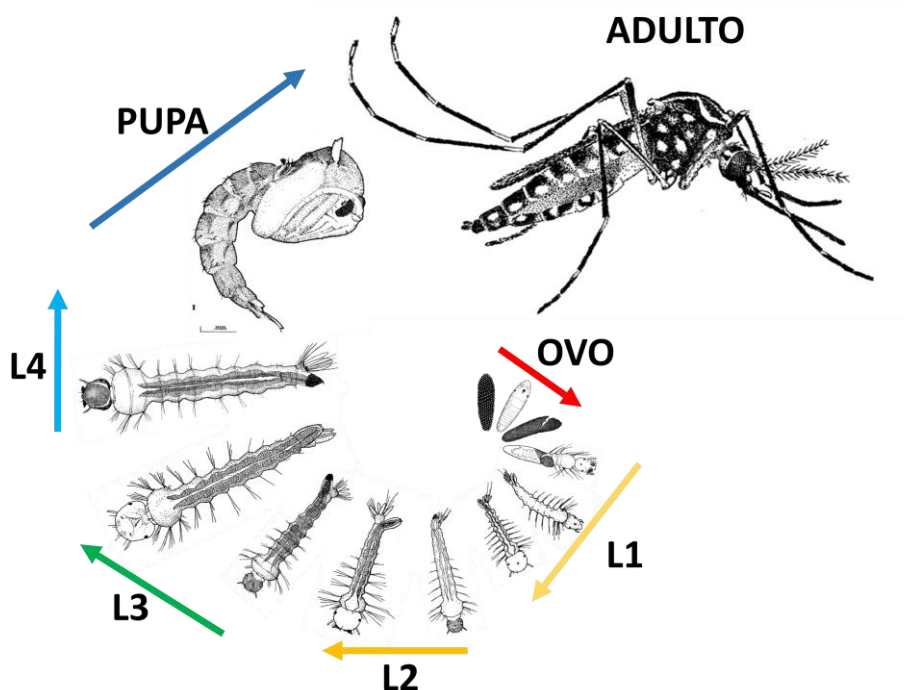


Fonte: Kamal et al. (2018)

2.2 *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762)

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é oriundo da África, tendo sido descrito inicialmente no Egito, possuindo distribuição em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A distribuição e a expansão geográfica são influenciadas por múltiplos fatores ambientais, sobretudo a temperatura (GLASSER; GOMES, 2002). O *A. aegypti* é um díptero da família Culicidae, pertencente à subfamília Culicinae, sua forma adulta apresenta coloração geralmente negra, com faixas branco-prateadas no tórax (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; BECKER et al., 2003). Apresenta um curto ciclo de vida que pode se completar no período de 15 a 30 dias em regiões tropicais e seu desenvolvimento compreende quatro estágios: ovo, larva, pupa e inseto adulto (Figura 3). O tempo de desenvolvimento das larvas varia em função da temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional de indivíduos presentes nos criadouros (CLEMENTS, 1992).

Figura 3 – Fases que compõem o ciclo biológico de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de Christophers (1960).

Nota: Em sentido horário: Ovo, larva (L1-L4), pupa e adulto alado.

Na forma de mosquitos adultos, machos e fêmeas buscam por fontes de carboidratos, essenciais ao seu metabolismo básico. Além disso, as fêmeas também necessitam de alimentação sanguínea para a produção de ovos. A maturidade sexual acontece aproximadamente 24h após a passagem para a fase adulta. Em geral, o comportamento sexual

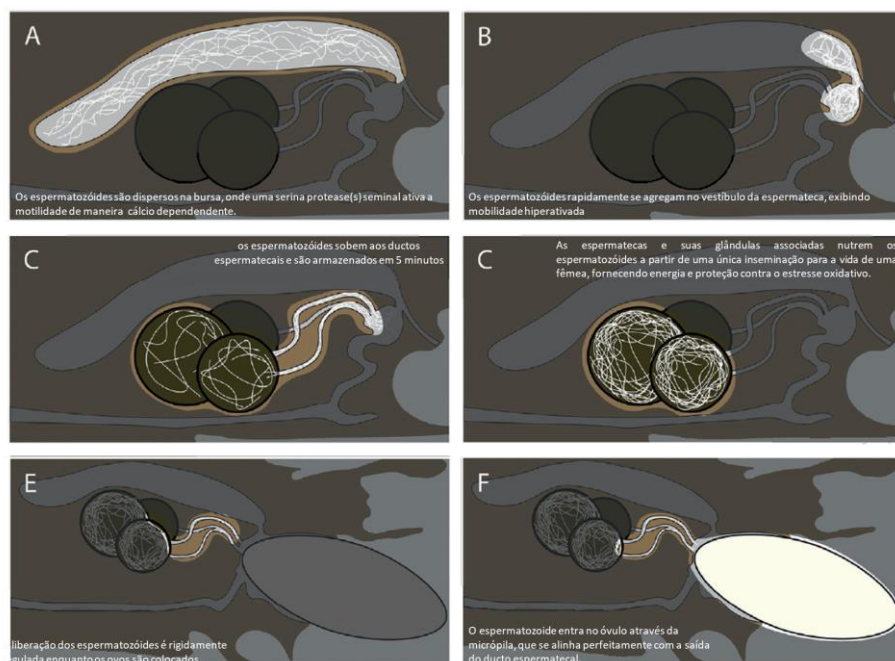
das fêmeas de *A. aegypti* é monândrica (uma única cópula) (YUVAL, 2006). Evidências mostram que o acasalamento torna a fêmea refratária à uma nova inseminação e desencadeia comportamentos posteriores, como digestão mais rápida da refeição de sangue (DOWNE, 1975) e aumento da oviposição (RAMALINGAM; CRAIG, 1976).

Além dos espermatozoides, os machos transferem fluidos seminais que produzem uma série de alterações fisiológicas e comportamentais nas fêmeas (ADLAKHA; PILLAI, 1975). Acredita-se que essas modificações tornam as fêmeas menos receptivas a uma segunda cópula, pelo menos no mesmo ciclo gonotrófico (AVILA et al., 2011). Outros acoplamentos com uma fêmea já acasalada podem ocorrer, mas tendem a não resultar em inseminação (GWADZ; CRAIG JR; HICKEY, 1971). As proteínas das glândulas acessórias masculina (PGAm's), também conhecidas como proteínas da glândula reprodutora masculina (PGRm's), são componentes importantes do fluido seminal que são transferidos juntamente com o espermatozoide durante a cópula, afetando a fisiologia e o comportamento da fêmea (VILLARREAL et al., 2018). Essas proteínas e peptídeos pertencem a várias categorias funcionais diferentes e são reconhecidamente muito importantes na fertilização de insetos, porque estão relacionados a uma variedade de funções no trato reprodutivo feminino (GWADZ; CRAIG JR; HICKEY, 1971; HELINSKI et al., 2012; DUVALL et al., 2017; VILLARREAL et al., 2018). As fêmeas são estimuladas a aumentar a produção de ovos, taxa de ovulação e armazenamento de espermatozoides, bem como reduzir a receptividade sexual, além de alterações no comportamento alimentar e na longevidade (JUDSON, 1967; WALLIS; LANG, 1956). De fato, a inseminação causa muitas mudanças na expressão gênica feminina (MACK; PRIEST; PROMISLOW, 2003) e um grande número respostas pós-acasalamento podem ser observados, mesmo quando a cópula acontece com machos sem espermatozoides, destacando o importante papel das proteínas da PGRm's (MEUTI; SHORT, 2019).

Os machos transferem espermatozoides e fluidos seminais diretamente para dentro da bursa in seminalis, um órgão parecido com um saco, dentro do gonotrema, do qual sai uma abertura distal da vagina, comunicando-a com o meio externo (GIGLIOLI, 1963; SPIELMAN, 1964). Esse órgão funciona como um local de reserva temporário para espermatozoides. Após um atraso de cerca de 40 segundos (SPIELMAN, 1964; JONES; WHEELER, 1965), os espermatozoides começam a se deslocar desse órgão por ductos estreitos para uma a três espermatecas. As espermatecas são reservatórios quitinosos, esféricos, nos quais os espermatozoides são armazenados a longo prazo. Os espermatozoides são mantidos nessas cápsulas durante toda a vida de uma fêmea, nutridos por células glandulares adjacentes às espermatecas (CLEMENTS; POTTER, 1967; PASCINI;

RAMALHO-ORTIGÃO; MARTINS, 2012, 2013). Em última análise, os espermatozoides viajam de volta pelos mesmos ductos, fertilizam os óvulos que passam pelo oviduto comum e saem pelo gonotremo (Figura 4).

Figura 4 – Trato reprodutivo de *Aedes aegypti* fêmea durante a inseminação



Fonte: Adaptado de Degner e Harrington (2016).

Nota: Modelo quadro a quadro dos espermatozoides através do trato reprodutivo de *Aedes aegypti* fêmea desde a inseminação (A) até a fertilização (F).

Fêmeas, uma vez inseminadas, produzem uma quantidade abundante de ovos férteis, desde que alimentadas com sangue. A atividade hematofágica é diurna e, após o repasto sanguíneo, a fêmea procura no ambiente locais para repouso, enquanto realiza a digestão sanguínea. Cerca de 90 a 120 ovos podem ser produzidos por uma fêmea em cada ciclo de oviposição. Os ovos são depositados de forma individual nas paredes internas dos recipientes, próximos à lâmina d'água (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Em condições ambientais adversas, os ovos podem entrar em quiescência (dormência), podendo permanecer viáveis no ambiente por períodos superiores a um ano (OLIVA et al., 2018). Este último aspecto é de grande importância, por representar a principal forma de permanência e dispersão passiva de *A. aegypti* no ambiente. Além disso, as fêmeas tendem a distribuir pequenos grupos de ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico em mais de um criadouro, comportamento que potencializa sua dispersão e dificulta as ações de controle (BRAGA; VALLE, 2007; REITER; AMADOR; COLON, 1991).

Essa colonização em vários habitats, promove um rápido crescimento populacional, aliada ainda à sua elevada fecundidade e curto ciclo de desenvolvimento pós-embrionário

(REGIS, et al., 2013). Tais características os definem como insetos “r-estrategistas”, cuja sobrevivência da população tem como base a capacidade de colonização de habitats instáveis, aliada a uma elevada fecundidade/fertilidade, gerando acentuadas flutuações de densidade populacional (SCHOFIELD, 1991).

2.3 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR DE *Aedes aegypti* MACHOS

Estudos anatômicos e histológicos dos órgãos genitais em insetos são fundamentais para o conhecimento de sua função e, assim, fornecem uma base para pesquisas anatômicas e fisiológicas (NATVIG, 1948; CHRISTOPHERS, 1960). A estrutura dos órgãos genitais de insetos é muito variada, portanto estudos morfológicos intensivos são necessários para auxiliar na resolução de problemas na discriminação de homologias e no rastreamento do desenvolvimento evolutivo (WENSLER; REMPEL, 1962).

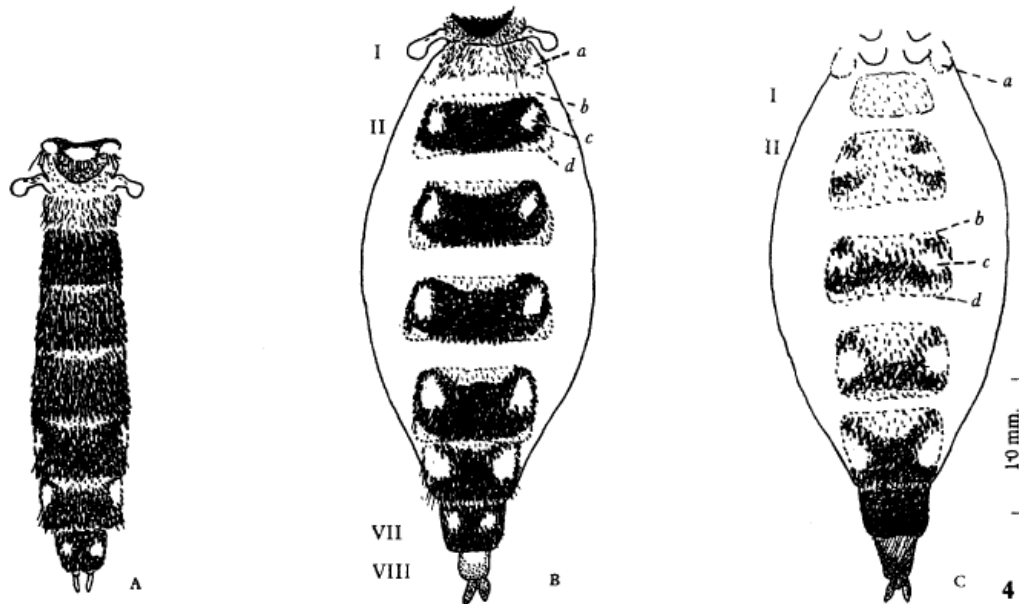
A anatomia do sistema reprodutor externo e interno dos mosquitos machos em geral, e do macho *A. aegypti* em particular, tem recebido bastante atenção no estudo de todos os componentes e suas inter-relações, mesmo para uma única espécie (NATVIG, 1948; CHRISTOPHERS, 1960).

O abdômen dilatado do adulto recém-emergido *A. aegypti* se afila posteriormente. A membrana pleural pálida, acinzentada e não selada é visível e se afunila até o final do oitavo segmento abdominal. O abdômen é composto por nove segmentos ou urômeros facilmente visíveis (HODAPP; JONES, 1961). Os primeiros sete segmentos são aproximadamente do mesmo comprimento, mas diminuem gradualmente em diâmetro. O oitavo segmento é visivelmente menor que o sétimo; e o nono segmento (ou genital) é bastante reduzido em tamanho, embora dê origem a dois apêndices maiores e complexos. O décimo e décimo primeiro segmentos abdominais (segmentos pós-genitais) são peças altamente modificadas embutidas na região membranosa posterior ao nono segmento (HODAPP; JONES, 1961). Essas características podem ser observadas na Figura 5.

No mosquito individual, o oitavo ao décimo primeiro segmento abdominal constitui um terminalium (o termo plural é terminalia, como usado pela primeira vez e corretamente definido por Freeborn (1924), no qual o termo plural é frequentemente usado como se fosse um único substantivo). Essa definição leva em conta o fato de que o oitavo segmento abdominal sofre rotação (CHRISTOPHERS, 1915). As cerdas que se tornam ligeiramente mais longas e definitivamente mais numerosas, também estão presentes nas margens posteriores do primeiro ao oitavo tergitos e do primeiro ao sétimo esternitos. Como o terminalium do mosquito macho gira 180° durante o primeiro dia de vida adulta, nas

descrições, os termos dorsal e ventral se referem a estruturas como são encontradas no mosquito macho recém-emergido, com terminalium não rotacionado, a menos que especificado em contrário (HODAPP; JONES, 1961).

Figura 5 – Abdômen de *Aedes aegypti*

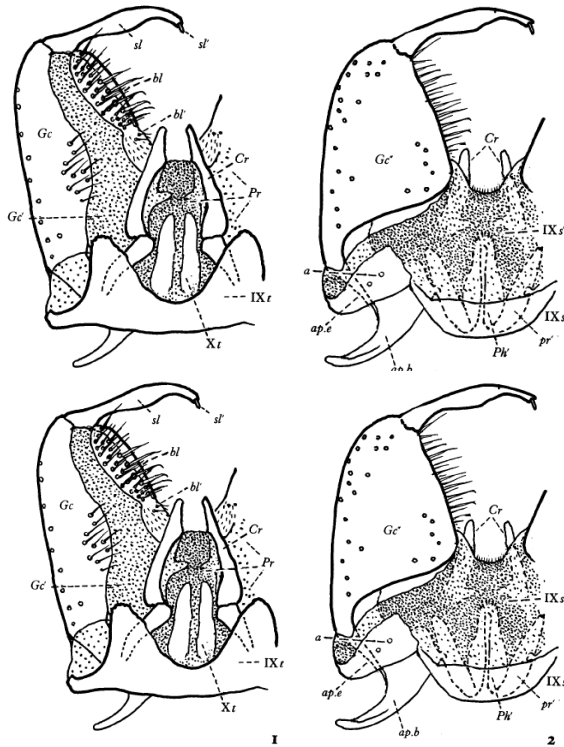


Fonte: Adaptado de Christophers (1960).

Nota: Abdômen de fêmea de *Aedes aegypti*. **A.** Como visto em vista dorsal em fêmea não ingurgitada; **B.** visão dorsal de tergitos como visto em fêmeas ingurgitadas; **C.** visão dorsal de esternitos como visto em fêmeas ingurgitadas; **a** mancha prateada lateral em tergito I; **b**, banda branca basal; **c**, ponto prateado nos lados de tergito e esternito; **d**, banda pálida apical.

Da porção ventral do nono segmento abdominal surgem estruturas de considerável complexidade. Os dois maiores anexos foram referenciados como claspers (THEOBALD, 1907), hypopygium ou genitalium (CRAMPTON, 1920), embora tenha ficado claro há algum tempo que eles são homólogos aos parameres (literalmente pedaços laterais) de outros insetos (CRAMPTON, 1942; SNODGRASS, 1959). As duas pequenas peças negras esclerotizadas, que são facilmente visíveis através do lobo membranoso ventral mediano do nono segmento do mosquito macho vivo, constituem o órgão intromissivo e são referidos como aedeagus (EDWARDS, 1920; SNODGRASS, 1959) ou phallosome (FREEBORN, 1924; CHRISTOPHERS, 1960), demonstradas esquematicamente na Figura 6.

Figura 6 – Terminalia de macho de *Aedes aegypti*

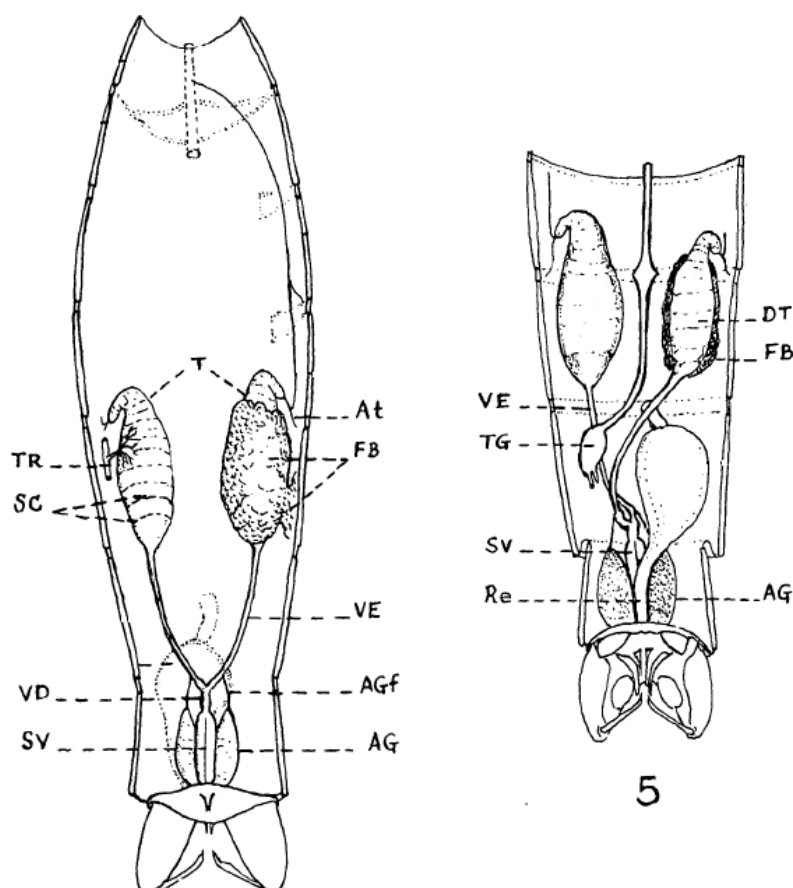


Fonte: Adaptado de Christophers (1960).

Nota: Representação esquemática do nono segmento abdominal do macho *Aedes aegypti*. **1.** vista dorsal terminália de macho de *Aedes aegypti*; **2.** Vista ventral do mesmo. **A**, porção terminal expandida do braço do nono tergite; **IXs'**, porção membranosa do nono esternito; **IXs''**, porção apodematosa esclerotizada do mesmo; **3.** Vista externa lateral. Rotulado como para 2; **4.** Vista interna lateral, com a gonocóxite próxima removida; Letras: **ap.b**, apodema basal; **ap.e** apodema externo; **bl**, lobo basal; **bl'**, porção proximal da dobra carregando dois cabelos; **Cr**, porção terminal da esclerito ventral de proctiger (provavelmente cercus); **Gc**, gonocóxite; **Gc'**, área membranosa da superfície dorsal da mesma; **Gc''**, superfície ventral esclerótica da gonocóxite; **Ph**, falosoma; **Ph'**, o mesmo visto atrás da membrana; **Pr**, proctiger; **pr**, paramere; **sl**, estilo; **sl'**, apêndice do estilo; **IXs**, **Xs**, respectivos esternitos; **IXt**, **Xt**, respectivos tergites.

Dorsolateralmente, no sexto segmento abdominal, estão localizados os testículos de *A. aegypti*, com suas extremidades estendendo-se até a margem posterior do quinto segmento. Nos machos recém-emergidos, os testículos podem ser tão grandes que se estendem do 6º para a margem posterior do 4º segmento abdominal. Testículos de mosquitos machos adultos mais velhos são pequenos e encontrados apenas no 6º segmento; eles definitivamente não ficam dilatados com a idade na vida adulta (HODAPP; JONES, 1961). Nos machos recém-emergidos, os testículos são normalmente do mesmo tamanho e situados quase identicamente em lados opostos do corpo (Figura 7). Após a rotação do terminalium, um testículo é deslocado para uma posição mais posterior e é notoriamente menor do que o outro no mesmo indivíduo (CHRISTOPHERS, 1960).

Figura 7 – Sistema reprodutor interno de macho de *Aedes aegypti*



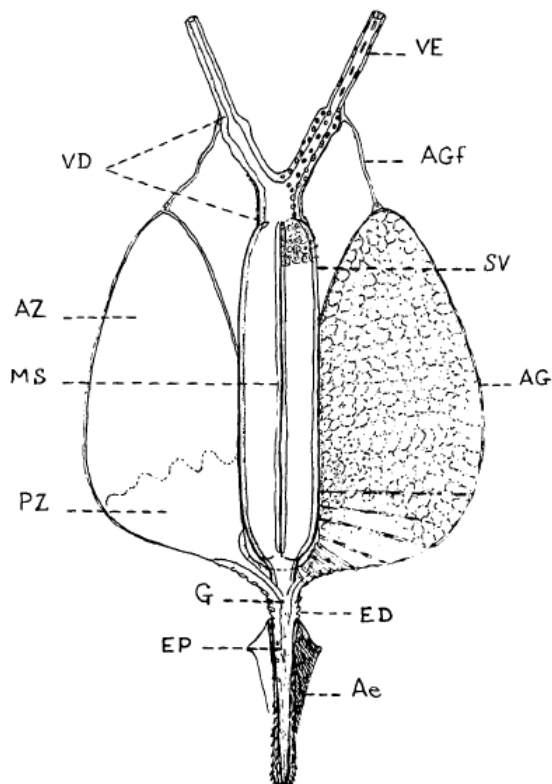
Fonte: Adaptado de Hodapp e Jones (1961).

Nota: A. Vista ventral do sistema reprodutor interno de adultos do sexo masculino *Aedes aegypti* antes da rotação do terminália, mostrando o testículo (T), corpo adiposo do testículo (FB), traqueia do testículo (TR), compartimento testicular (SC), vas efferens (VE), vas deferens (VD), vesículas seminais (SV), glândula acessória (AG) e filamento da glândula acessória (AGf). B. Vista ventral do sistema reprodutivo interno de *Aedes aegypti* macho adulto após uma rotação no sentido anti-horário da terminália, mostrando testículos deslocados (DT), gânglio abdominal terminal (TG), vas eferentes (VE), vesículas seminais (SV), glândula acessória (AG) e reto (Re).

Os órgãos reprodutivos internos no macho consistem em dois testículos, um ducto longo e fino (vasa efferentia) passando de cada testículo para uma estrutura mediana em forma de frasco (vasa deferentia), que desemboca em duas vesículas seminais longas localizadas ventralmente e que se fundem no oitavo segmento abdominal. Os testículos de adultos recém-emergidos de *A. aegypti* têm três regiões claramente definidas: (a) zona anterior demarcada, hialina, lateralmente curvada; (b) uma zona central maior, mais longa e dilatada; e (c) uma zona terminal grande, semelhante a um cálice. As zonas intermediária e terminal têm cor acastanhada distinta com luz transmitida, que é devido ao seu conteúdo interno e não ao pigmento, dentro da bainha testicular. A parede do testículo de *A. aegypti* é uma bainha muito fina e incolor que envolve completamente o órgão (WENSLER; REMPEL 1962). Quando os testículos são examinados em bloco, corados com hematoxilina, a estrutura

celular da túnica é obscura, embora núcleos redondos ou ovoides possam ser distinguidos nela, enquanto em sistemas completos frescos, não corados, os núcleos geralmente não são visíveis (CHAPMAN, 1998). Durante o primeiro dia da vida adulta, o compartimento terminal do testículo se abre para um ducto longo, reto, posterior e ventralmente direcionado, denominado *vas efferens* (HODAPP; JONES, 1961). De acordo com Snodgrass (1935), os *vas efferens* de paredes relativamente finas juntam-se muito abruptamente a uma porção bem definida, de paredes espessas e curtas do trato reprodutivo, denominada *vas deferens*. Após uma curta distância, esses dois ductos de paredes espessas se unem para formar um ducto mediano comum que desemboca em duas vesículas seminais longas e ventralmente localizadas, que se fundem no oitavo segmento abdominal. Lateralmente às vesículas seminais, encontram-se as glândulas acessórias em forma de sacos e o ducto ejaculador, que é uma curta passagem que leva à abertura genital (PRASHAD, 1916), como esquematizado na Figura 8.

Figura 8 – Sistema reprodutor interno de macho de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de Hodapp e Jones (1961).

Nota: Vista ventral semidiagramática da porção posterior do sistema reprodutor interno de um *A. aegypti* adulto recém-emergido, mostrando detalhes dos *vas efferens* (VE), *vas deferens* (VD), vesículas seminais (SV), divisão mediana das vesículas (MS), glândulas acessórias (AG), filamento da glândula acessória (AGf), zona anterior da glândula acessória (AZ), zona posterior da glândula acessória (PZ), região do gonópore (G), ducto ejaculatório (ED), endófalo (EP) e edeago (Ae).

2.4 ALTERNATIVAS AO CONTROLE DE INSETOS: UMA BREVE HISTÓRIA DA TÉCNICA DO INSETO ESTÉRIL, CONCEITO, MÉTODO E APLICAÇÃO

O final do século XIX foi marcado por grandes descobertas científicas, entre elas a radioatividade e os raios X. Esse fato mudou o pensamento científico da época, pois acreditava-se que o átomo era algo impenetrável e imutável (NAVARRO et al., 2008). A partir disso, o uso das radiações ionizantes passou a ser aplicado em diversas áreas (MOULD, 1993).

Runner (1916) demonstrou os primeiros efeitos da radiação ionizante em insetos, no coleóptero *Lasioderma serricorne*, tornando-os incapazes de se reproduzir (MASTRANGELO; WALDER, 2011). Muller (1927) demonstrou que a radiação ionizante provocava mutações letais na mosca *Drosophila melanogaster*, sendo uma das principais consequências a infertilidade nas fêmeas.

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* (KLASSEN; CURTIS, 2005). A TIE proposta em 1950 por Bushland e Knippling, compreende a criação massiva de insetos machos de uma determinada espécie, seguida de esterilização e liberação. Dessa forma, machos estéreis copulam com fêmeas selvagens e a prole gerada se tornará inviável. Essa é uma técnica considerada espécie-específica, não envolvendo outros organismos (BUSHLAND, 1960; KNIPLING, 1955; ALPHEY 2002; DYCK et al., 2005; OLIVEIRA; CARVALHO; CAPURRO, 2011; PHUC et al., 2007; PAPATHANOS et al., 2009; WILKE et al., 2009).

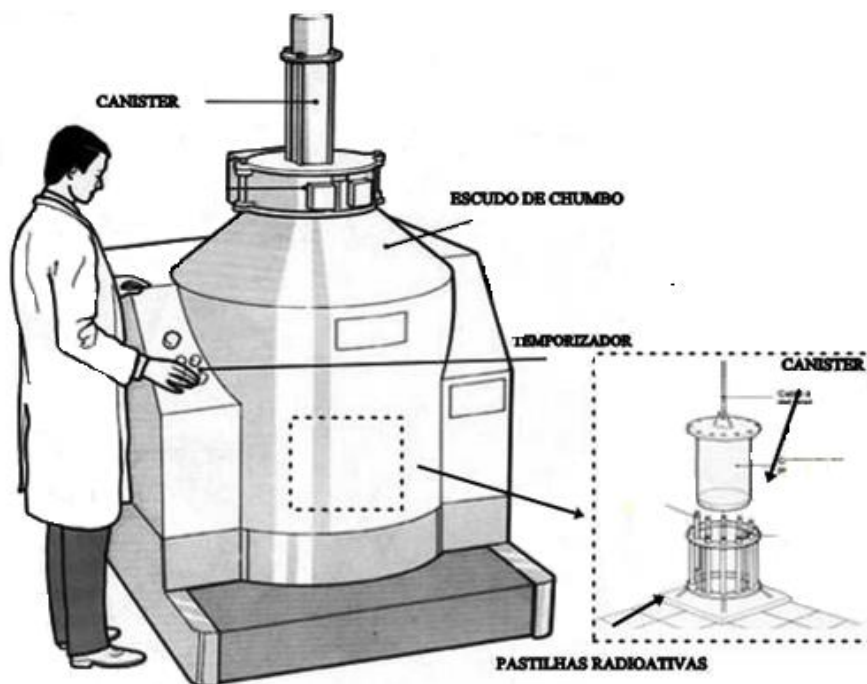
Nos anos seguintes, a ideia de introduzir a esterilidade em insetos foi amplamente difundida no mundo. Um estudo publicado por Bushland e Hopkins (1953) descreveu os resultados do uso de radiação ionizante (raios – X) em pupas macho de *C. hominivorax*, que apresentavam morfologia normal na fase adulta, porém, quando copulavam com fêmeas virgens, as mesmas não geravam ovos férteis.

Em 1954, na ilha de Curaçao, Knippling realizou a liberação de pupas irradiadas de *C. hominivorax*, com frequência de 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%. Essa atividade foi mantida por 14 semanas, até obter um grau satisfatório de eliminação do vetor (KLASSEN; CURTIS, 2005).

Com o tempo, a TIE foi direcionada a outras espécies e esses estudos contribuíram para a integração definitiva da técnica em programas de controle vetorial. A TIE é considerada uma técnica ambientalmente segura, pois não envolve outros organismos e não gera resíduos tóxicos, além de ser compatível com outros meios de controle vetorial (MUBARQUI et al., 2014). As radiações ionizantes utilizadas são geralmente radiação gama e raios X. Como fonte radioativa, são utilizados radioisótopos, como o Cobalto 60, e a dose utilizada é calculada através de irradiadores que determinam a taxa de dose (BAKRI; MEHTA; LANCE, 2005). O uso de radiação inclui vantagens como: (i) O aumento de temperatura durante o processo é insignificante; (ii) insetos estéreis são liberados imediatamente, após a emergência na fase adulta; e (iii) a radiação tem alto poder de penetração para atravessar materiais. (BAKRI; MEHTA; LANCE, 2005).

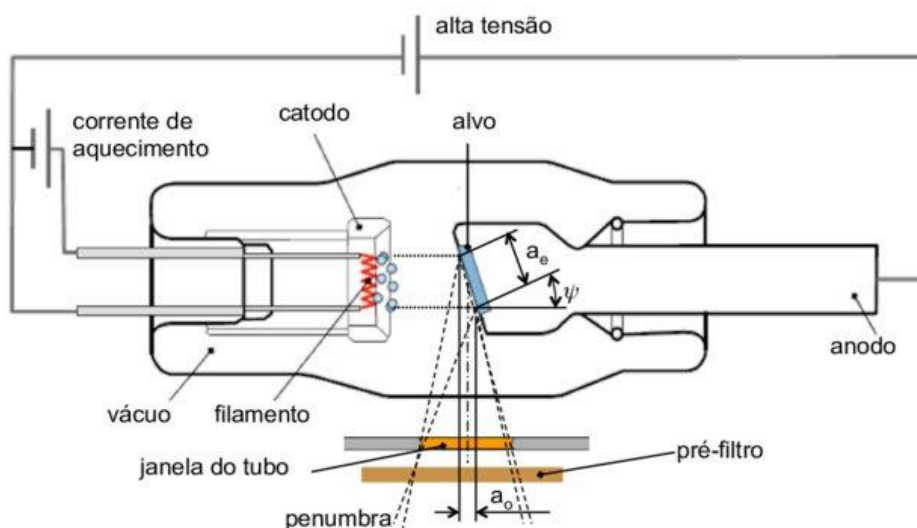
Historicamente, a TIE baseia-se na radiação ionizante para induzir a esterilidade no macho libertado (KNIPLING, 1955; DYCK et al., 2005). O projeto de TIE mais bem-sucedido e conhecido é a erradicação do New World Screwworm *Cochliomyia hominivorax* Coquerel dos EUA, América Central (GRAHAM, 1985) e – durante um surto em 1989 – Líbia (LINDQUIST et al., 1990). Outro exemplo é a erradicação da mosca tsé-tsé *Glossina austensi* Newstead, da ilha de Zanzibar (VREYSEN et al., 2000). Projetos em andamento da TIE estão ocorrendo contra a mosca da fruta do Mediterrâneo (medfly) *Ceratitis capitata* (Wiedemann) na América Latina e Central, Austrália, partes do sul da Europa e África do Sul (ROBINSON, 2002). O México tem um histórico de uso bem-sucedido da TIE para o controle de pragas veterinárias, como a moscas-varejeiras *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (VARGAS-TERÁN; HOFMANN; TWEDDLE, 2005) e pragas de insetos agrícolas, como moscas da fruta (ENKERLIN, 2005). Consequentemente, o país abriga uma das maiores instalações de produção de insetos estéreis do estado de Chiapas, no sul do México, para uso na Califórnia, Guatemala e México (GUTIÉRREZ et al., 2010). Outras pragas visadas como alvos para a impelmentação da TIE incluem a mosca de fruta mexicana, *Anastrepha ludens* Loew, no sul dos EUA e México (TOLEDO et al., 2004), a mosca do melão *Dacus cucurbitae* (Coquillett), no Japão (ITO et al., 2003), a mosca da cebola *Delia antiqua* Meigen. Na Holanda (TICHELER et al., 1974; HELINSKI; EL-SAYED; KNOLS, 2006), a Traça-da-maçã *Cydia pomonella* (Linnaeus), na Colômbia Britânica (BLOEM; BLOEM; FIELDING, 1997), e a lagarta rosada *Pectinophora gossypiella* (Saunders), na Califórnia (LINDQUIST et al., 1990).

Figura 9 – Irradiador de armazenamento a seco e seus componentes



Fonte: Adaptado de IBTEN (2013).

Figura 10 – Representação esquemática de um tubo de raios X



Fonte: Adaptado de Schmitt, Dietrich e Pollmanns (2008).

No caso da utilização da TIE em mosquitos vetores, para *A. alpopicutus* a utilização de doses entre 30-40 Gy em estudo de campo aumentou a taxa de esterilidade em machos com redução significativa na densidade de ovos (BELLINI et al., 2013). Exposições de pupas de *A. alpopicutus* levaram à manutenção da produção de ovos em fêmeas acasaladas com machos irradiados com doses entre 40-60 Gy, com consequente nulidade nas taxas de eclosão de ovos (BALESTRINO et al., 2010). O estudo desenvolvido por Bellini et al. (2013) também apresentou alta taxa de esterilidade entre os grupos irradiados com dose de 50 e 60 Gy. Mais

recentemente, o estudo desenvolvido por Bond et al. (2019) observou que machos de *A. aegypti* irradiados com 50 Gy apresentaram uma fertilidade próxima de zero.

A TIE moderna, no entanto, também utiliza tecnologias recentes de biologia molecular, como organismos transgênicos e paratransgênesis, para impedir a reprodução de insetos. Paratransgênesis inclui a manipulação de organismos simbioses, tais como *Wolbachia*, presentes na espécie-alvo para induzir esterilidade (RICCI et al., 2012). O fenótipo mais comum associado à infecção por *Wolbachia*, em insetos, é a incompatibilidade citoplasmática (IC), uma forma de falha reprodutiva pós fecundação. Não há a descondensação correta dos cromossomos paternos, ocasionando a fusão com os cromossomos maternos antes da primeira divisão mitótica (SINKINS, 2004). Esse fenômeno causa mudanças estruturais na cromatina, ocasionando a morte do embrião (EL-SONBATY; GABARTY; IBRAHIM, 2016). Apesar das *Wolbachia* spp. estarem presentes em 40% de todas as espécies de insetos (ZUG; HAMMERSTEIN, 2012), elas não são endossimbiontes naturais de *A. aegypti*.

Pesquisas recentes levaram ao desenvolvimento da linhagem dessa espécie transfectadas com *Wolbachia*, *wMel*, refratária à infecção por vírus Dengue (WALKER et al., 2011). Apesar de não ser esperada a eliminação da presença de *A. aegypti* em campo, a substituição levará, ao longo do tempo, a uma redução do número de casos de infecções (DUTRA et al., 2015). O sistema genético-molecular, também conhecido como sistema RIDL (Release of Insects with Dominant Lethality), é um dos métodos de esterilização mais recente utilizado. Esse 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 esse gene letal para prole, impedindo o indivíduo de alcançar a fase adulta (OLIVEIRA; CARVALHO; CAPURRO, 2011).

No entanto, o controle biológico do *Aedes*, especialmente nos países em desenvolvimento, tem constituído um importante desafio, mesmo considerando-se as situações em que os recursos destinados ao controle do vetor sejam apropriados para a implementação de programas, muitas vezes não se tem alcançado sucesso (ZARA et al., 2016). Aspectos relacionados aos problemas de infraestrutura das cidades, tais como baixas coberturas na coleta de lixo e intermitência no abastecimento de água, são fatores que comprometem a efetividade dos métodos tradicionais de controle do *Aedes* (COELHO, 2008). Dessa forma, a integração de diferentes estratégias de controle vetorial compatíveis e eficazes, considerando as tecnologias disponíveis e as características regionais, parece ser um método

viável para tentar reduzir a infestação dos mosquitos e a incidência das arboviroses transmitidas por eles (ZARA et al., 2016)

Em face do cenário de surtos e epidemias de Dengue, e mais atualmente de Zika e chikungunya, várias estratégias de controle do *A. aegypti*, com ênfase em inovações tecnológicas promissoras, vêm sendo implementadas para utilização no Brasil (ZARA et al., 2016). A partir de 1996, o Ministério da Saúde colocou em prática o Plano de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa), que previa um modelo descentralizado, com a participação das três esferas de governo, cujo objetivo foi a redução dos casos de dengue hemorrágica. O PEAa não conseguiu a necessária atuação multissetorial, havendo insucesso na contenção do crescimento dos casos de dengue e pelo avanço da infestação do *A. aegypti* (BRAGA; VALLE, 2007). Em 2001, o governo desistiu da meta de erradicar o mosquito e passou a considerar o controle do vetor, com a implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), priorizando ações em municípios com maior transmissão de dengue. Em 2002, o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) foi elaborado em função do aumento do risco de epidemias, ocorrência de casos graves de dengue e reintrodução e rápida disseminação do sorotipo 3 no país (BRAGA; VALLE, 2007; FIGUEIRÓ, 2010).

No Brasil, a tecnologia RIDL, voltada à supressão populacional, já vem sendo testada por empresas como a Moscamed¹ e possui resultados importantes em dois bairros de Juazeiro (BA) – Mandacaru e Itaberaba, onde foi registrada uma redução de 90% da população de *A. aegypti* em seis meses.

E pela primeira vez no país, a aplicação do *Bacillus thuringiensis israelensis* (Atomização-Bti) e a técnica do inseto estéril (TIE) foram integradas para o controle biológico, mecânico e genético do mosquito *A. aegypti* na Ilha de Fernando de Noronha (FN) (03°54'S e 32°25'O), localizada a 545 km da costa do Recife, estado de Pernambuco, Brasil. Além da Ilha, foi trabalhado um estrato de 900 imóveis no bairro da Várzea/Recife (8°2'S e 34°57'O), Pernambuco (DE MELO SANTOS et al., 2017). As duas primeiras etapas, consideradas precursoras da implantação da TIE, revelaram a eficácia da radiação gama para a esterilização dos machos, sem haver um comprometimento significativo da sua competitividade para o acasalamento (LIMA, 2015).

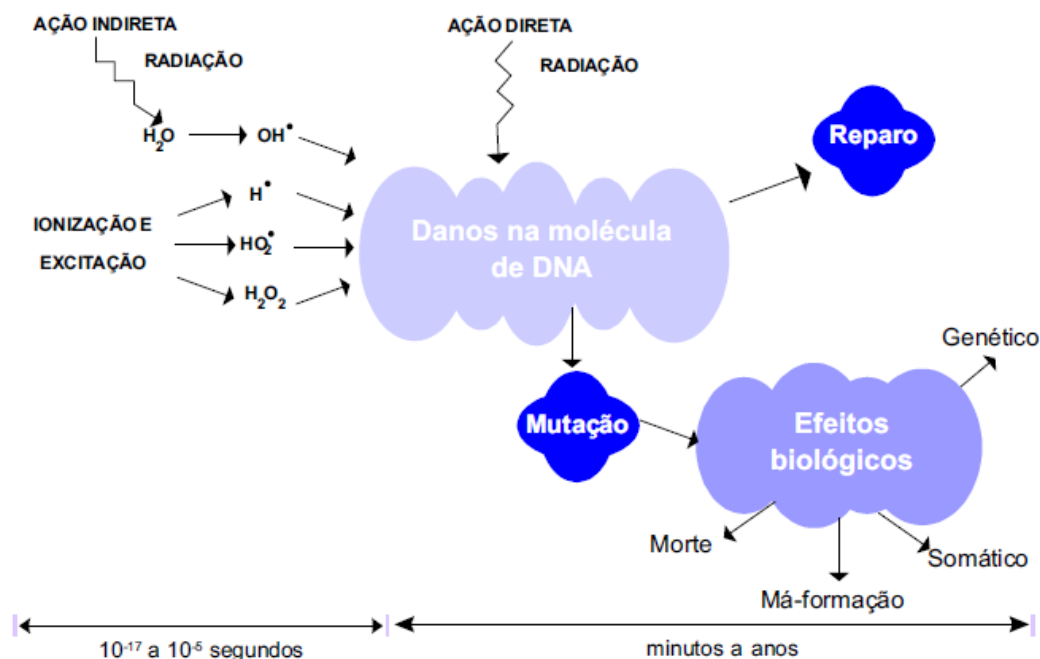
¹ BIOFÁBRICA MOSCAMED BRASIL. Projeto Aedes Transgênico. Disponível em: <http://www.moscamed.org.br/2012/moscamed.php>.

2.5 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

Raios-X, raios gama e parte superior do ultravioleta (UV) –10 a 125 nm – do espectro eletromagnético (EMS) constituem as radiações ionizantes (RI). A parte inferior do UV (<10 nm) de EEM, tais como, luz laser, infravermelho, micro-ondas e ondas de rádio são radiações não ionizantes (não-RI). Partículas alfa, beta, múons, mésons, pósitrons, nêutrons e outras partículas que constituem os raios cósmicos secundários são as partículas subatômicas típicas da radiação ionizante (ISLAM, 2017). A RI, em qualquer dose, após um processo radiolítico, pode causar ruptura direta e/ou indireta de estruturas atômicas, levando a alterações químico-biológicas em células vivas (HALL; GIACCIA, 2006). Partículas alfa, nêutrons e radiação gama altamente energética ($> \sim 20$ MeV) são responsáveis por causar a transmutação nuclear via ativação de nêutrons, absorção alfa e vias de fotodesintegração (ISLAM, 2017).

A água (H_2O) constitui aproximadamente 80% das células em um sistema biológico. A radiólise da H_2O por exposição à RI resulta na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), H_2 e radicais livres como hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e hidrogênio singlete ($\text{H}\bullet$). Este último converte-se rapidamente em radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radicais per-hidroxila ($\text{HO}_2\bullet$) (STERNICZUK; BARTELS 2016), enquanto radicais orgânicos ($\text{R}\bullet$) e radicais peróxi ($\text{RO}_2\bullet$) também são formados pela abstração do hidrogênio (H) e uma reação rápida com oxigênio molecular (O_2), respectivamente (AMORATI et al., 2016). A abstração de $\text{H}\bullet$ pela $\text{RO}_2\bullet$ causa peroxidação lipídica e inativação de moléculas de proteína (BARAIBAR et al., 2012). Caso contrário, H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, na presença de íons de metais redox catalíticos (principalmente íons de ferro e cobre), levam à produção de radicais $\bullet\text{OH}$ via reações de Fenton e Haber-Weiss (ATTRI et al., 2015). Possíveis eventos radiolíticos estão resumidos na Figura 11.

Figura 11 – Consequências da irradiação da molécula de DNA



Fonte: Nouailhetas (2005).

Embora a superóxido dismutase (SOD) catalise a dismuta o do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) para formar a molécula estável, o H_2O_2 , em associa o   radia o ionizante, pode estimular a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aumentando a concentra o de óxido nítrico (NO). O NO, então, reage com $O_2^{\bullet -}$ para formar o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) ou o radical peroxinitrilo ($ONOO^\bullet$). Semelhante   $\bullet OH$, $ONOO^-/ONOO^\bullet$ também   um radical altamente reativo e capaz de atacar uma ampla gama de alvos celulares, incluindo lipídios, tióis, proteínas e bases nitrogenadas da molécula de DNA (ESCH et al., 2002).

A produ o de espécies reativas e seus efeitos oxidativos são os mecanismos subjacentes relatados. Espécies reativas provenientes de fontes internas e externas desempenham múltiplos papéis em sistemas biológicos. Em níveis fisiológicos normais, eles são cruciais na transdu o de sinal e na sobrevivência celular saudável (FINKEL, 2001). No entanto, em níveis elevados, eles funcionam como agentes tóxicos e estão associados ao dano de macromoléculas celulares, como carboidratos, ácidos nucléicos (DNA/RNA), proteínas, lipoproteínas e lipídios (BROOKS, 2005).

As espécies reativas produzidas a partir dos efeitos radiolíticos, após a difusão nos tecidos e nas células, sofrem uma série de respostas biológicas. Espécies reativas de ox g nio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN) podem atacar o DNA, resultando em várias altera es, incluindo quebras na molécula de DNA, danos em bases nitrogenadas, destrui o de açúcares, forma o de liga es cruzadas e disfun es teloméricas (SAHIN et al., 2011). Se

não reparados ou mal reparados, esses danos podem levar a mutações e promover a transformação neoplásica ou a morte celular (KRYSTON et al., 2011). Os efeitos dependem principalmente do tipo e concentração de espécies reativas e suas vias de ação. ERO em níveis baixos inibem a NADPH oxidase na fase G1 do ciclo celular (via inibição da produção de $O_2^{\bullet -}$ pela exposição aos raios gama), enquanto altas concentrações deles podem afetar o ciclo celular em G1, G2, S e todas as fases da meiose (VUCIC et al., 2006).

Baixa dose de radiação induz um efeito espectador (*bystander effect*) e respostas adaptativas. O primeiro é caracterizado por estresse oxidativo, alterações genéticas/epigenéticas (rearranjos cromossômicos, mutação aumentada, amplificação do gene da aneuploidia, alterações na expressão gênica etc.). Os efeitos a longo prazo de baixos níveis de RI/ROS e ERN podem afetar direta ou indiretamente proteínas/genes que participam no metabolismo oxidativo (WU et al., 2011). Um aumento nos marcadores inflamatórios, proteína C-reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6), contagem de células brancas e níveis de ácido siálico estão ligados aos efeitos crônicos da RI em humanos (CASSANO et al., 2016). O dano oxidativo ao DNA, no entanto, pode levar a mutações, assim como ligações cruzadas de DNA em células vizinhas (CADET; DOUKI; RAVANAT, 2011). Além disso, lesões oxidativas (lesões de DNA agrupadas induzidas oxidativamente) são capazes de induzir quebras de fita dupla do DNA (DSBs) e quebras da fita simples (SSBs), levando à morte celular ou efeitos estressantes a longo prazo em células sobreviventes (SEDELNIKOVA et al., 2010). Notavelmente, os efeitos inflamatórios de longo prazo também podem induzir dano ao DNA (MARTIN et al., 2011). De fato, a inflamação crônica induzida por radiação, o metabolismo oxidativo e a instabilidade genômica são responsáveis por produzir doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e até mesmo câncer (WEINBERG; CHANDEL, 2009). Deve ser mencionado que a formação de um adulto de DNA metiltransferase covalente (DNMT)-DNA, após a quebra da molécula induzida por RI, pode levar ao bloqueio da capacidade de reparo do DNA e ao aumento da radiosensibilidade celular (SULLI; DI MICCO; DI FAGAGNA, 2012). A radiação ionizante, após a produção de ERO, principalmente $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 , causa extensa depurinação e, em menor grau, despiriminações. Caso contrário, níveis excessivos de ROS podem oxidar bases no DNA (LINDAHL, 1993). A mutação é resultado da falha no reparo de bases oxidadas no DNA. Além disso, a metilação da citosina na 5-metilcitosina, causada pela reação com a Sadenosilmetionina (BRONZINI et al., 2017), cria um local mutável que gera timina, levando a uma mutação de ponto C para T. No entanto, os pontos de verificação do ciclo celular, reparo de excisão de base (BER), reparo

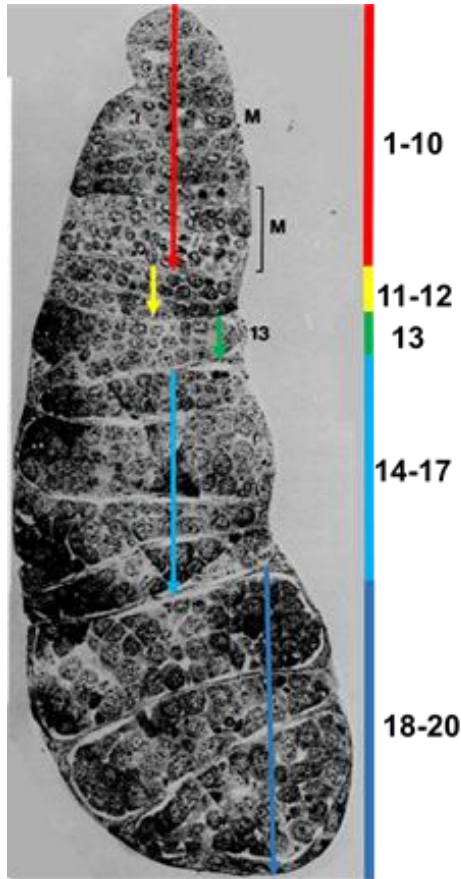
de excisão de nucleotídeos (NER), reparo incompatível (MMR) e reparo de quebra dupla fita (DSBR) ocorrem para superar os efeitos prejudiciais no DNA (KAHANDA et al., 2016).

Não há dúvida de que as ROS dos processos metabólicos do corpo podem conferir um efeito de agrupamento com as ROS induzidas por RI (GEORGAKILAS et al., 2010). Nessa ocasião, doses baixas de efeitos de ERO induzidos por RI devem ser levadas em consideração em um efeito combinado com ERO proveniente de fontes endógenas. A exposição a longo prazo também é evidente para aumentar os níveis de micronúcleos, principalmente de DSBs (LOVREGLIO et al., 2014), carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica e diminuições na eficiência de clonagem (BUONANNO et al., 2011).

2.6 ESPERMATOGÊNESE E ESPERMATOGÊNESE EM AEDES

O desenvolvimento dos gametas masculinos é denominado espermatogênese e ocorre dentro dos folículos testiculares. Em insetos, a espermatogênese é cística, pois a diferenciação das células-tronco em células germinativas adultas ocorre dentro de uma área (cisto) delimitada por células não germinativas, as células císticas (Figura 12) (WANDALL; SVENDSEN, 1985). As células, somáticas do cisto podem fornecer nutrição aos espermatozoides em desenvolvimento. Em alguns dípteros, segundo Wensler e Rempel (1962), aparecem três tipos de células nutritivas, que funcionam sequencialmente na espermatogênese. As primeiras são as “células císticas”, que formam a monocamada em torno de cada célula germinativa primitiva. O segundo tipo seria originário de espermatogônias que não sofrem espermatogênese e se diferenciam em trofócitos. Esta última é uma célula alongada localizada entre os cistócitos. Chapman (1998) relata a presença, em alguns insetos, de células irregulares denominadas trofócitos, dispersas entre os cistos, que podem corresponder ao último tipo de célula citado.

Figura 12 – Testículo de pupa macho de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de Wandall e Svendsen (1986).

Nota: Uma micrografia composta de uma seção longitudinal do testículo de pupa de *Aedes aegypti*. Vinte cistos estão presentes: **Cistos 1-10**, contando a partir da porção anterior e estreita do testículo, contêm espermatogônias em interfase mitótica ou em mitose (marcado com M na Fig.), **Cistos 11-12**, células em interfase premitótica; **Cisto 13**; as células estão em 1ª prófase meiótica; **Cistos 14-17**, contêm espermatócitos em leptóteno ou zigóteno; **Cistos 18-20**, contêm células em paquíteno.

O agrupamento de espermatogônias e espermatócitos em cistos dá ao testículo uma aparência estriada sob o microscópio de luz (CHRISTOPHERS, 1960). Esse processo é sequencial e a primeira etapa tem início no ápice do folículo pela divisão assimétrica das células-tronco espermatogoniais, originando tanto células-tronco novas quanto espermatogônias para a continuidade do ciclo (DUMSER, 1980). Na observação dos testículos em pupas de *A. aegypti*, os cistos 1-10 contêm espermatogônias em interfase mitótica ou em mitose. As células dos cistos 11-12 estão em interfase premitótica. O cisto 13 é o início da prófase meiótica. Cistos 14-17 contêm espermatócitos em leptóteno ou zigóteno e cistos 18-20 contêm células paquitenicas (WANDALL; SVENDSEN, 1985).

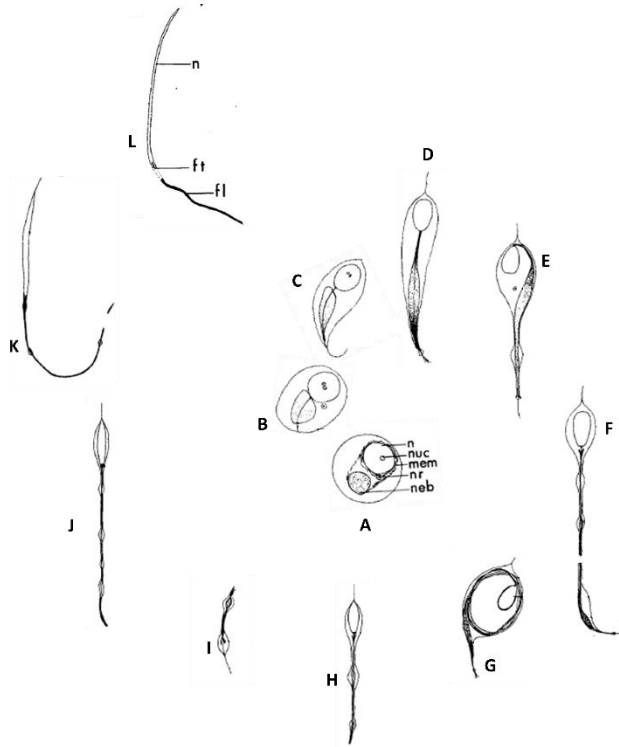
Essa organização cística é típica dos testículos encontrados nas fases de pupa, exceto que as divisões mitóticas são geralmente vistas apenas nos cistos 1-2. Geralmente, os testículos da pupa são grandes e contêm muitos cistos espermatogoniais e meióticos. Na pupação, os cistos mais avançados estão em paquíteno; o segundo dia pós-pupação, as pupas

possuem cistos espermatogênicos em seus testículos. Os testículos do adulto, no primeiro dia pós emergência, contêm menos cistos meióticos, mas são similares aos testículos da pupa. Nos machos adultos mais velhos, poucos cistos contêm espermatogônias ou espermatócitos (WANDALL; SVENDSEN, 1985). A ordem física dos cistos nos testículos reflete apenas aproximadamente o seu desenvolvimento relativo (WANDALL; SVENDSEN, 1985).

As espermatogônias são células grandes e esféricas, com núcleos polimórficos que apresentam nucléolo proeminente. Por meio de uma série de divisões mitóticas, cujo número de divisões é característico de cada espécie, formarão os espermatócitos (HOAGE; KESSEL, 1968; CRUZ-LANDIM, 2004; GOTTARDO; MERCATI; DALLAI, 2012). A morfologia das espermatogônias dos testículos de pupas e os testículos de adultos jovens são semelhantes; os espermatócitos primários também permanecem inalterados durante o período de desenvolvimento (WANDALL; SVENDSEN, 1985). Os espermatócitos permanecem interligados por pontes citoplasmáticas reforçadas por anéis de actina. Eles possuem núcleo esférico, com cromatina difusa e um citoplasma pobre em organelas com polirribossomos e mitocôndrias esféricas. Além disso, o citoplasma apresenta um centróssomo adjacente à membrana plasmática (HOAGE; KESSEL, 1968; CRUZ-LANDIM, 2004; GOTTARDO; MERCATI; DALLAI, 2012).

Assim que o número de espermatócitos por cisto, típico da espécie, é atingindo, ocorrem às divisões meióticas, resultando na formação das espermatídes. Após formadas, as espermatídes passam por várias modificações morfológicas que as transformam em espermatozoides. Assim sendo, células gaméticas masculinas maduras são constituídas na região de cabeça pelo acrossomo e núcleo e na região de cauda pelos dois derivados mitocondriais e o axonema. Os espermatozoides recém-formados deixam os testículos através dos vasos eferentes e ficam armazenados na vesícula seminal até a cópula, durante a qual eles são transferidos para o trato reprodutor feminino (DUMSER, 1980; KLOWDEN, 2013; CHAPMAN, 1998). A espermiogênese (WILSON, 1900) descreve as transformações em que espermatídes se diferenciam em espermatozoides (Figura 13). Claramente, a espermiogênese é um processo contínuo, mas, para propósitos puramente descritivos, é vantajoso dividir arbitrariamente o processo em uma série de estágios, nos quais uma espermatíde é caracterizada por passar por oito etapas para atingir o status de um espermatozoide maduro (WANDALL; SVENDSEN, 1985).

Figura 13 – Espermatogênese de *Aedes aegypti*



Fonte: Adaptado de Krafur e Jones (1967).

Nota: Ilustração semidiagramática da espermiogênese em *Aedes aegypti* (L.) A, a espermatozoide "estágio 1". São ilustrados o núcleo (**n**), nucléolo (**nuc**), membranas do retículo endoplasmático (**mem**), vacúolo e grânulo de coloração vermelha neutra (**nr**) e nebenkern mitocondrial (**neb**). B, "estágio 2"; C, espermátides em "estágio 3". D, "estágio 4" da espermatogênese. E, espermátides em "estágio 4"; F, "estágio 5" da espermatogênese. G, uma espermátide em "estágio 5" na forma que muitas vezes assume em solução salina. H, ilustrando a aparência anterior de uma espermátides em "estágio 6". I, porção terminal do flagelo de uma espermátides em "estágio 6". J, espermátides em "estágio 7". K, espermátide no "estágio 8" da espermatogênese. L, o espermatozoide maduro mostrando o núcleo (**n**), que constitui a peça principal, a posterior bifurcação ou ligeira bifurcação do núcleo (**ft**) e o flagelo (**fl**).

As espermátides iniciais são células globulares com núcleo central, com um nucléolo e uma cromatina difusa (CRUZ-LANDIM, 2004; KLOWDEN, 2013; GOTTARDO; MERCATI; DALLAI, 2012). À medida que a espermiogênese avança, as seguintes transformações ocorrem: o acrossomo se forma pela união de vesículas liberadas a partir do complexo de Golgi; o núcleo começa a apresentar forma afilada com cromatina cada vez mais compactada; as mitocôndrias se fundem formando uma estrutura denominada *nebenkern*, que posteriormente se divide formando os dois derivados mitocondriais, que se alongarão à medida que o flagelo é formado; o axonema é formado a partir de um centríolo e é caracterizado por um arranjo microtubular $9 + 9 + 2$, que é uma organização microtubular convencional para insetos pterigotas. Por fim, todas as estruturas das espermátides se alongam, o citoplasma excedente é eliminado, terminando a diferenciação celular com a formação do espermatozoide (HOAGE; KESSEL, 1968; GONZÁLEZ; TAVOSANIS; MOLLINARI, 1998; CRUZ-LANDIM, 2004; KLOWDEN, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar as características funcionais e morfológicas do sistema reprodutor de pupas e adultos de *A. aegypti* machos, expostos ou não a radiação gama.

3.2 ESPECÍFICOS

Comparar o tratamento de *A. aegypti* expostos a radiação gama (COBALTO-60) com tratamento controle (não irradiado), a partir das análises:

- a) Caracterizar a biometria corporal de pupas e adultos machos;
- b) Caracterizar a morfologia, morfometria e histologia do sistema reprodutor de pupas e adultos machos;
- c) Avaliar morfolologicamente o espermatozoide de pupas e adultos;
- d) Avaliar a fertilidade de adultos;
- e) Caracterizar o perfil proteico do sistema reprodutor do macho adulto.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

Pupal gamma radiation as a sterile insect technique for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Artigo submetido no periódico: PeerJ - The Journal of Life and Environmental Sciences.

Pupal gamma radiation as a sterile insect technique for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Olávio Campos Junior^{1*}, Wellington de Almeida Oliveira¹, Fernanda Carolina Ribeiro Dias¹, Amanda Vasconcelos de Albuquerque¹, Jefferson Rodrigo Freitas de Albuquerque², Anderson Arnaldo da Silva¹, André Luiz Teixeira de França⁴, Elisângela Santos Ferreira Dias³, Claudia Maria Fontes de Oliveira³, Maria Alice Varjal Melo Santos³, Edvane Borges da Silva⁴, Rosangela Ferreira Frade de Araújo¹, Fábio André Bryner dos Santos^{1,2}, Luiz Carlos Alves^{1,2}

¹Laboratório de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

* Corresponding Author: Olávio Campos Júnior

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901.

+55 (81) 2126.8000

Email address: olavio.campos@yahoo.com

Abstract

Background. Several protocols have been tested for the vector control of *Aedes aegypti*, such as the use of ionizing radiation to induce sterility and, thus, reduce target populations.

Methods. Male *A. aegypti* pupae were exposed to cobalt-60 gamma radiation (50 Gy). After irradiation, the weight and cephalothorax length of the pupae, and wing and thorax lengths of adult mosquitoes that emerged from irradiated pupae were measured after 1 day (IR-1) and 10 days (IR-10). Sperm capacity, sperm morphometry, testis morphology, and fertility were also assessed.

Results. No changes in weight or biometrics were observed in the pupae or adult mosquitoes after pupal irradiation. However, the sperm capacity changed during the mosquito life cycle and was initially higher in the pupae and IR-1 mosquitoes, but the sperm production was reduced in the IR-10 mosquitoes. Sperm morphometry was not altered after irradiation, but the larval hatching rates of both IR-1 and IR-10 males were very low or zero. Testis morphology was disorganized with a loss of integrity between somatic and germinal components, with greater alterations observed in the IR-10 group. These findings confirmed the deleterious effects of pupal irradiation.

Conclusion. Cobalt-60 gamma radiation of pupae promoted differential age-dependent responses of somatic and germinal testis components in *A. aegypti* mosquitoes. We suggest that irradiation during the pupal stage and the release of mosquitoes 1 day after their emergence would be advantageous as a sterile insect technique to reduce target populations of *A. aegypti*.

Keywords: Arbovirus, *Aedes aegypti*, Mosquito, Ionizing radiation, Sperm quantity, Testicular damage

Introduction

Arboviruses have caused important epidemics over the past few decades and have, thus, greatly affected global animal and human health (Gould & Higgs, 2009; Weaver & Reisen, 2010). Pathogens of the *Flaviviridae* family are of great medical interest because they cause serious diseases worldwide, such as Zika, dengue, yellow fever, West Nile fever, and Japanese encephalitis (Thiel et al., 2005; Iosifidis et al., 2014; Waggoner & Pinsky, 2016). The replication cycle of these viruses occurs in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) mosquito vectors, which originated in Africa (Womack, 1993; Gubler, 2006; Weaver et al., 2016) and whose distribution and control has been studied in many regions of the world because of their medical importance (WHO, 2016). Among the numerous strategies developed for the control of mosquito populations, the sterile insect technique (SIT) (Helinski, Parker & Knols, 2006), associated or not with larvicides (Melo-Santos et al., 2018), has received special interest as a means to significantly reduce arbovirus transmission and, consequently, reduce the genetic diversity of mosquitoes.

Although male mosquitoes are not directly involved in the transmission of pathogens, their age, physical structure, and body size are indicative of sperm quality and reproductive success (Mahmood & Reisen, 1994). Therefore, the success of the technique depends on the availability of good quality genetic material (Yeap, 2013) and on the release of sterile male mosquitoes with the same mating capacity of wild-type mosquitoes to promote the decline of target populations to reduce the viral cycle in endemic regions (Helinski & Harrington, 2013; Lees et al., 2015). Understanding the reproductive biology of mosquitoes is thus essential for studies of behavior, gene flow, population structure, and genetic control (Ponlawat & Harrington, 2007).

Since the SIT technique has been widely used to control overpopulations of mosquito vectors, the present study evaluated the effect of cobalt-60 gamma radiation on the body development, reproductive system, and fertility of *A. aegypti* males irradiated with 50 Gy during the pupal stage.

Materials & Methods

Mosquitoes

An *A. aegypti* colony, kept under selection pressure for several years at the Insectary of the Department of Entomology of the Research Center Aggeu Magalhães (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) unit in Pernambuco, was used (Melo-Santos et al., 2010). This strain is susceptible to all chemical and biological insecticides and has a detoxification enzyme activity profile similar to the Rockefeller strain, which is often used as a reference to evaluate the effects of chemical insecticides.

Irradiation procedure

Pupae were irradiated at the Gamma Radiation Laboratory of the Department of Nuclear Energy of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and a Gammacell 220 ® irradiator was used as the source of cobalt-60 gamma radiation (MDS Nordion, Ottawa, Canada).

Twenty-four hours after the onset of the pupal stage, RecLab male pupae were homogeneously distributed and kept in Petri dishes covered with moistened filter paper. The plates uniformly received one dose of 50 Gy (213 Gy.min⁻¹) (Lima, 2015).

Experimental design

Body measurements, sperm capacity, morphometry, and male mosquito fertility were evaluated throughout the life cycle of *A. aegypti*. Experimental groups were divided into three subgroups, which were sampled and analyzed in triplicate, using a total of 10 animals per replicate (Fig. 1):

A. Irradiated or non-irradiated pupae, 24 h after the onset of the pupal stage, evaluated 10 h after irradiation.

B. Adult *A. aegypti*, 1 day after emergence from irradiated (IR-1) or non-irradiated (nIR-1) pupae.

C. Adult *A. aegypti*, 10 days after emergence from irradiated (IR-10) or non-irradiated (nIR-10) pupae.

Body size

After 10 h of irradiation, male *A. aegypti* pupae were dried on a paper towel and weighed to determine their wet weights. The pupae were then laterally positioned on a histological slide and photographed individually to determine their cephalothorax lengths.

To obtain the biometric data, adult *A. aegypti* 1 and 10 days after emergence were anesthetized for 2 min at -20 °C. One wing and the thorax of each specimen were removed and mounted on a single histological slide using silicone glue. Wing length was measured from the axillary incision to the apex, excluding the fringe (Briegleb, 1990; Nasci, 1990), and thorax length was measured from the scutellum to the most anterior point of the thorax (Hoffmann et al., 2007). All photomicrographs were obtained under bright-field illumination using an Axio Imager-M2m/ZEISS microscope and measurements were performed using an appropriate software (Blue Edition/Zeiss).

Dissections

Pupae and adult *A. aegypti* males were anesthetized and placed on a histological slide containing 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4). The protocol to remove the male reproductive system was adapted. The cephalothorax was removed first, followed by the displacement and removal of the last abdominal segment. The entire reproductive system, containing the testes, seminal vesicles, and accessory glands, was then removed to evaluate the sperm capacity, testis morphology, and sperm morphometry (Ponlawat & Harrington, 2007).

Sperm capacity

Sperm quantification was performed after suspending the reproductive system in 50 µL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) to release the sperm in an Eppendorf tube, and then adjusting to a final volume of 200 µL with the same buffer. A total of 10 aliquots of 5 µL of the stock solution containing the sperm suspension were distributed in silanized multi-well slides. The slides were air dried, fixed with acetone p.a., and stained with Giemsa dye (Sigma-Aldrich, Germany) for 1 h. The slides were washed and stored at -4 °C until quantification using a dark-field optical microscope (Ponlawat & Harrington, 2007; Helinski & Knols, 2009).

For the pupae, the sperm cells were divided into two categories: immature sperm at stages 6–8 and mature sperm (Krafsur & Jones, 1967); the sum of which was considered to be the total sperm capacity. After counting, images of 50 intact sperm cells were processed to evaluate the sperm morphometry.

For the adult stage (IR-1 and IR-10), the sperm was morphologically divided into categories of 100 μm (Helinski & Knols, 2009). The sperm length distribution profile was obtained using ZEN 2 software (Blue Edition/Zeiss).

Testis morphology of *A. aegypti*

After dissecting the male reproductive system of adult *A. aegypti*, the testes were separated from the seminal vesicles and accessory glands, and fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 25°C and post-fixed in 1% OsO₄ using the same buffer. The testis samples were then stained with 2% uranyl acetate, dehydrated in acetone, and infiltrated with and embedded in Epon 812 resin (Electron Microscopy Sciences). Semi-thin sections of the samples were used for light microscopy analysis using an Axio M2m/Zeiss microscope after staining with toluidine blue.

Fertility

Adult male mosquitoes that were irradiated or non-irradiated during the pupal stage, were placed in cages (15 × 20 cm) for mating with virgin *A. aegypti* females. After 2 days, males were removed from the cage and females were fed a 10% sucrose solution for up to 24 h before offering a blood meal with heparinized *Gallus gallus* chicken blood, using a Glytube artificial feeder (Costa-da-Silva et al., 2013), during the first 2 h of the photophase period. Only *A. aegypti* females fed with blood were maintained in cages for egg maturation and subsequent oviposition. Amber glasses filled with water to a third of their capacity were placed in the cages. A piece of filter paper was placed in each glass on which females could lay their eggs. After oviposition, the filter papers were mounted on histological slides and photographed under a dark-field optical microscope. The eggs were quantified using ZEN 2 software and then embedded and incubated until hatching. The larvae were counted to determine the sterility rate after the sterilization of pupae with gamma rays.

Statistics

The data were first tested for normality using the Shapiro-Wilk test. An arcsine square root transformation of the results was performed for statistical analysis of sperm morphometry and fertility (Klowden & Chambers, 2004). The biometric parameters and sperm production were analyzed using a Student's t-test and all tests were two-sided. Analysis of variance (ANOVA) was used to assess the hatching rate and fertility parameters. When a significant effect was detected, a Tukey's *post hoc* test was performed to determine the differences. Statistical significance was set at p-values ≤ 0.05. All statistical analyses were performed using STATISTICA® 7.

Results

Body size of *A. aegypti*

The data presented in Table 1 demonstrates that adult mosquitoes that emerged from irradiated pupae had the same body size of non-irradiated mosquitoes. The traditional measurements evaluated to determine the quality of the emerged mosquitoes, i.e., pupal wet weight and cephalothorax length, and adult wing and thorax lengths, did not change after irradiation and were independent of the analyzed life cycle period (1 or 10 days after emergence). Using a new approach, an easily obtained index was created to evaluate the biometric parameters of adult *A. aegypti* by dividing the wing length by the thorax length, which also did not change after irradiation.

Sperm capacity

The sperm capacity of pupae showed different responses after irradiation, according to the two stages of spermatogenesis. The ionizing radiation did not affect the production of immature sperm cells in stages 6–8 (IR: 541.60 ± 121.18 and nIR: 540.80 ± 72.26 , $p = 0.9$). However, the number of mature sperm cells was higher in irradiated pupae (IR: 476.80 ± 89.72 and nIR: 158.40 ± 44.42 , $p = 0.01$). Therefore, the total sperm capacity, which is the sum of the two categories of quantified sperm, was also higher in the irradiated group (IR: 1018.40 ± 120.44 and nIR: 699.20 ± 82.57 , $p = 0.04$).

In adult mosquitoes, the ionizing radiation had a different impact on the sperm capacity when evaluated 1 and 10 days after emergence: IR-1 mosquitoes showed a higher sperm capacity (IR-1: 3522.80 ± 210.24 and nIR-1: 2392.00 ± 292.46 , $p = 0.006$), as reported for the pupae, but there was a significant- reduction in the number of sperm cells after 10 days (IR-10: 7958.15 ± 403.90 and nIR-10: 10042.00 ± 550.80 , $p = 0.01$). In summary, an initial peak in sperm production was observed with a subsequent decline in sperm capacity, which confirmed the deleterious effects of the radiation treatment.

Relationship between sperm capacity and body size in adults and pupae

The relationship between the sperm capacity of pupae (immature stages 6–8, mature stages, and total sperm) and their biometrics (body weight and cephalothorax length) was established. The irradiated pupae showed a higher sperm capacity per body weight (mg) or cephalothorax length (mm) after irradiation (Fig. 2). This is the first study to evaluate the sperm capacity of non-irradiated and irradiated pupae and correlate the findings with biometric data. Ionizing radiation in the pupal stage was shown to promote an increase in sperm production without causing damage or mobilization of somatic energy.

In adult mosquitoes, the ratio between the total sperm capacity and weight, cephalothorax length (mm), wing length (mm), and thorax length (mm) was higher in the IR-1 mosquitoes (Fig. 3). However, 10 days after emergence, a decline in the ratio between sperm capacity and wing or thorax length after irradiation was observed.

Sperm length measurements

The sperm morphometric data enabled further categorization into four categories, following *Helinski & Knols (2009)*, i.e., radiation apparently did not affect the sperm length, regardless of the category or post-emergence evaluation time (1 and 10 days). There were no sperm cells with lengths $< 100 \mu\text{m}$ or between 100 and $200 \mu\text{m}$. The observed lengths of sperm cells are shown in Table 2.

Testis morphology of adult *A. aegypti*

Semi-thin histological sections of the testes of non-irradiated and irradiated mosquitoes showed individual fusiform follicles externally lined by flattened cells that delimited the germinal tissue. In the region of the terminal compartment of the testis, the testicular wall opened into a long, straight, posterior, and centrally directed duct, the vas efferens (Fig. 4).

It was possible to observe in both nIR-1 and nIR-10 that the total cyst composition varied according to age, which is consistent with the pattern already observed in other studies (Fig. 4A–C). Therefore, the internal morphology of the non-

irradiated *A. aegypti* mosquito testis was composed of four main features: 1) the testis, which is divided into three different portions according to the organization of the germinal tissue, i.e., the apical portion (spermatogonial zone), the middle portion (spermatogenic zone), and the terminal portion (spermatic zone); 2) the germinal tissue, which is composed of germ cells and interstitial cells; 3) germ cells, which occur in groups with a fixed number of elements in the same syncytial state; and 4) the interstitial cells surrounding the germ cells, which form the supracellular unit of the germinal tissue (Fig. 4A). The testes of nIR-1 adult mosquitoes resembled those of the late pupae, but their middle testis layer contained many spermatic cysts (Fig. 5A) and fewer spermatogonial cysts (Figs. 5A, 5B, 4A). Conversely, the testis of nIR-10 adult mosquitoes (Fig. 4B) had few spermatogonial cysts and a high sperm density in the middle, terminal, and vas efferens compartments (Fig. 5I–C). Both groups had spermatids embedded in the cytoplasm of cyst cells, which demonstrated the relationship between these cells and germ cells (Fig. 5G–H).

The testis morphology of irradiated mosquitoes was shown to be a strong indicator of the damage caused by ionizing radiation because it demonstrated the gradual loss of organization of the testes according to age (Fig. 4B–D). The testis morphology of IR-1 mosquitoes diverged from the morphology observed in age-matched nIR-1 control mosquitoes, and individual follicles with three distinct regions were noted. The follicles had a spermatogonial zone with cyst cells separating the cysts (Fig. 5D). However, the spermatogenic zone did not have cyst or sperm cells and had a region of high cell density with varied morphology and chromatin, mostly located peripherally (Fig. 5E). The spermatic zone was delimited from the middle portion by a single cyst cell and it was possible to observe spermatic cells embedded in the cyst cell (Fig. 5F).

The most severe effect of the exposure to ionizing radiation was observed in adult mosquitoes, 10 days after emergence. The internal histological analysis showed a loss of the supracellular unit of the germinal tissue and, therefore, it was not possible to observe the division of the follicle into the three distinct zones, as previously described (Fig. 4D). The internal testicular content was diffused with a disorganized arrangement of elongated spermatids and sperm cells (Fig. 5J–L), and demonstrated cells that resembled spermatogonia and were adrift in the amorphous testicular content. This indicated the loss of interaction between the germ cells and somatic cyst cells involved in maintenance and testicular organization (Fig. 5K).

Radiation-induced sterility

The results obtained after mating virgin females with *A. aegypti* virgin male mosquitoes are shown in Table 3. Mating females with IR-1 irradiated males reduced oviposition compared to the nIR-1 and nIR-10 non-irradiated groups. No significant differences in oviposition rates for females mated with IR-10 male mosquitoes were observed compared to both nIR-1 and nIR-10 males.

Egg hatchability

The larval hatching rate results revealed that the SIT employed in our protocols had a high efficiency for biological control, since the number of larvae produced by hatching eggs laid by females mated with IR-1 and IR-10 males was almost zero (Table 3). The absolute number of hatched larvae showed a significant reduction in both IR-1 and IR-10 irradiated groups, thus reducing the hatching rate by 99.1% and 99.8%, respectively.

Compared to the oviposition rate, which represents the percentage of eggs that develop to larvae, the larval hatching rates were significantly reduced in the batches of eggs produced by IR-1 and IR-10 mated females, i.e., by 98.5% and 99.7%, respectively.

Discussion

Our results showed that exposure to a dose of 50 Gy did not alter the body measurements and sperm morphometry, but that the sperm capacity after irradiation was age dependent in *A. aegypti*. Initially, an increase in the sperm capacity in late pupae and early adults was observed with a subsequent decline in late adult life, gradual loss of testicular microstructure, reduced fertility rates, and reduced larval hatching rates after mating.

Exposure to ionizing radiation, depending on the dose, has been shown to greatly decrease the size of pupae and, subsequently, of adult mosquitoes, and can lead to mosquito death in more severe cases. *Bakri, Mehta, & Lance et al. (2005)* observed that the radiation dose scale used for sterilization in *Dipteros* ranged from 20 Gy to 160 Gy. The irradiation dose used in our study was in accordance with insect sterilization and release practices with less pronounced induction of somatic damage and, consequently, greater competitiveness (*Robinson, 2002; Parker & Mehta, 2007*). Body size is a crucial physical factor for the reproductive dynamics of both male and female mosquitoes (*Dieng et al., 2016*). Morphologically, body size is positively correlated with age, size of sexual organs, total number of gametes and, consequently, with reproductive success (*Ponlawat & Harrington, 2007; 2009*).

Several studies have analyzed animal development and organ size at various ages during different stages of their life cycles. Factors, such as food availability and larval density, have been shown to cause changes in the growth rate, adult animal size, reproductive capacity, behavioral patterns, and mortality (*Ho, Ewert, & Chew, 1989; Walker et al., 1991; Lounibos et al., 2001*). With a larval density of 280 larvae/80 mL (~3 larvae/mL), *Barbosa et al. (1972)* obtained *A. aegypti* male pupae weighing ~2.0 mg. At a larval density of 2.5 larvae per mL, *Banerjee et al. (2017)* produced *Aedes albopictus* larvae weighing 2.0–2.3 mg, i.e., pupae that can generate large-sized adult mosquitoes, which corroborates the pupal body size results of our study for both irradiated and non-irradiated groups. Cephalothorax length and width, as well as pupal wet weight, were considered to be predictive factors of the size of *A. aegypti* adult male mosquitoes by *Koenraad (2008)*. Although pupal weight varies, our results corroborate the findings of this author regarding the pupal weight and cephalothorax measurements, as well as wing length of adult male mosquitoes. Regarding adult mosquitoes, our wing length data was consistent with the dimensions of medium- to large-sized mosquitoes, which indicated that adult mosquitoes irradiated during the larval stage still underwent normal development. Correlation of the biometric data with sperm capacity values revealed consistent results with those of *Ponlawat & Harrington (2007)* regarding wing size and sperm capacity. The wing size of irradiated or non-irradiated mosquitoes was observed to be comparable with large size animals, and sperm capacity variations were age-dependent (*Huho et al., 2006; Ponlawat & Harrington, 2007; Hatala, Harrington, & Degner, 2018*).

Comparison of age-matched groups showed distinct features: irradiated or non-irradiated early adult mosquitoes (IR-1 and nIR-1) and non-irradiated late adult mosquitoes (nIR-10) showed similar sperm capacities compared with large-sized mosquitoes of the same age according to *Ponlawat & Harrington (2007)*; however, the

IR-10 mosquitoes had fewer sperm cells compared to age-matched non-irradiated mosquitoes. Compared to the findings of this previous study, our IR-10 mosquitoes showed similar sperm capacities to the small-sized mosquitoes of the previous study. Therefore, adult mosquitoes emerged from irradiated pupae were shown to have the same body size pattern of non-irradiated mosquitoes for both analyzed periods of 1 and 10 days after emergence and that their biometric patterns resemble those of other animals of competitive sizes observed in other studies (*Barbosa et al., 1972; Ponlawat & Harrington, 2007; Banerjee et al., 2017*).

To our knowledge, no other such studies on sperm quantification in the larval stages have been conducted. However, studies on the exposure to ionizing radiation have shown that the early stages of spermatogenesis are more radiosensitive (*Helinski & Knols, 2009*). In the present study, exposure to ionizing radiation increased the sperm capacity of IR-1 mosquitoes, which was consistent with the observations of *Liu et al. (2007)*. These authors showed that exposure of male germ cells to low dose rates (LDR) produced a stimulating effect, i.e., hormesis, while exposure to high dose rates (HDR) had an inhibitory effect on cell metabolism, antioxidant capacity, proliferation, and maturation. Moreover, pre-exposure to LDR can protect cells from HDR-induced genomic and cytological effects as an adaptive response (*Liu et al., 2007*). Such an adaptive phenomenon was also observed in our study, whereby the sperm capacity was initially higher in irradiated pupae and IR-1 mosquitoes. However, the long-term effect of the radiation was observed during the late adult life of the mosquito with a marked reduction in sperm production, probably due to the dominant lethal mutations, especially in dividing cells (*LaChance, 1967*). According to *Mukherjee & Rees (1969)*, testes contain actively dividing spermatogonia and spermatocytes that undergo many meiotic division stages and these are the most radiosensitive stages (*Bakri, Mehta, & Lance, 2005*). Our study corroborates the effects of ionizing radiation on the Mediterranean fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann), i.e., a reduction in the number of sperm cells in the testis after irradiation of pupae (*Anwar et al., 1971*), and the data of *Helinski & Knols (2009)* who observed that *Anopheles arabiensis* (Patton) male mosquitoes irradiated during the pupal stage had significantly lower sperm counts, which were not observed in males irradiated during adulthood. The observed decrease in sperm count is probably due to the increased irradiation-induced damage during the early stages of spermatogenesis (*Proverbs, 1969; Anwar et al., 1971; Bakri, Mehta, & Lance, 2005*), which mainly occurs during the larval stages and pupal development (*Clements, 1992; Mahmood & Reisen, 1994*).

The use of radiation, as part of a SIT, can sterilize an insect by damaging the germ cell chromosomes, which causes their fragmentation and leads to the production of altered gametes and, subsequently, to the inhibition of mitosis and the death of fertilized eggs or embryos (*Klassen & Matsumura, 1966; Dyck et al., 2005*). It is generally accepted that chromosome damage (structural and numerical abnormalities) is the cause of dominant lethal mutations, which do not cause gamete dysfunction but are fatal to the fertilized egg or developing embryo (*Dyck et al., 2005*). This observation corroborates our results since the sperm morphometric analysis revealed no changes in sperm length (*Klowden & Chambers, 2004; Helinski & Knols, 2009*), however, our study did demonstrate changes in the testicular microstructure which caused severe somatic damage of the testis cyst cells. Our results clearly demonstrated the role of ionizing radiation as a testicular microstructure modifying agent.

Few studies have assessed the direct effects of gamma radiation on *A. aegypti* testicular microstructures. Studies of other radiation-exposed dipteran species demonstrated a loss of the cyst sheath of spermatocytes in *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Anwar *et al.*, 1971) and dispersed sperm cells in the testes of *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Riemann, 1967) and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) (Offori, 1970). Another finding of the present study, i.e., that the germ cell chromatin was located on the periphery of the nucleus, was also observed by Raminani & Cupp (1977) after radiation exposure of *A. aegypti* embryos, whereby the testes did not have clearly distinct compartments. Morphologically, somatic damage of the testis cyst cells leads to disorganization and the gradual loss of contact of these cells with germ cells, which disrupts the internal structure of the parenchyma in an age-dependent manner. However, despite the structural disorganization of the spermatogenic process, sperm production was conserved, although significantly reduced, in the late adult life of irradiated mosquitoes.

The reduction in hatchability rates is a consequence of changes in the testicular microstructure and induced dominant lethal mutations, which induces high levels of sterility. The egg production results of the present study were consistent with those of a previous study by Terzian & Stahler (1958), who showed that normal *A. aegypti* females continued to oviposit considerably in the F1 generation, even when mated with males irradiated with 10–300 Gy of gamma radiation. In *A. alpopicutus*, the use of doses of 30–40 Gy in a field study increased the sterility rate in males with a significant reduction in egg density (Bellini *et al.*, 2013). After *A. alpopicutus* pupae were exposed to radiation, egg production was maintained in females mated with males irradiated with doses of 40–60 Gy with subsequent null egg hatching rates (Balestrino *et al.*, 2014). Another study by Bellini *et al.* (2013) also showed a high sterility rate in groups irradiated with doses of 50 Gy and 60 Gy. Lima (2015) showed that irradiation of *A. aegypti* pupae with doses of 30–50 Gy reduced the number of embryonated eggs, whose larvae hatch in response to contact with water, until a complete lack of viability, which was observed only at the highest dose of 50 Gy. More recently, a study by Bond *et al.* (2019) showed that *A. aegypti* males irradiated with 50 Gy showed near-zero fertility, which corroborates the observations of the present study. Considering the male fertility data, nIR-1 mosquitoes can be considered to be naturally less fertile than nIR-10, possibly due to the immaturity of the reproductive system. This irradiation-associated immaturity led to a significant reduction in fertility, almost to zero, in the IR-1 group, despite having greater sperm capacity. Considering the complexity of the *A. aegypti* male reproductive system, further studies are needed to clarify the effects of ionizing radiation on accessory glands, seminal vesicles, and pre- and post-mating protein transfers.

Conclusions

Our findings suggested that irradiation during the pupal stage and the release of mosquitoes 1 day after emergence is advantageous for use as a sterile insect technique since these specimens had a higher sperm capacity compared to age-matched non-irradiated mosquitoes but had high levels of sterility, and would thus ultimately reduce the target populations of *A. aegypti*. Our study provides important information on the effects of the sterile insect technique on *A. aegypti* spermatogenesis throughout its various life stages. Considering the complexity of the *A. aegypti* male reproductive system, further studies are needed to clarify the effects

of ionizing radiation on accessory glands, seminal vesicles, and pre- and post-mating protein transfers

Acknowledgements

We are thankful to the FACEPE for financial support, to the staff and friends of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory and Insectary of the Department of Entomology of the Aggeu Magalhães Institute, and to the Ionizing Radiation Metrology Laboratory of the Department of Nuclear Energy of the Federal University of Pernambuco. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

References

- Anwar, M., Chambers, D. L., Ohinata, K., & Kobayashi, R. M. (1971).** Radiation-sterilization of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Comparison of spermatogenesis in flies treated as pupae or adults. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(3), 627-633.
- Bakri, A., Mehta, K., & Lance, D. R. (2005).** Sterilizing insects with ionizing radiation. In *Sterile Insect Technique* (pp. 233-268). Springer, Dordrecht.
- Balestrino, F., Medici, A., Candini, G., Carrieri, M., Maccagnani, B., Calvitti, M., ... & Bellini, R. (2014).** γ ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *Journal of medical entomology*, 47(4), 581-591.
- Banerjee, S., Pramanik, S., Banerjee, S., Saha, G. K., & Aditya, G. (2017).** Effects of density dependent larval competition on the life history traits of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Fragmenta entomologica*, 97-107.
- Barbosa, P., Peters, T. M., & Greenough, N. C. (1972).** Overcrowding of mosquito populations: responses of larval *Aedes aegypti* to stress. *Environmental Entomology*, 1(1), 89-93.
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013).** Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *Journal of medical entomology*, 50(2), 317-325.
- Bond, J. G., Osorio, A. R., Avila, N., Gómez-Simuta, Y., Marina, C. F., Fernández-Salas, I., ... & Williams, T. (2019).** Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in a sterile insect technique program. *PloS one*, 14(2), e0212520.
- Briegel, H. (1990).** Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of medical entomology*, 27(5), 839-850.
- Clements, A. N. (1992).** The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall.
- Costa-da-Silva, A. L., Navarrete, F. R., Salvador, F. S., Karina-Costa, M., Ioshino, R. S., Azevedo, D. S., ... & Capurro, M. L. (2013).** Glytube: a conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One*, 8(1), e53816.
- Dieng, H., Abang, F., Ahmad, A. H., Ghani, I. A., Satho, T., Miake, F., ... & Morales, N. P. (2016).** Physical characteristics and reproductive performance in *Aedes* (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomological and Acarological Research*, 48(3), 323-331.
- Dyck, V. A., Fernández, E. R., Flores, J. R., Teruya, T., Barnes, B., Riera, P. G., ... & Reuben, R. (2005).** Public relations and political support in area-wide integrated

- pest management programmes that integrate the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 547-559). Springer, Dordrecht.
- Gould, E. A., & Higgs, S. (2009).** Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(2), 109-121.
- Gubler, D. J. (2006, October).** Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In *Novartis foundation symposium* (Vol. 277, p. 3). Chichester; New York; John Wiley; 1999.
- Hatala, A. J., Harrington, L. C., & Degner, E. C. (2018).** Age and body size influence sperm quantity in male *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Journal of medical entomology*, 55(4), 1051-1054.
- Helinski, M. E., & Harrington, L. C. (2013).** Considerations for male fitness in successful genetic vector control programs. In *Ecology of parasite-vector interactions* (pp. 221-244). Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Helinski, M. E., & Knols, B. G. (2009).** Sperm quantity and size variation in un-irradiated and irradiated males of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* Patton. *Acta tropica*, 109(1), 64-69.
- Helinski, M. E., Parker, A. G., & Knols, B. G. (2006).** Radiation-induced sterility for pupal and adult stages of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis*. *Malaria Journal*, 5(1), 41.
- Ho, B. C., Ewert, A., & Chew, L. M. (1989).** Interspecific competition among *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Ae. triseriatus* (Diptera: Culicidae): larval development in mixed cultures. *Journal of Medical Entomology*, 26(6), 615-623.
- Hoffmann, A. A., Ratna, E., Sgro, C. M., Barton, M., Blacket, M., Hallas, R., ... & Weeks, A. R. (2007).** Antagonistic selection between adult thorax and wing size in field released *Drosophila melanogaster* independent of thermal conditions. *Journal of evolutionary biology*, 20(6), 2219-2227.
- Huho, B. J., Ng'habi, K. R., Killeen, G. F., Nkwengulila, G., Knols, B. G., & Ferguson, H. M. (2006).** A reliable morphological method to assess the age of male *Anopheles gambiae*. *Malaria journal*, 5(1), 62.
- Ioos, S., Mallet, H. P., Goffart, I. L., Gauthier, V., Cardoso, T., & Herida, M. (2014).** Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*, 44(7), 302-307.
- Klassen, W., & Matsumura, F. (1966).** Resistance to a chemosterilant, metepa, in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*, 209(5028), 1155.
- Klowden, M. J., & Chambers, G. M. (2004).** Production of polymorphic sperm by anopheline mosquitoes and their fate within the female genital tract. *Journal of insect physiology*, 50(12), 1163-1170.
- Koenraad, C. J. M. (2008).** Pupal Dimensions as Predictors of Adult Size in Fitness Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 45(2), 331-336.
- Krafsur, E. S., & Jones, J. C. (1967).** Spermiogenesis in *Aedes aegypti* (L.). *Cytologia*, 32(3-4), 450-462.
- LaChance, L. E. (1967).** The induction of dominant lethal mutations in insects by ionizing radiation and chemicals-as related to the sterile male technique of insect control. *Genetics of insect vectors of disease*, 617-650.
- Lees, R. S., Gilles, J. R., Hendrichs, J., Vreysen, M. J., & Bourtzis, K. (2015).** Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 156-162.

- 550 **Lima, K. F. A. (2015).** Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação
551 gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti*
552 (Diptera: Culicidae) (Doctoral dissertation).
- 553 **Liu, G., Gong, P., Bernstein, L. R., Bi, Y., Gong, S., & Cai, L. (2007).** Apoptotic cell
554 death induced by low-dose radiation in male germ cells: hormesis and
555 adaptation. *Critical reviews in toxicology*, 37(7), 587-605.
- 556 **Lounibos, L. P., O'meara, G. F., Escher, R. L., Nishimura, N., Cutwa, M., Nelson,
557 T., ... & Juliano, S. A. (2001).** Testing predictions of displacement of native *Aedes* by
558 the invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* in Florida, USA. *Biological*
559 *Invasions*, 3(2), 151-166.
- 560 **Mahmood, F., & Reisen, W. K. (1994).** *Anopheles culicifacies*: effects of age on the
561 male reproductive system and mating ability of virgin adult mosquitoes. *Medical and*
562 *veterinary entomology*, 8(1), 31-37.
- 563 **Melo Santos, M. A. V., Regis, L. N., Lopes, C. F. J. A., de Oliveira, C. M. F.,
564 Barbosa, R. M. R., Guedes, D. R. D., ... & Rodrigues, M. P. (2018).** Tecnologias
565 integradas para controle biológico, mecânico e genético de *Aedes*
566 *aegypti*. *Comunicação em Ciências da Saúde*, 28(01), 58-63.
- 567 **Melo-Santos, M. A. V., Varjal-Melo, J. J. M., Araújo, A. P., Gomes, T. C. S., Paiva,
568 M. H. S., Regis, L. N., ... & Ayres, C. F. J. (2010).** Resistance to the
569 organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes*
570 *aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, 113(2), 180-189.
- 571 **Mukherjee, A. B., & Rees, D. M. (1969).** Duration of mitotic cycle in brain cells of the
572 mosquito, *Aedes dorsalis*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 11(3), 673-
573 676.
- 574 **Nasci, R. S. (1990).** Relationship of wing length to adult dry weight in several
575 mosquito species (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 27(4), 716-
576 719.
- 577 **Offori, E. D. (1970).** Cytology of Gamma-Irradiated Gonads of *Stomoxys calcitrans*
578 (Diptera: Muscidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 63(3), 706-712.
- 579 **Parker, A., & Mehta, K. (2007).** Sterile insect technique: a model for dose
580 optimization for improved sterile insect quality. *Florida entomologist*, 90(1), 88-96.
- 581 **Ponlawat, A., & Harrington, L. C. (2007).** Age and body size influence male sperm
582 capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical*
583 *entomology*, 44(3), 422-426.
- 584 **Ponlawat, A., & Harrington, L. C. (2009).** Factors associated with male mating
585 success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *The American journal of*
586 *tropical medicine and hygiene*, 80(3), 395-400.
- 587 **Proverbs, M. D. (1969).** Induced sterilization and control of insects. *Annual review of*
588 *entomology*, 14(1), 81-102.
- 589 **Raminani, L. N., & Cupp, E. W. (1977).** The Histopathology of Thermally Induced
590 Sterility in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 13(4-
591 5), 603-609.
- 592 **Riemann, J. G. (1967).** A cytological study of radiation effects in testes of the screw-
593 worm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the*
594 *Entomological Society of America*, 60(2), 308-320.
- 595 **Robinson, A. S. (2002).** Mutations and their use in insect control. *Mutation*
596 *Research/Reviews in Mutation Research*, 511(2), 113-132.
- 597 **Terzian, L. A., & Stahler, N. (1958).** A study of some effects of gamma radiation on
598 the adults and eggs of *Aedes aegypti*. *The Biological Bulletin*, 115(3), 536-550.

- Thiel, H. J., Collett, M. S., Gould, E. A., Heinz, F. X., Meyers, G., & Purcell, R. H. (2005). Family Flaviviridae In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus taxonomy Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. (2016). Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. *Journal of clinical microbiology*, 54(4), 860-867.
- Walker, E. D., Lawson, D. L., Merritt, R. W., Morgan, W. T., & Klug, M. J. (1991). Nutrient dynamics, bacterial populations, and mosquito productivity in tree hole ecosystems and microcosms. *Ecology*, 72(5), 1529-1546.
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85(2), 328-345.
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., ... & Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral research*, 130, 69-80.
- Womack, M. (1993). The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Wing Beats*, 5(4), 4.
- World Health Organization. (2016). Vector control operations framework for zika virus (No. WHO/ZIKV/VC/16.4). World Health Organization.
- Yeap, H. L., Endersby, N. M., Johnson, P. H., Ritchie, S. A., & Hoffmann, A. A. (2013). Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 89(1), 78-92.

Figure legends

Figure 1. Chronologically organized experimental protocol with periods of irradiation, and the evaluation of biometric parameters and sperm capacity in the pupae and adult mosquitoes.

Figure 2. Sperm capacity of immature (spz6-8) and mature (collectively called SPZ) sperm cells and ratio between sperm capacity and biometrics of *Aedes aegypti* pupae irradiated and non-irradiated with a dose of 50 Gy. PW, Pupal weight (mg); CFTX, Pupal cephalothorax length (mm); WIN, Wing length (mm); TRX, Thorax length (mm); n-IR, non-irradiated; IR, irradiated. T-test: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**).

Figure 3. Sperm capacity in adult *Aedes aegypti* irradiated or non-irradiated with a dose of 50 Gy after 1 and 10 days (IR-1 and IR-10 or nIR-1 and nIR-10, respectively). SPZ, Estimated total sperm count; SPZ/PW, Sperm count per gram of pupae; SPZ/CFTX, Sperm count per mm of cephalothorax; SPZ/TRX, Sperm count per mm of thorax; SPZ/WIN, Sperm count per mm of wing. T-test: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**).

Figure 4. Photomicrographs of semi-thin sections of the testes of adult *Aedes aegypti* mosquitoes after 1 and 10 days (respectively, 1 d and 10 d), irradiated or non-irradiated (respectively, IR and nIR) with a dose of 50 Gy, embedded in Epon 812 resin and stained with toluidine blue. A) Control testis containing the spermatogonial (a), spermatogenic (b), and spermatid (c) zones ending in the vas efferens (ve) and the margins of a cyst (cy) delimited by cyst cells (cc). B) Testis showing the spermatogonial and spermatogenic zones without cyst or sperm cell

divisions. C) Testis with the same morphological pattern observed in *A. aegypti*. D) Testis without the typical syncytial division or spermatocytes, cyst cell only in the testis wall, and diffuse germ cells (g) in the testicular parenchyma. Scales: 40 μ m.

Figure 5. Photomicrographs of semi-thin sections of the testes of adult *Aedes aegypti* mosquitoes after 1 and 10 days, irradiated (respectively, IR1 and IR10) or non-irradiated (respectively, nIR1 and nIR10) with a dose of 50 Gy, embedded in Epon 812 resin and stained with toluidine blue. A–B) Testis with spermatogenic cysts (cy) in the spermatogenic zone surrounded by cyst cells (cc). C) Longitudinal section of the testis containing cyst and sperm cells (spz) near the vas efferens (ve). D) Testis with spermatogonia (g) in the spermatogonial zone surrounded by the cyst cells. E) Chromatin (ch) located in the periphery of the germ cell nucleus in the spermatogenic zone. F) Cyst cells in the transition between the spermatogenic and the spermatogenic zones containing sperm cells. G–H) Spermatids in the cyst cell. I) Vas efferens containing sperm cells delimited by the cyst cell. J) Testicular wall (arrow) and diffuse spermatogenic cells in the apical region of the testicular parenchyma. K) Germ cells adrift in the amorphous testicular content. L) Spermatogenic cells diffused in the testicular parenchyma in the region of the vas efferens. Scales: 10 μ m.

Tables

Table 1 Biometric data of irradiated and non-irradiated *Aedes aegypti* measured during the pupal stage and at 1 and 10 days after emergence. Values represent means $\pm$ standard errors. T-test: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**).

Table 2 Sperm length distribution profile of irradiated or undetermined adult mosquitoes 1 and 10 days after emergence. N = number of males analyzed (50 sperm cells per mosquito). T-test: $p \leq 0.05$ (*).

Table 3 Fertility of irradiated and non-irradiated mosquitoes assessed at 1 and 10 days after emergence. EGGS. Number of eggs. Different letters represent statistical significance at $p \leq 0.05$. after ANOVA or Tukey's HSD.

Table 1

Treatment	Parameter									
	PW(mg)	P value	CFTX(mm)	P value	WIN(mm)	P value	TRX(mm)	P value	TRX/WIN	P value
nIR-1	2.04 ± 0,04	0.12	1.78 ± 0,01	0.94	2.12 ± 0,02	0.62	1.08 ± 0,01	0.17	1,97 ± 0,02	0.12
IR-1	1.91 ± 0,07		1.79 ± 0,02		2.07 ± 0,03		1.05 ± 0,01		1,93 ± 0,02	
nIR-10	2.07 ± 0,03	0.94	1.80 ± 0,03	0.74	2.14 ± 0,02	0.66	1.08 ± 0,01	0.37	1,97 ± 0,02	0.12
IR-10	2.06 ± 0,10		1.81 ± 0,02		2.12 ± 0,03		1.10 ± 0,01		1,93 ± 0,02	

Table 2

Treatment	Proportion (%) ± S.E.M per category length (µm)										N (sperm cells)
	≤100	P value	100-200	P value	200-300	P value	300-400	P value	>400	P value	
nIR-1	0±0	0.0	0±0	0.0	21.8±5.3	0.50	77.6±5.1	0.56	0.6±0.3	0.80	10 (50)
IR-1	0±0		0±0		23.6±2.2		75.8±2.0		0.6±0.4		10 (50)
nIR-10	0±0	0.0	0±0	0.0	13.0±1.7	0.95	86.7±1.7	0.83	0.4±0.2	0.68	14 (50)
IR-10	0±0		0±0		13.0±3.4		86.1±3.3		0.9±0.6		14 (50)

Table 3

Treatment	Eggs	P value	Male fertility	P value	Larva Hatching	P value	larva hatching %	P value
nIR-1	804.0 ± 61.1 ^a	0.028	53.6 ± 4.1 ^a	0.029	521 ± 67.4 ^a	0.0001	66.3 ± 11.3 ^a	0.0001
IR-1	494.3 ± 63.1 ^b		33.0 ± 4.2 ^b		4.0 ± 3.3 ^b		0.8 ± 0.04 ^b	
nIR-10	807.0 ± 50.4 ^a		53.8 ± 3.4 ^a		742 ± 50.4 ^b		91.8 ± 0.5 ^c	
IR-10	670.3 ± 31.1 ^{ab}		44.6 ± 2.1 ^{ab}		1.5 ± 0.7 ^b		0.2 ± 0.05 ^b	

Figure 1

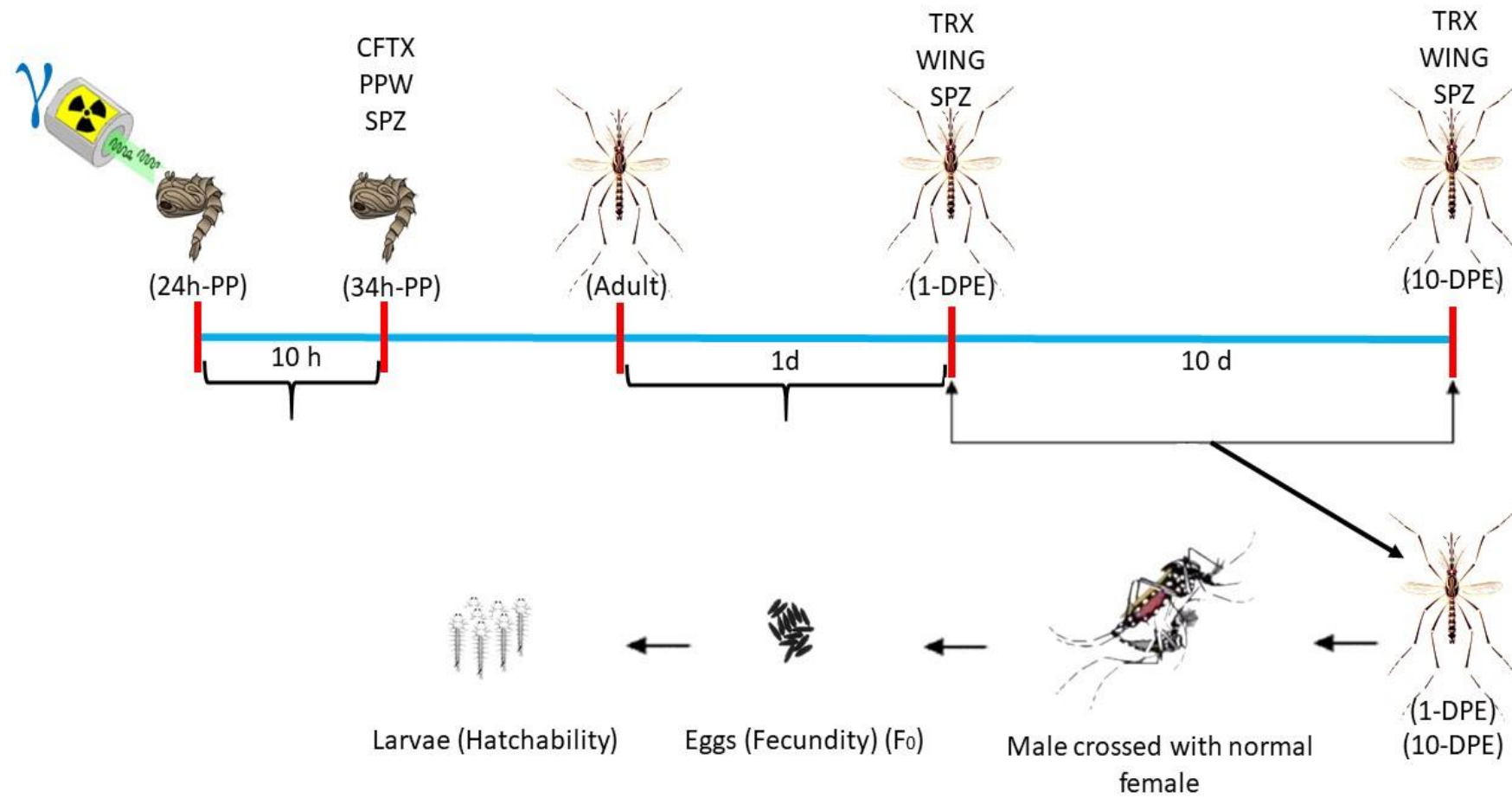


Figure 2

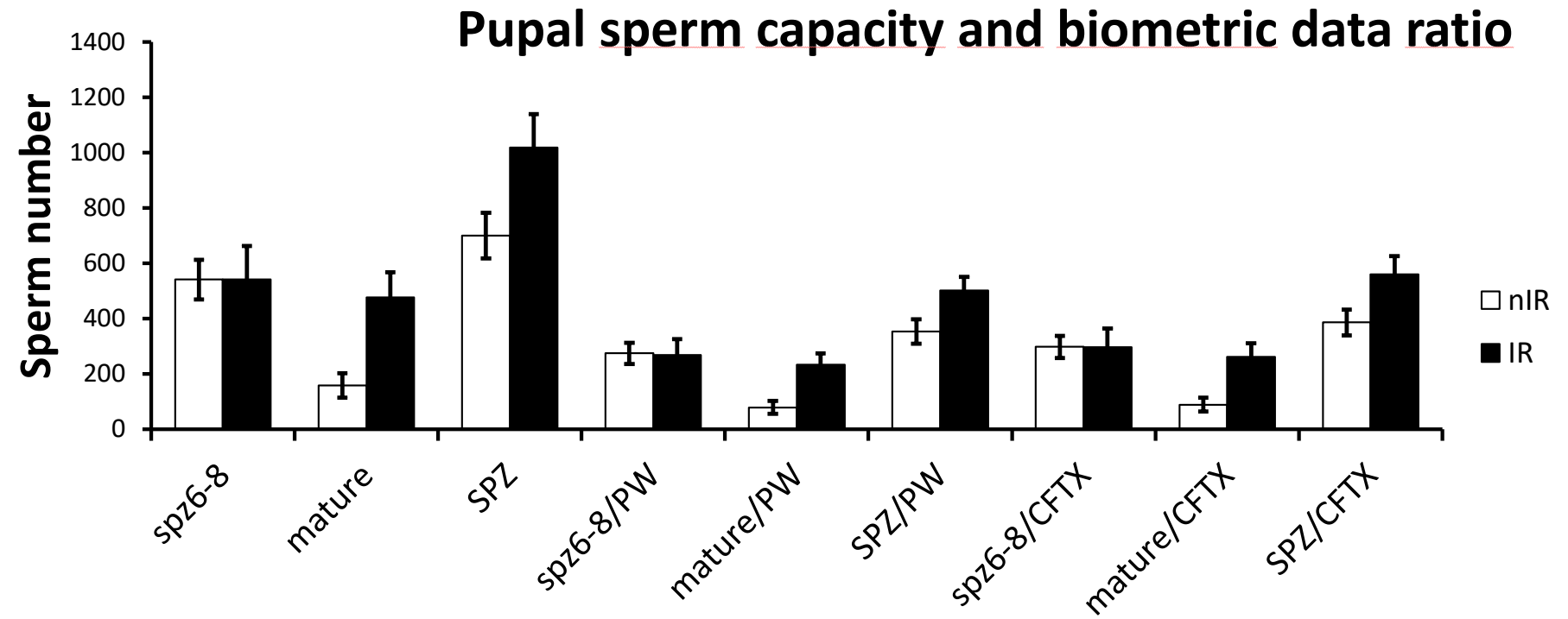


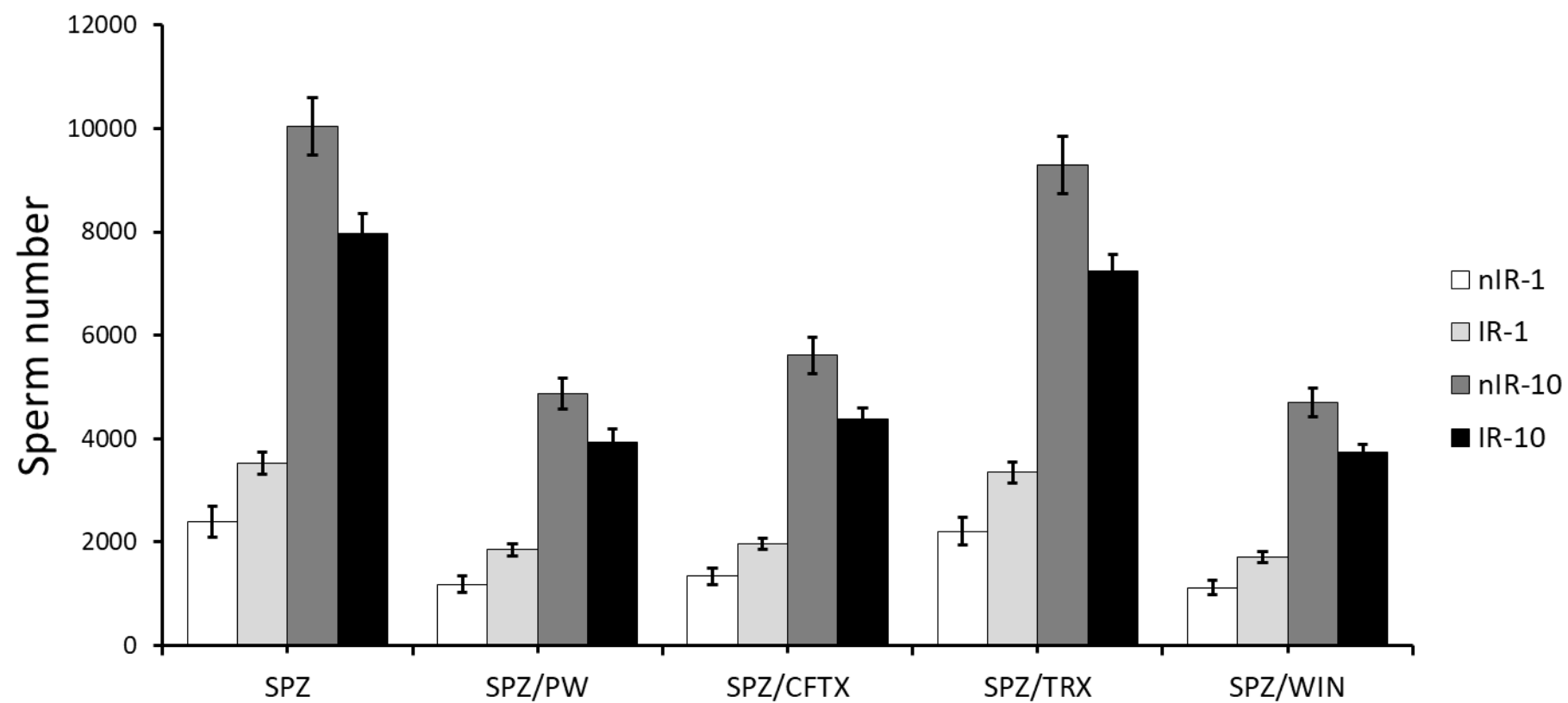
Figure 3

Figure 4

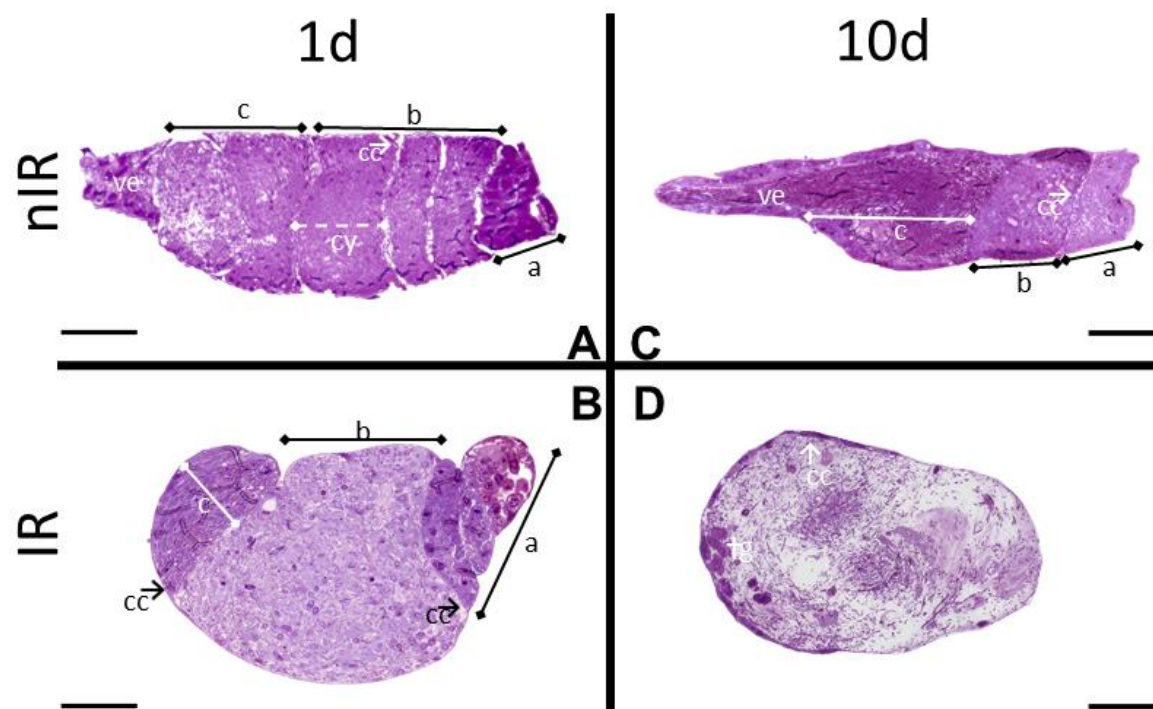
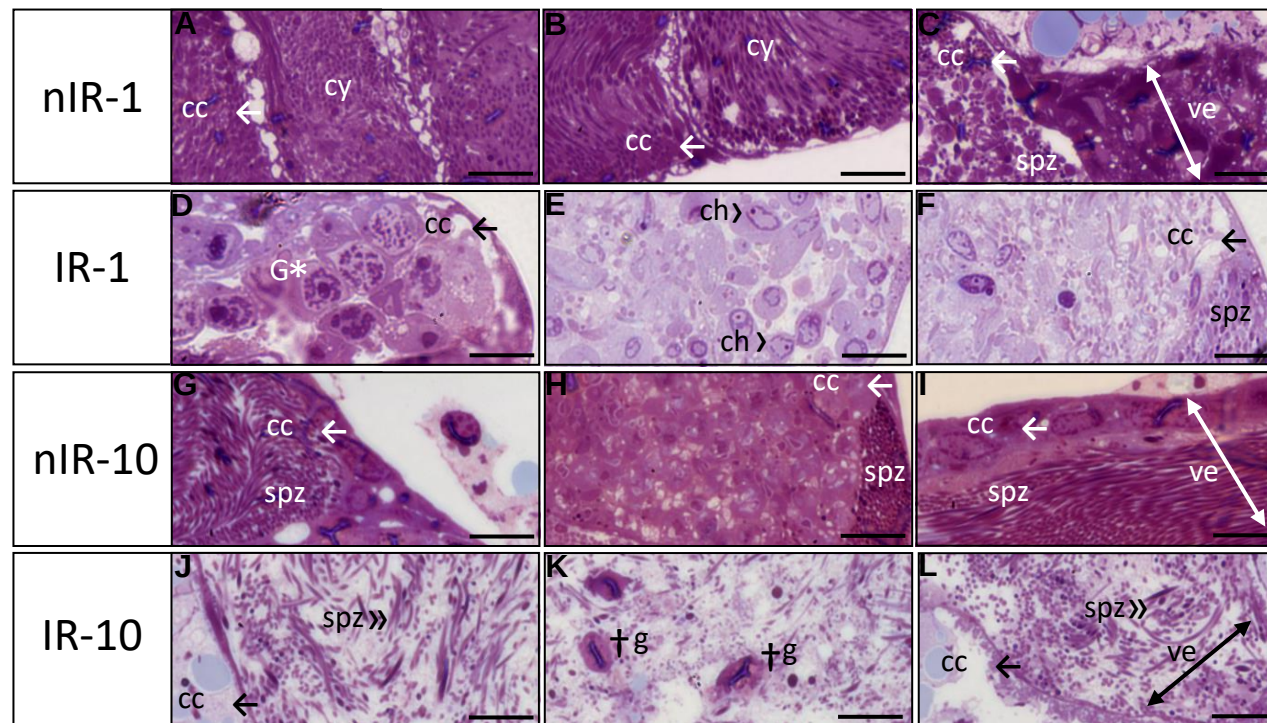


Figure 5



4.2 ARTIGO 2

Título do artigo

Artigo a ser submetido no periódico: MCP - Molecular & Cellular Proteomics

Proteomic Analysis of Irradiated and Non-Irradiated Male Reproductive System from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Olávio Campos Junior¹, Iasmim Lopes de Lima¹, Maria Aparecida Barreto Lopes Seabra¹, Wellington de Almeida Oliveira¹, Roberto Afonso da Silva¹, Amanda Vasconcelos de Albuquerque¹, Fernanda Carolina Ribeiro Dias¹, Maria Alice Varjal Melo Santos³, Edvane Borges da Silva⁵, Rosangela Ferreira Frade de Araújo¹, Fábio André Bryner dos Santos^{1,2}, Luiz Carlos Alves^{1,2}

¹Laboratório de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding Author:

Olavio Campos Junior¹

Email address: ocampossje@gmail.com

Abstract

Aedes aegypti vectors are responsible for the transmission of viruses that cause diseases such as yellow fever, zika, dengue and chikungunya that impact human and animal health. Male sterile insect technique (SIT) release through exposure to ionizing radiation has been shown to be viable in biological control. SIT requires a deeper knowledge of male reproductive biology to manipulate reproduction and reduce populations of these vectors. However, the basic understanding of irradiated male reproductive biology is not fully investigated. In the present study, we conducted proteomic expression profiling by LC-MS/MS between reproductive system of non-Irradiated (nIR) and irradiated (IR) (cobalt-60 gamma radiation -50 Gy) adult males after 1 day (IR-1) and 10 days (IR-10), respectively. A total of 1.012 proteins were identified in IR and nIR groups. Among them, 75 proteins were found to be up-regulated (fold change ≥ 1.5) and 125 down-regulated (fold change $\leq 0,50$) in IR-1 when compared to nIR-1. In other hand, 53 proteins were up-regulated (fold change ≥ 1.5) and 115 down-regulated (fold change $\leq 0,50$) in IR-10 when compared with nIR-10 group. Gene Ontology analysis categorized Up-regulated functional proteins from IR-1 and IR-10 groups in similar process, mainly represented by cell movement-based microtubules, microtubule motor activity and ribonucleotide and nucleotide binding. In other hand, down-regulated processes were related to cellular metabolism, mainly categorized in carboxylic acids metabolism, Transcription and Protein translation, in IR-1 and IR-10, respectively. The present findings revealed molecular components and events associated with ionizing radiation effects on system reproduction from *Aedes eegypti* males. These data can be useful to elucidate the mechanisms related to spermatogenesis process.

Keywords: arboviruses; *Aedes aegypti*; reproductive system; ionizing radiation; LC-MS/MS; proteomics.

Introduction

Many pathogens transmitted by *Aedes aegypti* causes disease that impose enormous human morbidity and mortality, aside the economic and social burden from these diseases is significant (CARVALHO; MOREIRA, 2017). The following Mosquito-borneviruses (arboviruses) have been the most wide spread and notorious in terms of severity of diseases and number of humans affected which are: yellow fever virus (YFV), Dengue viruses (DENV), chikungunya virus (CHIKV) and zika virus (ZIKV) (POWELL, 2018).

Vector control strategies using existing tools for the reduction of these vectors and virus spreading are the way of reducing the social impact and medical importance of these diseases (“WHO | Vector control operations framework for Zika virus”, 2016). Among the strategies for mosquito population control, there is a special interest in the production of sterile male insects using ionizing radiation (HELINSKI; PARKER; KNOLS, 2006; LEES et al., 2015).

The ability of released males to locate, copulate with, and transfer sterile sperm to wild females is of great importance for the success of genetic control programs like the Sterile Insect Technique (SIT) (DYCK; HENDRICH; ROBINSON, 2005). Although, male mosquitoes are not directly involved in the transmission of pathogens, mating, sperm and seminal fluids transfer are directly involved with the quality and quantity of sperm leading to a non-reproductive success (MAHMOOD; REISEN, 1994). A positive correlation between body size and sperm quantity also can contribute to this process (HATALA; HARRINGTON; DEGNER, 2018; HELINSKI; KNOLS, 2009; PONLAWAT; HARRINGTON, 2009). In addition to sperm, in numerous insect species, including *A. aegypti*, seminal fluid proteins (SFPs) are transferred along with sperm from males to females during copulation (ALFONSO-PARRA et al., 2014). Although sperm transfer is important to fertility, other materials transferred through the male ejaculate are often responsible for short and long-term

behavioral and physiological changes in the female (VILLARREAL et al., 2018). Mating initiates numerous physiological and behavioral changes in females, triggering responses in several processes related to fertility reviewed in (AVILA et al., 2011) and (GILLOTT, 2003).

A deeper understanding of *A. aegypti* reproduction and the mechanisms by which mating of male contribute to female post-mating behavior and physiology is needed in order to implement a SIT strategy (VILLARREAL et al., 2018). The Application of proteomics techniques based on mass spectrometry analyses have been used to identify seminal fluid's proteins (SFPs) in vectors such as *A. aegypti* and *An. Gambiae* (ROGERS et al., 2009; SIROT et al., 2008, 2011). Boes and collaborators (2014) identified many SFPs from *A. Albopictus* with similar methodology, and recently Degner and collaborators (2019) identified 870 sperm proteins and 280 SFPs in *A. aegypti*. Although the sterile insect technique (SIT) is potentially cheaper, environment-friendly, and a species-specific method of pest population suppression or eradication (NIKOLOULI et al., 2018), there are no studies that evaluate the effects of ionizing radiation on the expression of these male reproductive system proteins (MRPs). In this work, the male sterilized technique was applied to pupae and evaluated during the mosquito life time of adult *A. aegypti* males (aged 1 and 10 days, respectively). In order to analyze the proteins involved in the male reproductive processes, all mosquitoes were dissected and their reproductive systems were isolated and studied using a proteomic approaches representing the first study to identify altered MRPs in this important disease vector. Results indicated that exposure of *A. aegypti* during the pupal phase promotes differential gene expression throughout the adult life of the male mosquito with positive and negative regulation of spermatogenesis-related protein coding transcripts. Ultimately, This work represent a pioneer study about the reproductive biology and proteome profiles of male reproductive system in SIT protocols and provides knowledge for future studies and

application to discover key molecules in order to manipulate reproductive and vectorial capacity for managing the rate of pathogen transmission by vectors.

Material and Methods

Mosquitoes

An *A. aegypti* colony, kept under selection pressure for several years at the Insectary of the Department of Entomology of the Research Center Aggeu Magalhães (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) unit in Pernambuco, was used (MELO-SANTOS et al., 2010). This strain is susceptible to all chemical and biological insecticides and has a detoxification enzyme activity profile similar to the Rockefeller strain, which is often used as a reference to evaluate the effects of chemical insecticides.

Experimental design

Experimental groups were divided into two subgroups, which were sampled and analyzed, using a total of 800 animals per group which are:

Adult *A. aegypti*, 1 day after emergence from irradiated (IR-1) or non-irradiated (nIR-1) pupae and Adult *A. aegypti*, 10 days after emergence from irradiated (IR-10) or non-irradiated (nIR-10) pupae.

Irradiation procedure

Pupae were irradiated at the Laboratório de Radiação Gama do Departamento de Energia Nuclear at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and a Gammacell 220 ® irradiator was used as the source of cobalt-60 gamma radiation (MDS Nordion, Ottawa, Canada).

RecLab male pupae were homogeneously distributed and kept in Petri dishes covered with moistened filter paper Twenty-four hours after the onset of the pupal stage. All plates uniformly received one dose of 50 Gy. (LIMA, 2015).

Dissection, Extraction and Protein Dosage:

Adult males of *A. aegypti* were anesthetized and placed on a histological slide in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing protease inhibitors (Roche). The entire reproductive system, formed by testicles, seminal vesicles, and accessory glands, was then removed to evaluate the protein profile analysis (PONLAWAT; HARRINGTON, 2007)

Dissected biological samples were centrifuged at $\sim 1,000\times g$ for 5 min, the dissecting buffer was replaced three times. Samples were transferred to a new tube containing an extraction buffer solution (7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 0.5% IPG Buffrer, 40 mM DTT, Deionized Water) with protease inhibitor (Code 80-6501-23- GE Healthcare®), and were macerated using Pellet pestles (Motor Cordless, Sigma-Aldrich, Z359971). Samples were centrifuged at $\sim 11,000\times g$ for 30 min at 4 °C and supernatants (soluble fraction) were removed and transferred to new tubes and they were stored at -20 °C. Proteins obtained were precipitated using TCA-Acetone method developed by (WILLIAMS; STONE, 1997). Protein quantification was performed by 2-D Quant Kit (code 80-6483-56 - GE Heathcare®) according to the manufacturer's instructions.

In-gel Digestion of Proteins

A total of 70 µg proteins from each IR and nIR groups were separated by SDS-PAGE and staining by Comassie Blue. Lanes were excised and sliced in 1 x 1 mm pieces. Gel pieces were destaining with 25 mM ammonium bicarbonate (ABC), 50 % ethanol, dehydrated with 100 % ethanol, and dried under vacuum. Then, the proteins were reduced with 10 mM DTT, 50 mM ABC (1 h at 56 °C), and alkylated with 50 mM iodoacetamide, 50 mM ABC (1 h at room temperature, light protected). Gels were washed with 50 mM ABC, then dehydrated with 100% ethanol twice. Gels were incubated with 12.5 ng/ml trypsin (Promega, V5113), 50 mM ABC at 37 °C for 18 hours. After trypsinization, peptides were extracted from gel matrix through incubation twice with 30% MeCN, 3% TFA, and twice with 100% MeCN. The extracted peptide solution was concentrated under vacuum to allow MeCN evaporation and desalted with homemade C18 spin columns.

LC-MS/MS Analysis

Peptides were analyzed by LC-MS/MS in a Thermo Scientific Easy-nLC 1000 system coupled to a LTQ Orbitrap XL ETD (mass spectrometry facility RPT02H / Carlos Chagas Institute - Fiocruz Parana). Peptides separation was carried out in a 15 cm (75 µm inner diameter) fused silica in-house packed with reversed-phase ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm resin (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany). Chromatography runs were performed in a flow rate of 250 nL/min from 5 to 40 % MeCN in 0.1 % formic acid, 5 % DMSO in a 120 min gradient. The mass spectrometer operated in a data-dependent mode to automatically switch between MS and MS/MS (MS2) acquisition. Survey full-scan MS spectra (at 300 – 2,000 m/z range) were acquired in the Orbitrap analyzer with resolution of 60,000 at m/z 400 (after accumulation to a target value of 1,000,000 in the C-trap). The ten most intense ions were sequentially isolated and fragmented in the linear ion trap using

collision-induced dissociation at a target value of 30,000. The “lock mass” option was enabled in all full scans to improve mass accuracy of precursor ions (OLSEN et al., 2005). Each sample was analyzed in triplicate.

Proteomic Data analysis

Peaklist picking, protein identification, quantification, and validation were done using the MaxQuant platform (version 1.5.5.1) (COX; MANN, 2008), which includes the algorithm Andromeda (COX et al., 2011) for database searching. Default parameters of the software were used for all analysis steps, unless stated otherwise. Proteins were searched against a “decoy database” prepared by reversing the sequence of each entry of the *A. aegypti* protein sequence reviewed and unreviewed database (containing 35,675 protein sequences, downloaded on *data* from Uniprot). This database was complemented with frequently observed contaminants (porcine trypsin, *Achromobacter lyticus* lysyl endopeptidase, and human keratins) and their reversed sequences. Search parameters specified a MS tolerance of 20 ppm, a MS/MS tolerance of 0.5 Da, and full trypsin specificity, allowing for up to two missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification, and oxidation of methionine, and N-terminal acetylation (protein) were allowed as variable modifications. The triplicate runs were set as a single sample at the experimental design of MaxQuant. To Validate all identifications, a minimum of seven amino acids per peptide length were used. In addition, a false discovery rate (FDR) threshold of 0.01 was applied at both peptide and protein levels. The option "match between runs" was enabled to improve identification. Protein quantification was performed using a label-free approach, where peptides eluting from each LC run are detected as three-dimensional features - retention time (RT) versus signal intensity (extracted ion chromatogram, XIC) versus mass/charge - aligned and compared across runs, as previously described (LUBER et al., 2010). The output of

MaxQuant was analyzed on Perseus version 1.6.2.3. The LFQ intensities were transformed to $\log_{10}$ before obtaining the relation for each protein between two sample comparison.

Functional annotations (Gene Ontology and Pathways) were performed by Perseus through Annotation feature and the enrichment terms were obtained by Fisher exact test.

Results

Proteins differently expressed (DEPs) between irradiated and non-irradiated groups

1.012 proteins were identified in Irradiated and Non-Irradiated groups (Fig 1-A). Among of them, 75 proteins were found to be up-regulated (fold change ≥ 1.5) and 125 down-regulated (fold change $\leq 0,50$) in IR-1 when compared to nIR-1. In other hand, 53 proteins were up-regulated (fold change ≥ 1.5) and 115 down-regulated (fold change $\leq 0,50$) in IR-10 when compared with nIR-10 group (Fig 1-C). We highlighted some proteins that were UP-regulated in both IR-1 and IR-10 groups: Bcr-associated protein-bap, 3 proteins from dynein heavy chain family, Na⁺/K⁺ ATPase alpha subunit, papilin, acetyl-coa carboxylase, beta chain spectrin, myosin heavy chain, AAEL008955-PA, AAEL008773-PA, AAEL004317-PA, AAEL003658-PA and AAEL003155-PA. In addition, 9 commons proteins were found in both down IR-1 and down IR-10 groups: serine/threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit, an aspartyl-tRNA synthetase, arginine or creatine kinase, malic enzyme, leucyl aminopeptidase, putative, fibrinogen/fibronectin, leucine aminopeptidase, NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B14.5b and aspartate aminotransferase. Curiously, we also identified 5 common proteins in up IR-10 and down IR-1 and 4 common proteins in up IR-1 and down IR-10: yellow protein precursor; dopachrome-conversion enzyme (DCE), putative, vinculin, glycogen synthase, xaa-pro aminopeptidase, AAEL010469-PA and cytochrome C1 heme lyase, AAEL007144-PA, tubulin alpha chain, ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase, respectively (Fig-1B).

Gene Ontology Analysis of Differentially expressed proteins

Gene Ontology analysis revealed that the up IR-1 proteins were grouped, according to **biological process (BP)**, mainly in cellular process (17 proteins), microtubule-based process (6 proteins), cellular and microtubule-based movement (5 proteins respectively). UP IR-10 proteins were grouped into 3 terms similar to IR-1 group: microtubule-based process (4 proteins) and cellular and microtubule-based movement (4 proteins). In the same category, up-regulated IR-10 also featured transport (6 proteins) and establishment of localization-related functions (6 proteins).

Down-regulated biological processes in IR-1 and IR-10 groups are mainly related to metabolic process (46 proteins and 48 proteins, respectively). In the first group, enriched terms were: nitrogen compound metabolic process (18 proteins), primary metabolism process (33 proteins), oxoacid, cellular ketone and carboxylic metabolism process (both with 19 proteins), cofactor, coenzyme and acetyl-CoA metabolic process (5 proteins in both terms) and ion transmembrane transport (7 proteins). In the second group, the main terms were related to cellular protein metabolism process (25 proteins), cellular macromolecule metabolic process (31 proteins), protein complex assembly and subunit organization (5 proteins) and translation (14 proteins).

Regarding to **molecular function (MF)**, the enriched terms in up-regulated IR-1 proteins were related with pyrophosphatase activity (10 proteins), motor activity (7 proteins), microtubule motor activity (5 proteins), ribonucleotide and nucleotide binding (13 and 14 proteins, respectively), purine nucleotide, ribonucleotide and ribonucleoside triphosphate binding (13 proteins). Accordingly, up-regulated IR-1 MF terms also were enriched in the up-regulated IR-10 group. However, in the second group, a slight decrease on the number of proteins related to these functions was observed.

Down-regulated IR-1 proteins were mainly enriched in terms related to catalytic activity (86 proteins), transmembrane transport activity (10 proteins), cation and substrate-specific transmembrane transporter activity (7 e 8 proteins, respectively) and hydrolase activity, acting on acid anhydrides (7 proteins). In IR-10 group, catalytic activity also was overrepresented with 56 proteins. In addition to this, other processes have undergone negative regulation, such as: structural molecule activity (18 proteins), structural constituent of cytoskeleton (4 proteins) and structural constituent of ribosome (14 proteins). Cellular structural activities, peptidase activity (11 proteins), GTPase activity (6 proteins), guanyl nucleotide and ribonucleotide binding (7 proteins) terms were also down-regulated.

According to **cellular component (CC)**, up-regulated IR-1 proteins were mainly grouped in intracellular part (20 proteins), protein and macromolecular complexes related to cytoskeletal part (8 proteins), dynein and microtubule associated complex (5 proteins), against only two proteins located in the extracellular part. Up-regulated IR-10 proteins were enriched in the same components, with exception of extracellular part and addition of integral to membrane component (7 proteins).

On the other hand, down-regulated IR-1 proteins were mainly located in proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain (6 proteins), protein complex (12 proteins), macromolecular complex and membrane part (13 proteins). Whereas, down-regulated IR-10 proteins were enriched in terms related to intracellular part (56 proteins), located in macromolecular complex (35 proteins), intracellular organelle (21 proteins), ribonucleoprotein complex (18 proteins), ribosome (11 proteins), and small ribosomal subunit (5 proteins).

Discussion

Due to *Aedes aegypti* reproductive system complexity, sperm transferring female physiology, as well as the proteome involved in the reproductive process, there is a need to comprehend the ionizing radiation effects which are used in the SIT protocols over this system. Proteins produced by the testicles and germinative cells are very important to the spermatogenesis and its maintenance. Sperm and seminal fluid protein have a very important role in the reproductive success for both males and females. A better understanding about these proteins once ionized leads to discovery of key molecules to be used in biocontrol as well as differentially expressed proteins capable of interfere in the SIT protocols and the post mating effects.

According to gene Ontology Analysis, proteins up-regulated in IR-1 ad IR-10 groups presented similar process. Biological processes were related to cell movement-based microtubules that results in component cellular movement. We highlight 5 proteins that overlap in both IR-1 and IR-10 groups: 3 proteins from dynein heavy chain family, Na⁺/K⁺ ATPase alpha subunit and AAEL003155-PA, which has protein domains similar to the dynein family. Some of them, were previously identified in sperm fraction from *Aedes aegypti* reproduction system in a conducted study by (DEGNER et al., 2019). Dyneins are motor proteins linked to ATP that can perform multivariate cellular functions (ROBERTS et al., 2013). In the spermatozoon, these proteins are related to cilia and flagella, participating in the movement of these cells (MOHRI et al., 2012). The motor function also can be associated with up regulation of Na⁺/K⁺ ATPase alpha subunit protein in both irradiated groups. Associated to dynein axonemal component, the tubulin proteins family are also directly linked to the motility functions in the flagella (MOHRI et al., 2012). However, in the IR-10 group they were down-regulated leading to the reduced motility and/or sperm production.

In this group (IR-10) it was noticed a down regulation of tubulin family proteins involved on sperm microtubule composition (movement).

Downregulated proteins

In *Aedes aegypti* reproductive system, ionizing radiation also produced down-regulating effects on important cellular metabolic processes. In the IR-1 group, decrease of proteins mainly related to ketone, oxidacid and carboxylic acids metabolism process were observed. Alpha-ketoacids have been shown to be effective antioxidants in spermatozoa protection (LI et al., 2010). The decrease of this process may suggest increased sperm susceptibility to oxidizing compounds, causing undesirable effects on their effectiveness in the reproductive context. In addition, functions related to amino acid metabolism were also affected, driven in part by Gamma-glutamyl transpeptidase 1 isoform X2, Glutamate dehydrogenase, L-asparaginase 1, Aspartate aminotransferase, Glutamine synthetase and aspartyl-tRNA synthetase down-regulated proteins.

In addition, proteins involved in transmembrane cation transport, such as V-type proton ATPase subunits Family proteins, which have been previously reported in both compartments of the reproductive system, can be related to defects in protein transport, exchange and secretion (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2012), compromising reproduction effectiveness, as suggested by egg hatchability test (data not shown).

In the IR-10 group, processes related to replication, transcription and translation metabolism were down-regulated. In this context, ionizing radiation affected chromatin organization represented, in part, by down-regulation of Histone 2 (FC = - 1.004) and Histone 4 (FC = - 1.91). Besides, were identified the decreased expression of ATPases associated with diverse activities protein super-family (AAA-protein super-family). Among them, RuvB-like helicase 1 (FC= -1.91) and RuvB-like helicase 2 (FC= -1.38), 2 transcriptional cofactors are

intrinsically related to chromatin remodeling and consequently regulation of DNA replication, transcription and repair. (CONAWAY; CONAWAY, 2009). Spermatogenesis associated factor, member of this same family, was also down-regulated in IR-10 group (FC = -1.59). As shown in a previous study in brown planthopper (BPH), the suppression of this protein-related gene was related to the reduction of the accessory gland male protein content and fecundity rate in females after mating (GE et al., 2016). This data corroborates with our previous study, in which was observed that larvae produced number by hatching eggs laid by females mated with irradiated males was almost zero (data not shown). In the present study, impaired translation and overall protein function may be suggested by decreasing a number of ribosomal components and chaperonins in the IR-10 group (Table 4). In addition, these data may also be related to decreased sperm capacity in the latter group (data no showed).

References

- ALFONSO-PARRA, C. et al. Synthesis , depletion and cell-type expression of a protein from the male accessory glands of the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 70, p. 117–124, 2014.
- AVILA, F. W. et al. Insect Seminal Fluid Proteins : Identification and Function. 2011.
- BOES, K. E. et al. Identification and Characterization of Seminal Fluid Proteins in the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014.
- CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 243–255, 2017.
- CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W. **The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair** *Trends in Biochemical Sciences*, 2009.
- COX, J. et al. Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1794–1805, 1 abr. 2011.
- COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–1372, 30 dez. 2008.
- DEGNER, E. C. et al. Proteins, transcripts, and genetic architecture of seminal fluid and sperm in the mosquito *Aedes aegypti*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 18, n. 607, p. S6–S22, 2019.
- DYCK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. **Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management**. [s.l: s.n.].
- GE, L. Q. et al. Suppressing male spermatogenesis-associated protein 5-like gene expression reduces vitellogenin gene expression and fecundity in *Nilaparvata lugens* Stål. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–11, 2016.
- GILLOTT, C. M. **MALE ACCESSORY GLAND SECRETIONS : Modulators of Female Reproductive Physiology and Behavior**. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 163–

184, jan. 2003.

HATALA, A. J.; HARRINGTON, L. C.; DEGNER, E. C. Age and Body Size Influence Sperm Quantity in Male *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, 31 mar. 2018.

HELINSKI, M. E. H.; KNOLS, B. G. The influence of late-stage pupal irradiation and increased irradiated: un-irradiated male ratio of mating competitiveness of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* Patton. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. December 2008, p. 317–322, 2009.

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

LEES, R. S. et al. ScienceDirect Back to the future : the sterile insect technique against mosquito disease vectors. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 156–162, 2015.

LI, S. F. et al. The protective effects of α -ketoacids against oxidative stress on rat spermatozoa in vitro. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, n. 2, p. 247–256, 2010.

LIMA, K. F. A. **Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** (Diss.2015).

LUBER, C. A. et al. Quantitative Proteomics Reveals Subset-Specific Viral Recognition in Dendritic Cells. **Immunity**, v. 32, n. 2, p. 279–289, 26 fev. 2010.

MAHMOOD, F.; REISEN, W. K. *Anopheles* culicifacies: effects of age on the male reproductive system and mating ability of virgin adult mosquitoes. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 8, n. 1, p. 31–37, 1994.

MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**,

2010.

MOHRI, H. et al. Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. **Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences**, v. 88, n. 8, p. 397–415,

2012.

NIKOLOULI, K. et al. Sterile insect technique and Wolbachia symbiosis as potential tools for the control of the invasive species *Drosophila suzukii*. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 645–659, 2018.

OLSEN, J. V. et al. Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2010–2021, dez. 2005.

PÉREZ-SAYÁNS, M. et al. An update in the structure, function, and regulation of V-ATPases: the role of the C subunit. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 189–198, 2012.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 422–426, 2007.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 395–400, 1 mar. 2009.

POWELL, J. R. Perspective piece mosquito-borne human viral diseases: Why *Aedes aegypti*? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1563–1565, 2018.

ROBERTS, A. J. et al. Functions and mechanics of dynein motor proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 11, p. 713–726, 2013.

ROGERS, D. W. et al. Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. **PLoS Biology**, 2009.

SIROT, L. K. et al. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: Potential tools for control of female feeding and reproduction. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2008.

SIROT, L. K. et al. Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: Protein identification and potential functions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011.

VILLARREAL, S. M. et al. Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 108, n. May, p. 1–9, 2018.

WHO | Vector control operations framework for Zika virus. **WHO**, 2016.

WILLIAMS, K. R.; STONE, K. L. Enzymatic Cleavage and HPLC Peptide Mapping of Proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 155–167, 1997.

Figures

Figure 1. Experimental protocol with periods of irradiation as well as the evaluation of protein profile analysis.

Figure 2.

Figure 2A. Venn diagram of identified proteins in the irradiated (IR-1, IR-10) and non-irradiated (nIR-1, nIR-10) groups, indicating an overlapping.

Figure 2B. Venn diagram of differentially expressed proteins (DEPs), indicating overlapping between up-regulated IR-1 and IR-10, down-regulated IR-1 and IR-10, up-regulated IR-10 and down-regulated IR-1 and up-regulated IR-1 and down-regulated IR-10.

Figure 2C. Volcano plots of “t “ tests between irradiated (IR-1, IR-10) and non-irradiated (n-IR-1, n-IR-10) groups. Permutation-based multiparameter correction was applied with an FDR of 0.01. Red data points indicate significant regulations ($1,50 \leq x \leq 0,50$) related to up and down regulated proteins.

Figure 1

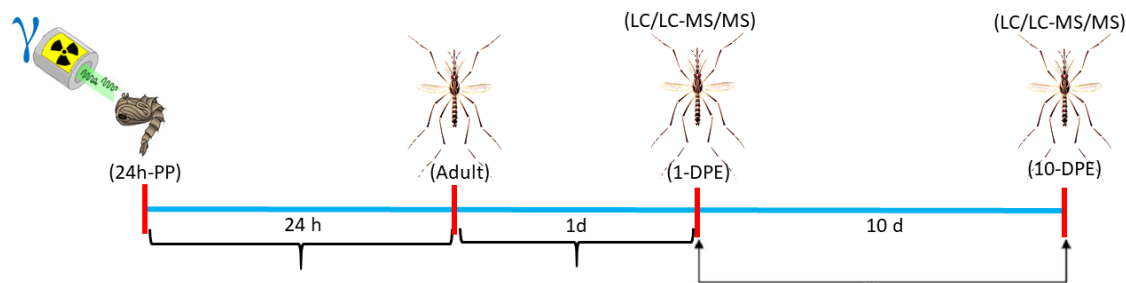


Figure 2

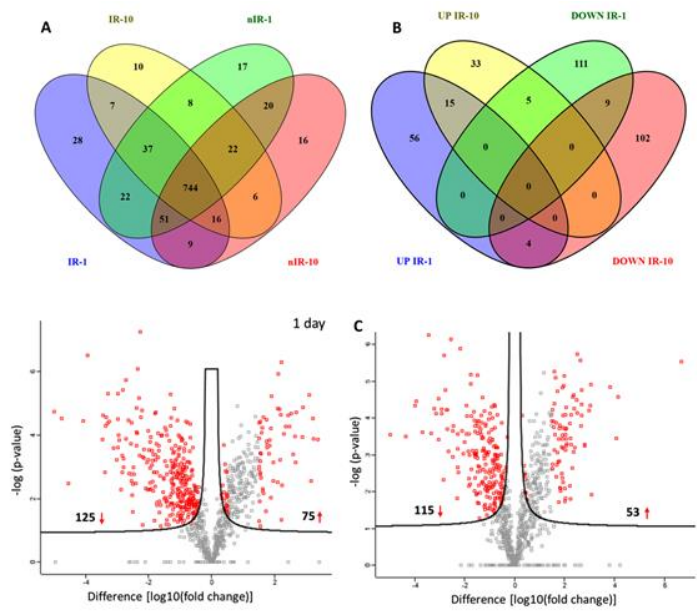


Table 1. Gene Ontology Analysis: biological processes, molecular functions and cellular componentes in the irradiated up-regulated proteins groups at day 1 and day 10.

Table 2. Gene Ontology Analysis: biological processes, molecular functions and cellular componentes in the irradiated down-regulated proteins groups at day 1 and day 10.

Table 3. Up-regulated proteins in IR-1 group.

Table 4. Up-regulated proteins in IR-10 group.

Table 5. Down-regulated proteins in IR-1 group.

Table 6. Down-regulated proteins in IR-10 group.

Table 1

Biological process (IR1-UP)	Proteins number	p-value	Biological process (IR10-UP)	Proteins number	p-value
cellular component movement	5	5,79E-08	microtubule-based process	4	3,42E-06
microtubule-based movement	5	5,79E-08	microtubule-based movement	4	3,42E-06
microtubule-based process	6	3,48E-07	cellular component movement	4	3,42E-06
			transport	6	3,05E-07
			establishment of localization	6	3,05E-07
Molecular function (IR1-UP)			Molecular function (IR10-UP)		
pyrophosphatase activity	10	7,84E-10	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	8	5,19E-08
nucleoside-triphosphatase activity	10	7,84E-10	hydrolase activity, acting on acid anhydrides	8	5,19E-08
hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	10	7,84E-10	microtubule motor activity	8	5,19E-08
motor activity	7	4,03E-09	hydrolase activity	8	5,19E-08
ribonucleotide binding	13	5,35E-08	ribonucleotide binding	4	3,42E-06
purine ribonucleotide binding	13	5,35E-08	purine ribonucleotide binding	15	4,17E-05
purine ribonucleoside triphosphate binding	13	5,35E-08	purine ribonucleoside triphosphate binding	10	5,86E-05
purine nucleotide binding	13	5,35E-08	purine nucleotide binding	10	5,86E-05
microtubule motor activity	5	5,79E-08	nucleoside-triphosphatase activity	10	5,86E-05
nucleotide binding	14	1,47E-07			
Cellular componente (IR1-UP)			Cellular componente (IR10-UP)		
cytoskeletal part	8	4,03E-09	cytoskeletal part	7	6,49E-09
microtubule associated complex	5	5,79E-08	intracellular organelle part	9	2,34E-07
dynein complex	5	5,79E-08	membrane part	7	3,05E-07
intracellular organelle part	10	6,05E-08	intrinsic to membrane	7	3,05E-07
organelle part	11	1,66E-07	integral to membrane	7	3,05E-07
protein complex	14	1,73E-06	protein complex	10	7,79E-07
macromolecular complex	15	3,24E-06	macromolecular complex	10	7,79E-07
cell part	26	6,41E-06	organelle part	9	1,79E-06
intracellular part	20	3,91E-05	microtubule associated complex	4	3,42E-06

Table 2

Biological process (IR1-Down)	Proteins number	p-value	Biological process (IR10-Down)	Proteins number	p-value
metabolic process	46	6,17E-09	cellular protein metabolic process	25	1,25E-11
cellular nitrogen compound metabolic process	17	1,72E-07	cellular macromolecule metabolic process	31	7,45E-10
nitrogen compound metabolic process	18	3,06E-07	protein metabolic process	33	2,30E-09
primary metabolic process	33	3,74E-07	macromolecule metabolic process	37	1,72E-08
oxoacid metabolic process	19	5,24E-07	cellular metabolic process	41	9,90E-08
cellular ketone metabolic process	19	5,24E-07	cellular process	55	3,03E-07
carboxylic acid metabolic process	19	5,24E-07	protein complex subunit organization	5	7,23E-07
cofactor metabolic process	5	1,97E-06	protein complex assembly	5	7,23E-07
coenzyme metabolic process	5	1,97E-06	cellular protein complex assembly	5	7,23E-07
acetyl-CoA metabolic process	5	1,97E-06	metabolic process	48	1,36E-06
Molecular function (IR1-Down)			Molecular function (IR10-Down)		
transmembrane transporter activity	10	1,50E-09	structural molecule activity	18	8,60E-15
transporter activity	11	4,14E-09	structural constituent of cytoskeleton	4	1,45E-07
monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	7	1,04E-08	GTPase activity	6	2,17E-06
inorganic cation transmembrane transporter activity	7	1,04E-08	peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	11	3,01E-06
hydrogen ion transmembrane transporter activity	7	1,04E-08	peptidase activity	11	3,01E-06
cation transmembrane transporter activity	7	1,04E-08	catalytic activity	54	4,23E-06
substrate-specific transporter activity	8	4,11E-08	guanyl ribonucleotide binding	7	5,06E-06
substrate-specific transmembrane transporter activity	8	4,11E-08	guanyl nucleotide binding	7	5,06E-06
ion transmembrane transporter activity	8	4,11E-08	GTP binding	7	5,06E-06
hydrolase activity, acting on acid anhydrides	7	5,28E-07	endopeptidase activity	6	1,07E-05
Cellular component (IR1-Down)			Cellular componente (IR10-Down)		
proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain	6	1,55E-06	ribonucleoprotein complex	18	8,60E-15
proton-transporting V-type ATPase, V1 domain	4	3,61E-06	macromolecular complex	35	9,55E-12
cell part	33	1,18E-05	ribosome	11	1,74E-11
protein complex	12	5,11E-05	non-membrane-bounded organelle	11	1,74E-11
membrane part	13	7,38E-05	intracellular non-membrane-bounded organelle	11	1,74E-11
macromolecular complex	13	7,38E-05	intracellular part	56	4,47E-07
			cell part	57	6,53E-07
			organelle	21	3,29E-06
			intracellular organelle	21	3,29E-06
			small ribosomal subunit	5	1,30E-05

Table 3

Proteins name	Fold change	q-value
Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	4,99087524	0,000846697
AAEL008773-PA	4,76606623	0,000874606
suppressor of actin (sac)	4,06407992	0,000902691
AAEL003155-PA	3,93636767	0,00015557
AAEL000403-PA	3,45474688	0,00167505
prophenoloxidase	3,4464709	0,000871037
dynein heavy chain	3,38261604	0,006729908
AAEL003658-PA	3,37106705	0,001037517
AAEL003785-PA	3,33531125	0,000871037
F14p3.9 protein (auxin transport protein)	3,29610189	0,000909192
Carboxylic ester hydrolase	3,28909047	0,000501413
AAEL007186-PA	3,25590642	0,000902691
hemomucin	3,11466662	0,002389764
AAEL013204-PA	3,00366974	0,004047973
AAEL004099-PA	2,97771772	0,000501413
Calmin	2,97711309	0,000874606
Low-density lipoprotein receptor (ldl)	2,96727498	0,002320317
translational activator gcn1	2,94468562	0,001515798
Dynein heavy chain	2,93976212	0,00167505
bcr-associated protein, bap	2,83631547	0,003405485
AAEL009955-PA	2,82865715	0,006709478
BTB domain-containing protein	2,80633672	0,000501413
Dynein assembly factor 1, axonemal homolog	2,79097684	0,005447882
dynein heavy chain	2,79065514	0,003894645
Beta chain spectrin	2,72494634	0,000318673
AAEL008607-PA	2,71628634	0,00167505
AAEL007874-PA	2,64535205	0,000898846
AAEL005967-PA	2,62218094	0,006973877
AAEL004317-PA	2,55126127	0,002034491
Dopachrome conversion enzyme	2,54474894	0,009906661
AAEL013249-PA	2,53928216	0,007194466
Methionine aminopeptidase 2	2,5334301	0,000909192
major sperm protein	2,47306569	0,005447882
AAEL014945-PB	2,45278549	0,007191147
adenosine diphosphatase	2,38946088	0,000827149
AAEL005930-PA	2,38138199	0,002142821
lamin, putative	2,37797864	0,001387072
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2,35404078	0,001425798
factor for adipocyte differentiation	2,33210437	0,000215885
AAEL004969-PA	2,29278819	0,000545844
AAEL008921-PA	2,27724838	0,003388375
sarcolemmal membrane-associated protein (LOC5563687), transcript variant X5, mRNA	2,26769765	5,68E-05
tubulin alpha chain	2,24870491	0,000871037
Dynein heavy chain	2,19986788	0,000845082
Na ⁺ /K ⁺ ATPase alpha subunit	2,19134712	0,003591535
Papilin	2,14285914	0,003828773
uncharacterized protein LOC5576059	2,13740285	0,002538243
myosin VI	2,04441961	0,004365283
chaperonin	2,01512527	0,004087351
Cellular retinaldehyde-binding protein	1,99748611	0,001292431
signal recognition particle receptor alpha subunit (sr-alpha)	1,98666128	0,00256852
AAEL003923-PA	1,95504951	0,001793
acyl-CoA oxidase	1,93787448	0,005587146
AAEL009248-PA	1,91870499	0,001539071
ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	1,89111074	0,002740383

aminoacyl-tRNA synthetase auxiliary protein, 43kD, putative	1,88083013	0,004977177
fragile X mental retardation syndrome-related protein 1, putative	1,87109121	0,004147766
Eukaryotic translation initiation factor 2A	1,84039625	0,003182388
Piwi-like protein	1,82453918	0,006709478
elongation factor -1 beta,delta	1,80909665	0,006674692
amidophosphoribosyltransferase	1,7875061	0,000871037
importin (ran-binding protein)	1,77449671	0,000846697
integral membrane pore glycoprotein gp210, putative	1,76902008	0,004047973
AAEL010241-PA	1,76809184	0,003263167
AAEL005877-PA	1,75956027	0,002034491
GTP-binding protein alpha subunit, gna; Succinate dehydrogenase, putative; nuclear pore complex protein Nup205	1,73068047	0,006709478
AAEL011604-PA	1,69355583	0,003719376
40S ribosomal protein S14	1,68965785	0,001436634
Acetyl-coa carboxylase	1,67453702	0,002142821
AAEL014734-PA	1,66885948	0,002740383
golgi-specific brefeldin a-resistance factor	1,63733228	0,007613963
AAEL008955-PA	1,59699567	0,001530814
AP-1 complex subunit gamma-1 isoform X5	1,564593	0,001515798
cytochrome C1 heme lyase	1,52207756	0,008885393
Heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein	1,50639598	0,00856039

Table 4

Proteins name	Fold change	q-value
Dynein heavy chain B	4,972900391	0,002513723
laminin A chain, putative	4,361797969	0,002736305
TITIN	4,001094818	0,001327332
AAEL003155-PA	3,93959109	0,001215445
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	3,701424281	0,002336787
NADP transhydrogenase	3,433649063	0,000363058
Laminin beta-2 chain	3,351154327	0,002492691
Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	3,228534063	0,001373215
Prohibitin, putative	3,143868764	0,001373215
Uncoordinated protein	3,056259155	0,002907372
AAEL008955-PA	3,042955399	0,001135679
Bcr-associated protein, bap	2,922562917	0,001373215
Papilin	2,917327245	0,001373215
AAEL008401-PA	2,820179621	0,000406877
V-type proton ATPase subunit a	2,770524979	0,000870728
AAEL005324-PA	2,726770401	0,001373215
AAEL011604-PA	2,702524821	0,002117534
Beta chain spectrin	2,697560628	0,001373215
Vacuolar protein sorting-associated protein (vps13)	2,658689499	0,004877517
V-type proton ATPase subunit a	2,552752177	0,000363058
Dynein heavy chain	2,484826406	0,002260831
AAEL005733-PB	2,483353933	0,005856755
Paramyosin, long form	2,444977442	0,001925452
talin	2,284149806	0,002513723
Fatty acid synthase	2,281726201	0,009530814
Cytochrome P450 6CB1	2,273615519	0,004430971
Beta-glucuronidase	2,182287852	0,000406877
Acetyl-coa carboxylase	2,109618505	0,002278683
AAEL004317-PA	2,060921987	0,005348676
Glutamate synthase	2,009794235	0,003351075
Macroglobulin/complement	1,935758591	0,002513723
Syntaxin binding protein-1,2,3	1,923182805	0,001327332
Nitrilase, putative	1,903219859	0,001373215
Dynein heavy chain	1,845780691	0,004877517
Yellow protein precursor; Dopachrome-conversion enzyme (DCE), putative	1,823533376	0,002492691
Axonemal dynein intermediate chain polypeptide	1,803876241	0,005382652
vinculin	1,765165965	0,000605183
glycogen synthase	1,758395513	0,000812309
AAEL010469-PA	1,741143545	0,001373215
xaa-pro aminopeptidase	1,680541992	0,004792197
Spectrin	1,645034154	0,001373215
Glycogen debranching enzyme	1,599978129	0,005348676
Thioredoxin Peroxidase.	1,599257787	0,001691125
AAEL005833-PA	1,59589386	0,002289612
Serine Protease Inhibitor (serpin) likely cleavage at V/V.	1,594215393	0,001925452
Alcohol dehydrogenase	1,583841324	0,005856755
autophagy related gene	1,575726191	0,005421148
AAEL017395-PA	1,561573029	0,005308491
Quinone oxidoreductase	1,54143397	0,004765268
AAEL000581-PA	1,531557083	0,00513662
munc13-4	1,527066549	0,005421148
aspartate ammonia lyase	1,503032684	0,001691125
mitochondrial brown fat uncoupling protein	1,502151489	0,001752311

Table 5

Proteins name	Fold change	q-value
AAEL017027-PA	-3,377414068	0,00167505
four and a half lim domains	-3,248955409	0,001661411
lipase	-3,22162056	0,000874606
C-Type Lectin (CTL).	-3,176440239	0,009895368
Angiotensin-converting enzyme	-3,11912473	0,000501413
vacuolar ATP synthase subunit e	-2,91387558	0,000827149
Yellow protein precursor; AAEL006985-PA	-2,898209254	0,001539071
metalloproteinase	-2,69218572	0,000846697
V-type proton ATPase subunit	-2,680917104	0,004455108
trypsin	-2,660788854	0,001539071
L-lactate dehydrogenase	-2,606413523	0,003182388
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-2,548154831	0,000871037
Annexin	-2,476945241	0,001045481
l-asparaginase i	-2,443617503	0,000871037
V-type proton ATPase subunit C	-2,366493225	0,00103801
Fibrinogen and fibronectin	-2,300355911	0,001436634
ATP synthase subunit beta vacuolar	-2,232177734	0,000174616
V-type proton ATPase catalytic subunit A (V-ATPase subunit A)(EC 3.6.3.14)(Vacuolar proton pump subunit alpha)(V-ATPase 69 kDa subunit)	-2,211226781	0,000871037
AAEL007204-PA	-2,190960566	0,004087351
malic enzyme	-2,156344732	0,000827149
acid phosphatase-1	-2,127244949	0,000247274
Carbonic anhydrase	-2,097652435	0,000827149
trypsin	-1,97299703	0,009950719
tubulointerstitial nephritis antigen	-1,969907761	0,004405583
dipeptidyl-peptidase	-1,912562688	0,000501413
glutamate dehydrogenase	-1,885698318	0,0010955
leukotriene a-4 hydrolase	-1,855912526	0,002142821
acyl-coa thioesterase	-1,84311676	0,00167505
leucine aminopeptidase	-1,833137512	0,00308491
Phosphotransferase; hexokinase	-1,779899597	0,002320317
Aspartate aminotransferase	-1,766687393	0,002115205
trypsin-beta, putative	-1,753846486	0,000895816
AMP dependent coa ligase	-1,751323064	0,001793
AAEL010725-PA	-1,659444809	0,000871037
zinc carboxypeptidase	-1,609937032	0,001079102
dihydrolipoamide dehydrogenase	-1,591477076	0,001425798
nitrilase, putative	-1,580956777	0,008393158
AAEL010824-PA	-1,569746017	0,00308491
AAEL017567-PA	-1,562995911	0,000902691
testis/ seletal muscle dual specificty phosphatase; Dual specificity protein phosphatase	-1,55288887	0,003009312
galactokinase	-1,551159541	0,006807078
NADH dehydrogenase, putative	-1,548820496	0,004251677
sphingomyelin phosphodiesterase	-1,548141479	0,007154426
vacuolar ATP synthase subunit S1	-1,514649073	0,005374942
succinyl-CoA ligase beta subunit	-1,511747996	0,001633746
alpha-glucosidase	-1,511022568	0,005887486
xaa-pro aminopeptidase	-1,506519953	0,000909192
Vacuolar H ⁺ -ATPase V1 sector subunit D; ATP synthase subunit d	-1,495845159	0,003864585
annexin x	-1,473130226	0,007194466
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	-1,470188141	0,0023517
AAEL017508-PA	-1,461917877	0,004087351
leucyl aminopeptidase, putative	-1,45282491	0,001793
Moesin/ezrin/radixin homolog 1	-1,422677994	0,001530814
cytochrome c oxidase, subunit VIA, putative	-1,407505671	0,003828988

Venom allergen	-1,407342911	0,009936737
dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase	-1,400737762	0,000871037
Alpha-1,4 glucan phosphorylase	-1,391147614	0,002291856
Glutamine synthetase	-1,387073517	0,006057153
actin; Pupal-specific flight muscle actin	-1,380600611	0,008258288
Serine Protease Inhibitor (serpin) likely cleavage at R/S	-1,370629628	0,004087351
glutamate carboxypeptidase	-1,337301254	0,007921681
Glycogen [starch] synthase	-1,33592097	0,005447882
Triosephosphate isomerase	-1,322539012	0,007213964
xaa-pro dipeptidase pepd/pepq(e.coli)	-1,289487839	0,00308491
vinculin	-1,289102554	0,007590953
NADH:ubiquinone dehydrogenase, putative	-1,285118103	0,006807078
glutamate dehydrogenase	-1,27106603	0,007068336
CTP synthase	-1,265778542	0,006545267
Pyruvate dehydrogenase	-1,238882065	0,003088215
zinc binding dehydrogenase	-1,236064275	0,004262743
aspartyl-tRNA synthetase	-1,206522624	0,007191147
AAEL010469-PA	-1,180569331	0,00139282
AAEL003122-PA	-1,180187861	0,002112035
Aconitate hydratase, mitochondrial; aconitase, mitochondrial	-1,172152201	0,002503844
axonemal dynein intermediate chain	-1,166492462	0,004241535
NADP-specific isocitrate dehydrogenase	-1,13035202	0,003417138
arginine or creatine kinase	-1,118742625	0,0094337
AAEL008428-PA	-1,057209015	0,00308491
AAEL004001-PA	-1,049719493	0,006363641
sideroflexin 1,2,3	-1,037056605	0,00563014
Multifunctional fusion protein	-1,033042908	0,002851039
AAEL009705-PA	-1,015590032	0,005500263
TENSIN	-1,003264109	0,004536657
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-1,000230153	0,007068336
alanine aminotransferase	-0,984095891	0,004365283
bleomycin hydrolase	-0,953379631	0,006674692
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	-0,953241348	0,000999828
succinate semialdehyde dehydrogenase	-0,944044113	0,009878898
GTP-binding protein (o) alpha subunit, gnao	-0,935737292	0,009509238
cytochrome C1	-0,935281118	0,00728462
trifunctional enzyme beta subunit (tp-beta)	-0,93421491	0,007590953
NADH-ubiquinone oxidoreductase fe-s protein 2 (ndufs2)	-0,933386485	0,001539071
glutamate dehydrogenase	-0,899927139	0,004670689
proline oxidase	-0,89956665	0,003719376
Mitochondrial processing peptidase beta subunit	-0,89372317	0,00660793
NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B14.5b	-0,891959508	0,004788423
ATP synthase alpha subunit mitochondrial	-0,884482066	0,003686925
glutamyl aminopeptidase	-0,867636998	0,008263397
fasciclin, putative	-0,860680898	0,001633746
2-oxoglutarate dehydrogenase	-0,855935415	0,005320562
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2	-0,850896835	0,005933833
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-0,833293915	0,004977177
isocitrate dehydrogenase	-0,831341426	0,005500263
NADH:ubiquinone dehydrogenase, putative	-0,826426824	0,000827149
NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kda subunit	-0,809366226	0,007450353
NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kda subunit	-0,804964701	0,003850319
ATP synthase coupling factor B, putative	-0,743819555	0,006401025
carboxylase:pyruvate/acetyl-coa/propionyl-coa	-0,736443837	0,004087351
alpha-actinin	-0,721841812	0,006217865
AAEL010149-PA	-0,698705673	0,009373913
cysteine desulfurylase [	-0,689352671	0,005628049
protease m1 zinc metalloprotease	-0,674489339	0,00563014

Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	-0,669711431	0,001793
disulfide oxidoreductase	-0,652697245	0,006363641
AAEL010639-PA	-0,648869832	0,007590953
vesicular-fusion protein nsf	-0,627127965	0,009936737
AAEL003501-PA	-0,589712143	0,005098216
UDP-glucose 4-epimerase	-0,561597824	0,009515833
rab5	-0,541542053	0,005887486
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	-0,538169861	0,009936737
gamma-glutamyltranspeptidase 1 isoform X2	-0,519804637	0,008221397
Flotillin-1	-0,487045924	0,006729908
serine/threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit a	-0,452641805	0,006363641
troponin t, invertebrate	-0,437512716	0,004788423
ADP,ATP carrier protein	-0,398113251	0,002142821

Table 6

Proteins name	Fold change	q-value
AAEL017315-PA	-2,052459717	0,002092943
Nucleosome assembly protein	-6,665581385	0,000425357
tubulin alpha chain	-4,143220901	0,00107371
Tubulin alpha chain	-4,06832091	0,002821157
60S ribosomal protein L23	-3,815748851	0,000834551
40S ribosomal protein S20	-3,05672582	0,000812309
ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	-3,023873011	0,001327332
prolyl 4-hydroxylase alpha subunit 1	-2,972454071	0,001373215
60S ribosomal protein L9	-2,809101741	0,003893154
40S ribosomal protein S15	-2,794635773	0,003696356
glutathione transferase	-2,693196615	0,001327332
trypsin, putative	-2,683225632	0,000870728
asparagine synthetase	-2,6718057	0,001373215
40S ribosomal protein S17	-2,66033872	0,001925452
Polyadenylate-binding protein	-2,634084066	0,000425357
40S ribosomal protein SA	-2,520755768	0,001373215
heat shock protein	-2,513536453	0,000406877
T-complex protein 1 subunit delta;chaperonin	-2,471502304	0,001145992
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K (eIF3k)(eIF-3 p25	-2,414110502	0,004202396
40S ribosomal protein S3a	-2,387783051	0,001373215
40S ribosomal protein S18	-2,369381587	0,001029338
40S ribosomal protein S10	-2,366860708	0,004997803
Carboxypeptidase	-2,343358994	0,00107371
importin beta-2	-2,308134079	0,00967444
succinyl-CoA synthetase small subunit, putative	-2,264795939	0,003765537
trypsin	-2,263111115	0,001373215
60S ribosomal protein LP0	-2,23246638	0,002821157
guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	-2,203877131	0,001776021
importin beta-1	-2,095422745	0,003696356
dj-1 protein (park7)	-2,071681341	0,002887356
protein disulfide isomerase	-2,056668599	0,00133523
voltage-dependent anion-selective channel-like	-2,055232366	0,003806659
Glycoprotein 25l	-2,044786453	0,004714533
40S ribosomal protein S2	-2,040818532	0,001373215
cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	-2,036479314	0,002513723
AAEL007144-PA	-2,02583758	0,002117534
chaperonin	-1,995811462	0,000605183
rab gdp-dissociation inhibitor	-1,957930883	0,000834551
40S ribosomal protein S15a	-1,948081334	0,004253472
Proteasome subunit alpha type;26S proteasome alpha 3 subunit	-1,947715123	0,001373215
cytochrome C1 heme lyase	-1,933166504	0,002059439
40S ribosomal protein S16	-1,922710419	0,000834551
RuvB-like helicase 1 (EC 3.6.4.12) (Pontin)	-1,913005829	0,002578632
leucine aminopeptidase	-1,904381434	0,002907372
Piwi-like protein	-1,89738973	0,004009155
40S ribosomal protein S25	-1,821514765	0,001920904
AAEL011838-PA	-1,793931961	0,002092943
Failed axon connections protein, putative	-1,785931269	0,0070504
Elongation factor 1-alpha	-1,773232142	0,002902678
DNAJ homolog subfamily B member, putative	-1,735424678	0,00737723
ras-related protein Rab-1A, putative	-1,718411764	0,000886019
proteasome subunit beta type	-1,712252299	0,005034892
elongation factor 1 gamma	-1,682434082	0,008573484
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	-1,664737066	0,001752311
metalloprotease	-1,641350428	0,00062153
eukaryotic translation elongation factor	-1,622009913	0,002534445

spermatogenesis associated factor	-1,597761154	0,001327332
proteasome subunit beta type	-1,583649317	0,000605183
NADH-ubiquinone oxidoreductase sgdh subunit	-1,582719167	0,004714533
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	-1,566459656	0,001968792
casein kinase ii, alpha chain (cmgc group iv)	-1,563388824	0,001722667
Superoxide dismutase	-1,515783946	0,001373215
Histone H4	-1,514701843	0,008283017
protein disulfide isomerase	-1,501586914	0,001691125
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	-1,49429512	0,001373215
DEAD box ATP-dependent RNA helicase	-1,476029078	0,001373215
endoplasmic	-1,458701452	0,001925096
ubiquitin conjugating enzyme, putative	-1,431594849	0,001373215
proteasome subunit beta type	-1,403291066	0,005361953
RuvB-like helicase 2 (EC 3.6.4.12)(Reptin)	-1,383720398	0,001373215
Serine/threonine-protein phosphatase	-1,344454447	0,002750356
Heat shock cognate 70	-1,343947093	0,005361953
coatamer delta subunit	-1,332120895	0,002750356
phosphatidylethanolamine-binding protein	-1,321664174	0,002907372
DEAD box ATP-dependent RNA helicase	-1,295282364	0,003765537
26S protease regulatory subunit 6a	-1,292219798	0,008333581
Ubiquitin; Ubiquitin (ribosomal protein L40)	-1,251943588	0,003783696
60S ribosomal protein L5	-1,246448517	0,006524023
serine/threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit a	-1,193288167	0,00380224
leucine aminopeptidase	-1,170444489	0,008312029
AAEL003750-PA	-1,16938591	0,000605183
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	-1,167293549	0,005199675
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1,162150701	0,004877517
T-complex protein 1 subunit gamma; chaperonin	-1,159546534	0,001752311
60S ribosomal protein L10	-1,159257253	0,005348676
myosin light chain 1,	-1,147147497	0,006652977
chaperonin	-1,111684799	0,003765537
chaperonin-60kD, ch60	-1,073817571	0,002278683
AAEL011059-PA	-1,070713043	0,00868126
nucleoside-diphosphate kinase NBR-A, putative	-1,066146851	0,008085707
Tubulin beta chain	-1,046627045	0,000947705
Chaperonin	-1,013264338	0,007477779
Histone H2A	-1,00468572	0,002736305
fibrillarin	-0,987267812	0,005748497
actin	-0,936597188	0,006850722
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	-0,934862773	0,003502437
purine biosynthesis protein 6, pur6	-0,9203523	0,005348676
arginine or creatine kinase	-0,901555379	0,002421214
arginine or creatine kinase	-0,893209457	0,006813824
Aspartate aminotransferase	-0,862038294	0,001373215
DEAD box ATP-dependent RNA helicase	-0,853014628	0,003489291
Fibrinogen and fibronectin	-0,850070953	0,008085707
ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein	-0,812016805	0,005421148
leucyl aminopeptidase, putative	-0,811953227	0,002750356
Tubulin alpha chain	-0,784057617	0,001691125
importin beta-3	-0,732699712	0,003765537
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	-0,688058853	0,006524023
bifunctional purine biosynthesis protein	-0,666837056	0,005701386
ATP synthase subunit alpha	-0,642532349	0,004834625
aldehyde dehydrogenase	-0,639318466	0,008811664
AAEL007082-PA	-0,596423467	0,001691125
aspartyl-tRNA synthetase	-0,382659276	0,008901598
malic enzyme	-0,303235372	0,001373215
26S protease (S4) regulatory subunit, putative	0,296156565	0,002750356

glutaminyl-tRNA synthetase	0,354902267	0,009654254
----------------------------	-------------	-------------

5 CONCLUSÕES

a) A exposição de pupas a dose equivalente a 50 Gy não altera a biometria de pupas e mosquitos machos adultos;

b) A exposição a dose equivalente a 50Gy durante a fase de pupas afeta a capacidade espermática ao longo da vida adulta do mosquito,

c) A distribuição de comprimento dos espermatozoides de machos adultos não é alterada após exposição de pupas a 50 Gy;

d) A exposição de pupas a dose equivalente a 50 Gy altera a morfologia testicular na ao longo do ciclo de vida adulta de *Aedes aegypti*;

e) Exposição de pupas à radiação ionizantes induz altas taxas de esterilidade durante a vida adulta de mosquitos machos com efeitos de redução acima de 90% na viabilidade de ovos;

f) A exposição da pupa de *A. aegypti* promove a expressão diferencial de genes ao longo da vida adulta do mosquito macho, com regulação positiva e negativa dos transcritos de codificação de proteínas relacionados à espermatogênese;

g) Os resultados encontrados neste estudo trazem fortes evidencias de que os mosquitos similares à RecL, com 1 dia após emergência, irradiados durante a fase de pupa apresentam-se como melhor alternativa para soltura nos protocolos de libração da TIE;

h) O conjunto de informações geradas neste estudo sobre a biologia do desenvolvimento, biologia reprodutiva e aspectos funcionais do sistema reprodutor do macho estéril são de grande relevância para a aplicação da técnica do macho estéril para o controle local das populações de *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ADLAKHA, Vimla; PILLAI, M. K. K. Involvement of male accessory gland substance in the fertility of mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 21, n. 8, p. 1453-1455, 1975.
- ALFONSO-PARRA, Catalina *et al.* Synthesis, depletion and cell-type expression of a protein from the male accessory glands of the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 70, p. 117-124, 2014.
- ALPHEY, Luke. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1243-1247, 2002.
- AMORATI, Riccardo *et al.* Peroxyl radical reactions in water solution: A gym for proton-coupled electron-transfer theories. **Chemistry**, v. 22, n. 23, p. 7924-7934, 2016.
- ATTRI, Pankaj *et al.* Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. **Scientific reports**, v. 5, p. 9332, 2015.
- AVILA, Frank W. *et al.* Insect seminal fluid proteins: identification and function. **Annual review of entomology**, v. 56, p. 21-40, 2011.
- BAKRI, A.; MEHTA, K.; LANCE, D. R. Sterilizing insects with ionizing radiation. *In*: DICK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (ed.). **Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 233-268.
- BALESTRINO, F. *et al.* Gamma ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 4, p. 581-591, 2010.
- BARAIBAR, Martin A. *et al.* Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, n. 919832, 2012.
- BECKER, N. *et al.* **Mosquitoes and their control**. New York: Plenum Publishers, 2003.
- BELLINI, R. *et al.* Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 2, p. 317-325, 2013.
- BENEDICT, Mark Q. *et al.* Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. **Vector-borne and zoonotic Diseases**, v. 7, n. 1, p. 76-85, 2007.
- BLOEM, Stephanie; BLOEM, K. A.; FIELDING, L. S. Mass-rearing and storing codling moth larvae in diapause: a novel approach to increase production for sterile insect release. **Journal of the Entomological Society of British Columbia**, v. 94, p. 75-82, 1997.
- BOND, J. Guillermo *et al.* Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in a sterile insect technique program. **PloS One**, v. 14, n. 2, p. e0212520, 2019.
- BRAACK, Leo *et al.* Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 29, 2018.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRONZATO, Aline Ribeiro. **Análise da estrutura populacional de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em algumas regiões do Brasil**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.

BRONZINI, I. *et al.* DNA methylation and targeted sequencing of methyltransferases family genes in canine acute myeloid leukaemia, modelling human myeloid leukaemia. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 3, p. 910-918, 2017.

BROOKS, Antone L. Paradigm shifts in radiation biology: their impact on intervention for radiation-induced disease. **Radiation Research**, v. 164, n. 4, p. 454-461, 2005.

BROWN, Julia E. *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘domestications’ of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1717, p. 2446-2454, 2011.

BRYANT, Juliet E.; HOLMES, Edward C.; BARRETT, Alan D. T. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

BUONANNO, Manuela *et al.* Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress. **Radiation research**, v. 175, n. 4, p. 405-415, 2011.

BUSHLAND, R. C. Male sterilization for the control of insects. In: METCALF, R. L. (ed.). **Advances in pest control research**. New York: Interscience Publishers, 1960. p. 1-25.

BUSHLAND, R. C.; HOPKINS, D. E. Sterilization of Screw-worm Flies with X-rays and Gamma-rays. **Journal of Economic Entomology**, v. 46, n. 4, p. 648-656, 1953.

CADET, Jean; DOUKI, Thierry; RAVANAT, Jean-Luc. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. **Mutation Research**, v. 711, n. 1-2, p. 3-12, 2011.

CAGLIOTI, Claudia *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 211-227, 2013.

CASSANO, Paolo *et al.* Review of transcranial photobiomodulation for major depressive disorder: targeting brain metabolism, inflammation, oxidative stress, and neurogenesis. **Neurophotronics**, v. 3, n. 3, p. 031404, 2016.

CHAPMAN, Reginald Frederick. **The insects: structure and function**. Cambridge university press, 1998.

CHARREL, R. N.; LAMBALLERIE, X.; RAOULT, D. Chikungunya outbreaks-the globalization of vectorborne diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 8, p. 769-771, 2007.

CHOMPOOSRI, Jakkrawarn *et al.* Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 227, 2016.

CHRISTIAN, Kira A. *et al.* What We Are Watching-Top Global Infectious Disease Threats, 2013-2016: An Update from CDC's Global Disease Detection Operations Center. **Health security**, v. 15, n. 5, p. 453-462, 2017.

CHRISTOPHERS, S. R. ***Aedes aegypti* (L.)**: The yellow fever mosquito. London: Cambridge University Press, 1960.

CHRISTOPHERS, S. R. The male Genitalia of Anopheles. **Indian Journal of Medical Research**, v. 3, n. 2, p. 371-394, 1915.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes. Volume 1**: development, nutrition and reproduction. New York: Chapman & Hall, 1992.

CLEMENTS, A. N.; POTTER, S. A. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 13, n. 12, p. 1825-1828, 1967.

COELHO, Giovanini Evelim. Dengue: desafios atuais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 231-233, 2008.

COFFEY, Lark L.; FAILLOUX, Anna-Bella; WEAVER, Scott C. Chikungunya virus–vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014.

COLMANT, Agathe M. G. *et al.* A new clade of insect-specific flaviviruses from Australian Anopheles mosquitoes displays species-specific host restriction. **mSphere**, v. 2, n. 4, p. e00262-17, 2017.

CONSOLI, Rotraut A. G. B.; OLIVEIRA, Ricardo L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

CRAMPTON, G. C. Guide to the insects of Connecticut, Part VI: The Diptera or true flies of Connecticut. First Fascicle. The external morphology of the Diptera. **Bulletin of the Connecticut State Geological and Natural History Survey**, v. 64, p. 10-165, 1942.

CRAMPTON, G. C. Remarks on the basic plan of the terminal abdominal structures of the males of winged insects. **The Canadian Entomologist**, v. 52, n. 8, p. 178-183, 1920.

CRUZ-LANDIM, Carminda. **Biologia do desenvolvimento em abelhas**. Rio Claro: Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, 2004.

DE MELO SANTOS, Maria Alice Varjal *et al.* Tecnologias integradas para controle biológico, mecânico e genético de *Aedes aegypti*. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 28, n. 01, p. 58-63, 2017.

DEGNER, Ethan C.; HARRINGTON, Laura C. A mosquito sperm's journey from male ejaculate to egg: Mechanisms, molecules, and methods for exploration. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 10, p. 897-911, 2016.

DHAR-CHOWDHURY, Parnali *et al.* Socioeconomic and ecological factors influencing *Aedes aegypti* prevalence, abundance, and distribution in Dhaka, Bangladesh. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1223-1233, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DOWNE, A. E. Internal regulation of rate of digestion of blood meals in the mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 21, n. 11, p. 1835-1839, 1975.

DUMSER, J. Brian. The regulation of spermatogenesis in insects. **Annual review of entomology**, v. 25, n. 1, p. 341-369, 1980.

DUTRA, Heverton Leandro Carneiro *et al.* From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of Wolbachia in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003689, 2015.

DUVALL, Laura B. *et al.* A neuropeptide signaling system that rapidly enforces paternity in the *Aedes aegypti* mosquito. **BioRxiv**, p. 136150, 2017.

DYCK, V. A. *et al.* Public relations and political support in area-wide integrated pest management programmes that integrate the sterile insect technique. *In*: DICK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (ed.) **Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 547-559.

EDWARDS, F. W. The nomenclature of the parts of the male hypopygium of Diptera nematocera, with special reference to mosquitoes. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 14, n. 1, p. 23-40, 1920.

ELLIOTT, R. M. Bunyaviruses and climate change. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 6, p. 510-517, 2009.

EL-SONBATY, S. M.; GABARTY, A.; IBRAHIM, A. A. Hematological and Protein Response of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) to Gamma Radiation and the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 26, n. 1, p. 127-137, 2016.

ENKERLIN, W. R. Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. *In*: Sterile Insect Technique. *In*: DICK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (ed.) **Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 651-676.

ENSERINK, Martin. Chikungunya: no longer a third world disease. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1860-1861, 2007.

ESCH, Tobias *et al.* Stress-related diseases--a potential role for nitric oxide. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 6, p. RA103-RA118, 2002.

FIGUEIRÓ, Ana Cláudia *et al.* Análise da lógica de intervenção do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Rev. bras. saúde mater. infant**, v. 10, n. supl. 1, p. s93-s106, 2010.

- FINKEL, Toren. Reactive oxygen species and signal transduction. **IUBMB life**, v. 52, n. 1-2, p. 3-6, 2001.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 2002. 864 p.
- FREEBORN, Stanley Barron. The Terminal Abdominal Structures of Male Mosquitoes. **American Journal of Hygiene**, v. 4, n. 3, p. 188-212, 1924.
- GEORGAKILAS, Alexandros G. *et al.* Measurement of Oxidatively-Induced Clustered DNA Lesions Using a Novel Adaptation of Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). **Current protocols in cell biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 2010.
- GERMAIN, Max *et al.* Recent advances in research regarding sylvatic yellow fever in West and Central Africa. **Bull Inst Pasteur**, v. 80, p. 315-30, 1982.
- GIGLIOLI, M. E. C. The Female Reproductive System of *Anopheles gambiae* mêlas. I. The Structure and Function of the Genital Ducts and Associated Organs. **Riv. di Malariaologia**, v. 42, n. 4/6, p. 149-176, 1963.
- GLASSER, Carmen Moreno; GOMES, Almério de Castro. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 166-172, 2002.
- GLIGOROV, Dragan *et al.* A novel function for the Hox gene Abd-B in the male accessory gland regulates the long-term female post-mating response in *Drosophila*. **PLoS genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003395, 2013.
- GONZÁLEZ, Cayetano; TAVOSANIS, Gaia; MOLLINARI, Cristiana. Centrosomes and microtubule organisation during *Drosophila* development. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 18, p. 2697-2706, 1998.
- GOTTARDO, Marco; MERCATI, David; DALLAI, Romano. The spermatogenesis and sperm structure of *Timema poppensis* (Insecta: Phasmatodea). **Zoomorphology**, v. 131, n. 3, p. 209-223, 2012.
- GOULD, Ernest A. *et al.* Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Adv Virus Res**, v. 57, p. 71-103, 2001.
- GOULD, Ernest A. *et al.* Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 277-314, 2003.
- GOULD, Ernest A.; HIGGS, Stephen. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 109-121, 2009.
- GRAHAM, Owen Hugh. Miscellaneous Publications. *In*: Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico, 62., 1985, College Park, MD, USA: Entomological Society of America, 1985. p. 1-68.
- GUBLER, Duane J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M. El Programa Moscas de la Fruta em México. In: MONTTOYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. (ed.). **Moscas de la Fruta**: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. México, D.F.: S y G editores, 2010.

GWADZ, Robert W.; CRAIG JR, George B.; HICKEY, William A. Female sexual behavior as the mechanism rendering *Aedes aegypti* refractory to insemination. **The Biological Bulletin**, v. 140, n. 2, p. 201-214, 1971.

HADDOW, Andrew D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HALL, Eric J.; GIACCIA, Amato J. Radiobiology for the Radiologist. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 66, n. 2, p. 627, 2006

HELINSKI, Michelle E. H. *et al.* Duration and dose-dependency of female sexual receptivity responses to seminal fluid proteins in *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 10, p. 1307-1313, 2012.

HELINSKI, Michelle E. H.; EL-SAYED, Badria; KNOLS, Bart G. J. The Sterile Insect Technique: can es-tablished technology beat malaria? **Entomologische Berichten**, v. 66, n. 1, p. 13-20, 2006.

HELINSKI, Michelle E. H.; HARRINGTON, Laura C. Considerations for male fitness in successful genetic vector control programs. In: TAKKEN, Willem; KOENRAADT, Constantianus J. M. (ed.). Ecology of parasite-vector interactions. **Ecology and control of vector-borne diseases**, v. 3. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2013. p. 221-244.

HELINSKI, Michelle E. H.; KNOLS, Bart G. J. Mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* mosquitoes irradiated with a partially or fully sterilizing dose in small and large laboratory cages. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 4, p. 698-705, 2008.

HELINSKI, Michelle E. H.; PARKER, Andrew G.; KNOLS, Bart G. J. Radiation biology of mosquitoes. **Malaria journal**, v. 8, n. 2, p. S6, 2009.

HOAGE, T. R.; KESSEL, R. G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. **Journal of ultrastructure research**, v. 24, n. 1-2, p. 6-32, 1968.

HODAPP, Cyril J.; JONES, Jack Colvard. The anatomy of the adult male reproduction system of *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera, Culicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, n. 6, p. 832-844, 1961.

HOLMES, Edward C.; TWIDDY, S. Susanna. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, genetics and evolution**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2003.

HUANG, Yan-Jang S. *et al.* Flavivirus-mosquito interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703-4730, 2014.

IBTEN. CENTRO DE DOCUMENTACIÓN NUCLEAR. **Irradiadores industriales-dosimetría**: Centro de protección y seguridad radiológica. IBTEN, 2013. Disponível em: <https://slideplayer.es/slide/1024965/>. Acesso em: 15/07/2019.

I-CHING, S. *et al.* Updates on chikungunya epidemiology, clinical disease, and diagnostics. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 15, n. 4, p. 223-230, 2015.

IOOS, Sophie *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302-307, 2014.

ISHAK, Intan H. *et al.* Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 181, 2015.

ISLAM, Muhammad Torequl. Radiation interactions with biological systems. **International journal of radiation biology**, v. 93, n. 5, p. 487-493, 2017.

ITO, Yosiaki *et al.* Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, from Okinawa, Japan, by means of the sterile insect technique, with special emphasis on the role of basic studies. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 6, n. 2, p. 119-129, 2003.

JONES, Jack Colvard; WHEELER, Ronald E. Studies on spermathecal filling in *Aedes aegypti* (Linnaeus). I. Description. **The Biological Bulletin**, v. 129, n. 1, p. 134-150, 1965.

JOUANNIC, Jean-Marie *et al.* Zika virus infection in French Polynesia. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1051-1052, 2016.

JUDSON, Charles L. Feeding and oviposition behavior in the mosquito *Aedes aegypti* (L.). I. Preliminary studies of physiological control mechanisms. **The Biological Bulletin**, v. 133, n. 2, p. 369-377, 1967.

JUPP, Peter G. **Mosquitoes of Southern Africa**: culicinae and toxorhynchitinae. Ekogilde Publishers, 1996.

KAHANDA, Dimithree *et al.* Using DNA devices to track anticancer drug activity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 647-653, 2016.

KAMAL, Mahmoud *et al.* Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0210122, 2018.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F. History of the sterile insect technique. In: DICK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (ed.). **Sterile Insect Technique**: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Dordrecht: Springer, 2005. p. 3-36.

KLOWDEN, Marc J. **Physiological systems in insects**. Academic Press, 2013.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 4, p. 459-462, 1955.

KRAEMER, Moritz U. G. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, v. 4, p. e08347, 2015.

KRAFSUR, Elliot S.; JONES, Jack Colvard. Spermiogenesis in *Aedes aegypti* (L.). **Cytologia**, v. 32, n. 3-4, p. 450-462, 1967.

KRYSTON, Thomas B. *et al.* Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

LANCIOTTI, Robert S. *et al.* Phylogeny of Zika virus in western hemisphere, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 5, p. 933, 2016.

LEAKE, C. J. Arbovirus-mosquito interactions and vector specificity. **Parasitology Today**, v. 8, n. 4, p. 123-128, 1992.

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

LINDAHL, Tomas. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709-715, 1993.

LINDQUIST, D. A. *et al.* Current status and future prospects for genetic methods of insect control or eradication. In: CASIDA, J. E. (ed.). **Pesticides and Alternatives**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 69-88.

LOVREGLIO, Piero *et al.* Evaluation of chromosome aberration and micronucleus frequencies in blood lymphocytes of workers exposed to low concentrations of benzene. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 770, p. 55-60, 2014.

MACK, Paul D.; PRIEST, Nicholas K.; PROMISLOW, Daniel E. L. Female age and sperm competition: last-male precedence declines as female age increases. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1511, p. 159-165, 2003.

MAHMOOD, Farida; REISEN, William K. Anopheles culicifacies: effects of age on the male reproductive system and mating ability of virgin adult mosquitoes. **Medical and veterinary entomology**, v. 8, n. 1, p. 31-37, 1994.

MARCOMBE, Sébastien *et al.* Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101992, 2014.

MARTIN, Olga A. *et al.* Systemic DNA damage related to cancer. **Cancer research**, v. 71, n. 10, p. 3437-3441, 2011.

MARTINS, Victor Emanuel Pessoa *et al.* Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e41386, 2012.

MASTRANGELO, Thiago; WALDER, Julio. Use of radiation and isotopes in insects. In: SINGH, Nirmal (ed.). **Radioisotopes–Applications in Bio-Medical Science**. IntechOpen, 2011. p. 67-92.

- MCINTOSH, B. M. *et al.* Isolation of Spondweni virus from four species of culicine mosquitoes and a report of two laboratory infections with the virus. **South African Medical Journal**, v. 35, n. 8, p. 647-650, 1961.
- MCNEILL, John Robert. **Mosquito empires: ecology and war in the Greater Caribbean, 1620-1914**. Cambridge University Press, 2010.
- MEDLOCK, J. M. *et al.* An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. **Bulletin of entomological research**, v. 105, n. 6, p. 637-663, 2015.
- MEEGAN, James M. *et al.* **Yellow fever vaccine**. World Health Organization, 1991.
- MESSINA, Jane P. *et al.* Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.
- MEUTI, Megan E.; SHORT, Sarah M. Physiological and environmental factors affecting the composition of the ejaculate in mosquitoes and other insects. **Insects**, v. 10, n. 3, p. E74, 2019.
- MOORE, Michelle *et al.* Dual African origins of global *Aedes aegypti* sl populations revealed by mitochondrial DNA. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 4, p. e2175, 2013.
- MOREIRA-SOTO, Andres *et al.* Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 9, p. 1019. e1-1019. e4, 2018.
- MOULD, Richard Francis. **A century of X-rays and radioactivity in medicine: with emphasis on photographic records of the early years**. CRC Press, 1993.
- MOUREAU, Gregory *et al.* New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117849, 2015.
- MUBARQUI, Ruben Leal *et al.* The smart aerial release machine, a universal system for applying the sterile insect technique. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103077, 2014.
- MULLER, Hermann Joseph. Artificial transmutation of the gene. *Science*, v. 66, n. 1699, p. 84-87, 1927.
- NATVIG, Leif Reinhardt. Contributions to the Knowledge of the Danish and Fennoscandian Mosquitoes: Cullcini. **Norsk Entomologisk Tidsskrift Suppl**, v. 1, 1948.
- NAVARRO, Marcus Vinicius Teixeira *et al.* Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 15, n. 4, p. 1039-1047, 2008.
- NOUAILHETAS, Yannick *et al.* **Radiações Ionizantes e a vida**. Rio de Janeiro: CNEN, 2005.
- OLIVA, Luciana *et al.* Quiescence in *Aedes aegypti*: Interpopulation Differences Contribute to Population Dynamics and Vectorial Capacity. **Insects**, v. 9, n. 3, p. E111, 2018.

OLIVEIRA, Soraia L.; CARVALHO, Danilo O.; CAPURRO, Margareth L. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. **Revista da Biologia**, v. 6, n. 2, p. 38-43, 2011.

PAIXÃO, Enny S.; TEIXEIRA, Maria Gloria; RODRIGUES, Laura C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ global health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, 2018.

PAPATHANOS, Philippos A. *et al.* Sex separation strategies: past experience and new approaches. **Malaria journal**, v. 8, n. 2, p. S5, 2009.

PARKER, Andrew; MEHTA, Kishor. Sterile insect technique: a model for dose optimization for improved sterile insect quality. **Florida entomologist**, v. 90, n. 1, p. 88-96, 2007.

PASCINI, T. V.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; MARTINS, G. F. Morphological and morphometrical assessment of spermathecae of *Aedes aegypti* females. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 705-712, 2012.

PASCINI, T. V.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; MARTINS, G. F. The fine structure of the spermatheca in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Annals of the Entomological society of America**, v. 106, n. 6, p. 857-867, 2013.

PETERSEN, Lyle R. *et al.* Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, 2016.

PHUC, Hoang Kim *et al.* Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC biology**, v. 5, n. 1, p. 11, 2007.

PONLAWAT, Alongkot; HARRINGTON, Laura C. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 422-426, 2007.

POWERS, Ann M. *et al.* Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471-479, 2000.

PRASHAD, Baini. Male Generative organs of some Indian Mosquitos. **Indian Journal of Medical Research**, v. 3, n. 3, p. 497-502, 1916.

RAMALINGAM, S.; CRAIG, G. B. Functions of the male accessory gland secretions of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae): transplantation studies. **The Canadian Entomologist**, v. 108, n. 9, p. 955-960, 1976.

REGIS, Lêda N. *et al.* Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67682, 2013.

REITER, Paul; AMADOR, Manuel A.; COLON, Nelson. Enhancement of the cdc ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **J Am Mosq Control Assoc.**, v. 7, n. 1, p. 52-55, 1991.

RICCI, Irene *et al.* Symbiotic control of mosquito borne disease. **Pathogens and global health**, v. 106, n. 7, p. 380-385, 2012.

ROBINSON, A. S. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. **Genetica**, v. 116, n. 1, p. 5-13, 2002

ROSEN, Leon. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 39, n. 1, p. 123-126, 1988.

RUNNER, G. A. Effect of röntgen rays on the tobacco, or cigarette beetle and the results of experiments with a new form of röntgen tube. **Journal of agricultural research**, v. 6, n. 11, p. 383-388, 1916.

SAHIN, Ergün *et al.* Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. **Nature**, v. 470, n. 7334, p. 359-365, 2011.

SCHAFFNER, Francis; MATHIS, Alexander. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1271-1280, 2014.

SCHMITT, R.; DIETRICH, B.; POLLMANNS, S. Virtual flight through the workpiece-3D-quality assurance by means of x-ray computer tomography. *In: International Coll. on Surfaces*, 12., 2008, Chemnitz. **Proceedings** [...]. Chemnitz, Germany, 28-29 January 2008. p. 336-345.

SCHOFIELD, C. J. Vector population responses to control interventions. **Ann Soc Belg Med Trop**, v. 71, n. Suppl 1, p. 201-217, 1991.

SEDELNIKOVA, Olga A. *et al.* Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutation Research**, v. 704, n. 1-3, p. 152-159, 2010.

SEMENZA, Jan C. *et al.* International dispersal of dengue through air travel: importation risk for Europe. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 12, p. e3278, 2014.

SINGH, Anil Kumar *et al.* Vertical transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* mosquitoes from northern India. **Defence Life Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 184-187, 2016.

SINKINS, Steven P. Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 7, p. 723-729, 2004.

SIROT, Laura K. *et al.* Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 2, p. 176-189, 2008.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. New York and London: McGraw-Hill Book Company, 1935, 667 p.

SNODGRASS, R. E. **The anatomical life of the mosquito**. Smithsonian Miscellaneous Collections, 1959.

SPIELMAN, Andrew. The mechanics of copulation in *Aedes aegypti*. **The Biological Bulletin**, v. 127, n. 2, p. 324-344, 1964.

SPIELMAN, Andrew; D'ANTONIO, Michael. **Mosquito: a natural history of our most persistent and deadly foe**. Hyperion, 2001

STERNICZUK, Marcin; BARTELS, David M. Source of molecular hydrogen in high-temperature water radiolysis. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 2, p. 200-209, 2016.

SULLI, Gabriele; DI MICCO, Raffaella; DI FAGAGNA, Fabrizio d'Adda. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 10, p. 709-720, 2012.

THEOBALD, Frederick Vincent. **A Monograph of the Culicidae, Or Mosquitoes**: Mainly Compiled from the Collections Received at the British Museum from Various Parts of the World in Connection with the Investigation Into the Cause of Malaria Conducted by the Colonial Office and the Royal Society. London: Print by order of the Trustees, 1907.

TICHELER, J. *et al.* Field experiments with the release of sterilized onion flies, *Hylemya antiqua* (Meig.). In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **The sterile-insect technique and its field applications**. Austria: IAEA, 1974.

TOLEDO, Jorge *et al.* Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. **Journal of economic entomology**, v. 97, n. 2, p. 383-389, 2004.

TOWNSON, Harold; NATHAN, Michael B. Resurgence of chikungunya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 308-309, 2008.

TROUPIN, Andrea; GRIPPIN, Crystal; COLPITTS, Tonya M. Flavivirus Pathogenesis in the Mosquito Transmission Vector. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 4, n. 3, p. 115-123, 2017.

UNITED NATIONS. Departament of Economic and Social Affairs (DESA). **World population prospects: the 2012 revision**. Population division of the department of economic and social affairs of the United Nations Secretariat. New York: DESA, 2013.

VARGAS-TERÁN, M.; HOFMANN, H. C.; TWEDDLE, N. E. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In: DICK, V. A.; HENDRICHS, J.; ROBINSON, A. S. (ed.). **Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 629-650.

VAZEILLE, Marie *et al.* Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PloS One**, v. 2, n. 11, p. e1168, 2007.

VILLARREAL, Susan M. *et al.* Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 108, p. 1-9, 2018.

VONESCH, Nicoletta *et al.* Climate change, vector-borne diseases and working population. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 52, n. 3, p. 397-405, 2016.

- VREYSEN, Marc J. B. *et al.* *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. **Journal of economic entomology**, v. 93, n. 1, p. 123-135, 2000.
- VUCIC, V. *et al.* Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, n. 2, p. 227-236, 2006.
- WAGGONER, Jesse J.; PINSKY, Benjamin A. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 4, p. 860-867, 2016.
- WALKER, T. *et al.* The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450-453, 2011.
- WALLIS, R. C.; LANG, C. A. Egg formation and oviposition in blood-fed *Aedes aegypti* L. **Mosquito News**, v. 16, n. 4, P. 283-286, 1956.
- WANDALL, Annelise; SVENDSEN, Allan. Transition from somatic to meiotic pairing and progressional changes of the synaptonemal complex in spermatocytes of *Aedes aegypti*. **Chromosoma**, v. 92, n. 4, p. 254-264, 1985.
- WEAVER, Scott C. *et al.* Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral research**, v. 130, p. 69-80, 2016.
- WEAVER, Scott C.; FORRESTER, Naomi L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral research**, v. 120, p. 32-39, 2015.
- WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.
- WEINBERG, Frank; CHANDEL, Navdeep S. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 23, p. 3663-3673, 2009.
- WENGLER, Gerd; WENGLER, Gisela. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 265-273, 1993.
- WENSLER, Rita J. D.; REMPEL, J. G. The morphology of the male and female reproductive systems of the midge, *Chironomus plumosus* L. **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, n. 2, p. 199-229, 1962.
- WILKE, André Barretto Bruno *et al.* Mini-review: genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. **AsPac J Mol Biol Biotechnol**, v. 17, n. 17, p. 65-74, 2009.
- WILSON, Edmund Beecher. **The cell in development and inheritance**. The Macmillan Company, 1900.
- WOMACK, Michael. The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Wing Beats**, v. 5, n. 4, p. 4, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector control operations framework for Zika virus**. WHO, 2016

WU, Changgong et al. Thioredoxin 1-mediated post-translational modifications: reduction, transnitrosylation, denitrosylation, and related proteomics methodologies. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 9, p. 2565-2604, 2011.

YAMAR B. A. et al. Aspects of bioecology of two Rift Valley fever virus vectors in Senegal (West Africa): *Aedes vexans* and *Culex poicilipes* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 739-750, 2005.

YUVAL, Boaz. Mating systems of blood-feeding flies. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 51, p. 413-440, 2006.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZINSZER, Kate *et al.* Reconstruction of Zika virus introduction in Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 1, p. 91-94, 2017.

ZUG, Roman; HAMMERSTEIN, Peter. Still a host of hosts for Wolbachia: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e38544, 2012.

APÊNDICE A – Plataforma de criação e manutenção de mosquitos

Figura 14 – Plataforma de criação e manutenção de mosquitos



Fonte: O Autor, 2019.

ANEXO A – Comprovante de submissão do Artigo 1

De: PeerJ <info@peerj.com>

Data: 3 de outubro de 2019 17:35:03 BRT

Para: Amanda Albuquerque <amandabiocel@gmail.com>

Assunto: An Academic Editor has been assigned to your PeerJ submission: "Pupal gamma radiation as a sterile insect technique for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)" (#2019:09:40955:0:0:REVIEW)

Responder A: PeerJ <info@peerj.com>

PeerJ

Dear Amanda,

We're pleased to let you know that an Academic Editor has just been assigned to your article - [Pupal gamma radiation as a sterile insect technique for *Aedes aegypti* \(Diptera: Culicidae\)](#).

The Academic Editor will now be seeking peer reviewers. We'll notify you next when they have made their decision.

With kind regards,
The PeerJ Team

Article ID: 40955