



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

SAMUEL LIMA DE SANTANA

**EFEITOS GENOTÓXICOS EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* EXPOSTOS À
RADIÇÃO GAMA E EM SEUS DESCENDENTES**

Recife
2024

SAMUEL LIMA DE SANTANA

**EFEITOS GENOTÓXICOS EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* EXPOSTOS À
RADIAÇÃO GAMA E EM SEUS DESCENDENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de concentração: Aplicações de radioisótopos na indústria e medicina

Orientador (a): Dra. Edvane Borges da Silva

Coorientador: Dr. André Maciel Netto

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santana, Samuel Lima de.

Efeitos genotóxicos em mosquitos *Aedes aegypti* expostos à radiação gama e em seus descendentes / Samuel Lima de Santana. - Recife, 2024.

82f.: il.

Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2024.

Orientação: Edvane Borges da Silva.

Coorientação: André Maciel Netto.

1. Ensaio Cometa; 2. Genotoxicidade; 3. Micronúcleo; 4. TIE.
I. Silva, Edvane Borges da. II. Netto, André Maciel. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

SAMUEL LIMA DE SANTANA

**EFEITOS GENOTÓXICOS EM MOSQUITOS *Aedes aegypti* EXPOSTOS À
RADIÇÃO GAMA E EM SEUS DESCENDENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de concentração: Aplicações de radioisótopos na indústria e medicina.

Aprovado em: 21/06/2024

BANCA EXAMINADORA

Dra. Edvane Borges da Silva
(Examinador I -Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Ademir de Jesus Amaral
(Examinador II – Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Érima Maria de Amorim
(Examinador III -Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. André Severino da Silva
(Examinador IV -Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Antonio Pancrácio de Souza
(Examinador V -Externo)
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

Dedico este trabalho aos meus pais, Reginaldo Santana e Maria do Socorro Lima, pois é graças aos seus esforços que hoje posso concluir o meu curso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meu orientador espiritual, Jesus Cristo, que me concedeu força e sabedoria para chegar até aqui. Tudo que tenho, o que o sou e o que vier a ser, vem dele.

À minha orientadora Dra. Edvane Borges, pela confiança depositada em mim, pela paciência, por estar sempre disponível para solução de dúvidas e compreensão das minhas limitações. Sou muito grato por tudo.

Ao meu coorientador André Maciel Netto pelas dicas, sugestões e ajuda.

Aos meus pais Reginaldo Santana e Maria do Socorro e às minhas irmãs Sumaya Lima e Rafaelly Lima pela motivação, conselhos e apoio, principalmente nos momentos de tensão e cansaço.

À minha noiva, Maria Gislaine Pereira, pela atenção, força, colaboração em vários momentos deste trabalho e por toda paciência, carinho, incentivo e partilhar comigo as angústias e alegrias.

Ao Laboratório de Genética do CAV/UFPE, em especial à Dra. Claudia Rohde, por disponibilizar o espaço físico, materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa. E ao grupo de estudo em mutagenese: MSc. Aleson Aparecido, Dra. Danúbia Guimarães; Dr. Marcos Oliveira, MSc. Maria Gislaine, pelo apoio mútuo nos experimentos. Sem vocês seria impossível realizar os experimentos.

À Dra. Maria Alice Varjal, do Departamento de Entomologia/Instituto Aggeu Magalhães IAM/Fiocruz-PE, por fornecer o material biológico e suporte necessário para realização desse trabalho. Em especial à MSc. Jaziela Mendonça, que com muita dedicação e empatia passou os conhecimentos técnicos de manutenção dos *Aedes aegypti*. A contribuição de vocês foi de suma importância.

À Dra. Miriam Silva Rafael, MSc. Junielson Soares e MSc. Sabrina Soares, do Laboratório de Citogenética e Evolução de Mosquitos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pelo treinamento prestado na metodologia do teste micronúcleo em *Aedes aegypti*.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao imprescindível apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(MARTHIN LUTHER KING)

RESUMO

Aedes aegypti emerge como o principal vetor responsável pela propagação de arboviroses como febre amarela, dengue, chikungunya e Zika, especialmente no cenário brasileiro, onde surtos simultâneos dessas enfermidades têm sido observados desde 2015. Uma estratégia efetiva para mitigar a incidência dessas doenças é o controle dos insetos vetores, e a Técnica do Inseto Estéril (TIE) se destaca como uma abordagem de monitoramento genético que se baseia na supressão populacional mediante a esterilização de machos, geralmente por meio de radiação ionizante. O presente trabalho se propôs a avaliar o efeito genotóxico da radiação ionizante na geração parental (F0) e nas duas gerações seguintes consecutivas (F1 e F2), de *Aedes aegypti*, por meio dos ensaios cometa e micronúcleo. Para tanto, uma linhagem pupas machos de *A. aegypti* foram submetidas à radiação gama, em doses de 20, 30, 40 e 50 Gy. Após esse procedimento, foi analisada a taxa de oviposição nas gerações F1 e F2, bem como a viabilidade dos ovos. O efeito mutagênico foi avaliado por meio do Teste do Micronúcleo: em larvas (gânglio cerebral), machos adultos (túbulos de Malpighi) e fêmeas adultas (ovócitos). A avaliação genotóxica foi conduzida por meio do Ensaio Cometa em larvas e adultos em células da hemolinfa. Os resultados dos parâmetros fecundidade e fertilidade indicam que houve transferência dos danos recebidos pela geração parental para a primeira geração filial, o que foi confirmado pelos dados mutagênicos obtidos a partir do teste do micronúcleo. Quanto à genotoxicidade, na geração F0, foi observado um padrão dose-resposta, em que o índice de danos aumenta proporcionalmente ao aumento da dose de radiação. Os resultados sugerem que a dose de 50 Gy apresenta maior segurança para uso na TIE, visto que nessa dose, a taxa de fertilidade observada é menor que 2%. O presente estudo é pioneiro no acompanhamento do efeito genotóxico e mutagênico nos indivíduos descendentes de *A. aegypti*, expostos à radiação gama. Portanto, faz-se necessário novos estudos a fim de entender os efeitos da radiação ionizante nesses indivíduos.

Palavras-chave: Ensaio cometa; Genotoxicidade; Micronúcleo; TIE.

ABSTRACT

Aedes aegypti emerges as the main vector responsible for the spread of arboviruses such as yellow fever, dengue, chikungunya, and Zika, especially in the Brazilian scenario, where simultaneous outbreaks of these diseases have been observed since 2015. An effective strategy to mitigate the incidence of these diseases is the control of vector insects, and the Sterile Insect Technique (SIT) stands out as a genetic monitoring approach based on population suppression through the sterilization of males, usually through ionizing radiation. This study aimed to evaluate the genotoxic effect of ionizing radiation on the parental generation (F0) and the two consecutive subsequent generations (F1 and F2) of *Aedes aegypti*, through comet and micronucleus assays. For this purpose, a lineage of male *A. aegypti* pupae was subjected to gamma radiation at doses of 20, 30, 40, and 50 Gy. After this procedure, the oviposition rate in the F1 and F2 generations, as well as the egg viability, were analyzed. The mutagenic effect was evaluated through the Micronucleus Test: in larvae (brain ganglia), adult males (Malpighian tubules), and adult females (oocytes). Genotoxic evaluation was conducted through the Comet Assay in larvae and adult hemolymph cells. The results of fecundity and fertility parameters indicate that damage transferred from the parental generation to the first filial generation, which was confirmed by mutagenic data obtained from the micronucleus test. Regarding genotoxicity, in the F0 generation, a dose-response pattern was observed in which the damage index increases proportionally with the increase in irradiation dose. The results suggest that the dose of 50 Gy presents greater safety for use in SIT, as at this dose, the observed fertility rate is less than 2%. This study is pioneering in monitoring the genotoxic and mutagenic effects in descendants of *A. aegypti* exposed to gamma radiation. Therefore, further studies are necessary to understand the effects of ionizing radiation on these individuals.

Keywords: Comet Assay; Genotoxicity; Micronucleus; SIT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 –	Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> : ovo, larva, pupa e adultos.	20
Figura 02 –	Mosquito adulto de <i>Aedes aegypti</i> .	22
Figura 03 –	Dimorfismo sexual em mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto. (A) antenas pilosas em fêmeas. (B) Antenas plumosas dos machos.	22
Figura 04 –	Etapas da Técnica do Inseto Estéril.	27
Figura 05 –	Irradiador de amostra biológica Gammacell-220, pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (DEN-UFPE), Recife, Brasil.	28
Figura 06 –	Formação de micronúcleo por perda de fragmento cromossômico acêntrico e cromossomo atrasado (A). Formação de ponte nucleoplasmática, a partir de um cromossomo dicêntrico (B). Broto nuclear (C).	36
Figura 07 –	Padrão visual de um nucleoide.	38
Figura 08 –	Esquema simplificado da metodologia do teste do Micronúcleo.	43
Figura 09 –	Fecundidade da geração filial F1 de <i>Aedes aegypti</i> , para os diferentes grupos estudados.	51
Figura 10 –	Médias do Índice de Dano (ID) em hemócitos de adultos de <i>Aedes aegypti</i> irradiados em fase de pupa com doses de 20,30,40 e 50Gy (geração parental – F0) e médias do ID em hemócitos de larvas e adultos da primeira (F1) e segunda (F2) geração filial.	54
Figura 11 –	Frequência de micronúcleos em células mitóticas de gânglios cerebrais de larvas de <i>Aedes aegypti</i> e controle negativo (0 Gy) da primeira e segunda geração filial (F1 e F2) expostos a diferentes doses de radiação.	57
Figura 12 –	Frequência de micronúcleos em células mitóticas de Túbulos de Malpighi de <i>Aedes aegypti</i> de três gerações consecutivas (F0 a F2) expostos a diferentes dosagens de radiação.	58
Figura 13 –	Frequência de micronúcleos em células meióticas de ovócitos de fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> de duas gerações filiais (F1 e F2) extraídos de indivíduos descendentes de machos expostos a diferentes doses de radiação ionizante (20,30 e 40Gy).	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores médios para a fecundidade e fertilidade dos indivíduos da geração parental (F0), submetidos aos diferentes tratamentos.	49
Tabela 2 –	Comparação, entre grupos, da fecundidade de <i>A. aegypti</i> , para a primeira geração filial (F1). Valores expressos como médias \pm desvio padrão.	51
Tabela 3 –	Avaliação da fertilidade de <i>A. aegypti</i> , para a primeira geração filial (F1). Valores expressos como médias \pm desvio padrão	51
Tabela 4 –	Resultados dos danos genéticos observados por meio do ensaio Cometa em adultos de <i>Aedes aegypti</i> irradiados com diferentes doses (20, 30 40 e 50Gy) de radiação gama (Cobalto-60), e grupo controle negativo (0 Gy), em cada réplica, para geração parental (F0).	52
Tabela 5 –	Resultados dos danos genéticos observados por meio do ensaio Cometa em larvas e adultos dos grupos F1 e F2, descendentes de <i>Aedes aegypti</i> irradiados com diferentes doses (20, 30 40Gy) de radiação gama (Cobalto-60) em cada réplica.	53
Tabela 6 –	Comparação da média e desvio padrão da frequência de micronúcleo em neuroblatos de larvas nas gerações F1 e F2, tratadas com diferentes doses de radiação ionizante (20, 30, 40 e 50 Gy) e o controle negativo (0 Gy).	56
Tabela 7 –	Comparação da média e desvio padrão da frequência de micronúcleo em túbulos de Malpighi de machos adultos de <i>A. aegypti</i> , nas gerações F0 a F2, tratadas com diferentes doses de radiação ionizante (20,30, 40 e 50Gy) e o controle negativo (0 Gy).	57
Tabela 8 –	Comparação da frequência de micronúcleo em ovócitos de fêmeas adultas de <i>A. aegypti</i> , nas gerações F1 e F2, tratadas com diferentes doses de radiação ionizante (20,30, 40) e o controle negativo (0 Gy).	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. - *Aedes*
AW:IPM - Area wide Integrated Pest Management
Bti - *Bacillus thuringiensis var. israelenses*
°C - Grau Celsius
Co - Cobalto
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
F0 – Geração parental
F1- Primeira geração filial
F2 – Segunda geração filial
FD – Frequência de Dano
FNI – Fêmeas não irradiadas
FI – Fêmeas descendentes dos machos irradiados
g - Grama
Gy - Gray
h - Hora
ID – Índice de dano
KCl - Cloreto de Potássio
KH₂PO₄ - Fosfato de Potássio (monobásico)
L - Litro
LET- Transferência Linear de Energia – Do inglês – *Linear Energy Transfer*
LMP - Baixo Ponto de Fusão- Do inglês- *Low Melting Point*
mA - Miliampere
mg - Miligrama
MI – Machos irradiados
mL - Mililitro
mm – Milímetros
MN – Micronúcleo
MNI – Machos não irradiados
µL - Microlitro
NaCl - Cloreto de Sódio
Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico
NaOH - Hidróxido de Sódio
OMS - Organização Mundial da Saúde
pH - Potencial Hidrogeniônico
PNI – Programa Nacional de Imunização
R – Roentgen
rpm - Rotações por minuto
SE – Semana Epidemiológica
TIE – Técnica do Inseto Estéril
USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América
V - Volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	<i>Aedes aegypti</i>	19
3.1.1	<i>Aedes aegypti</i> como vetor de arboviroses	23
3.2	Técnica do Inseto Estéril (TIE)	26
3.3	Citogenética em <i>Aedes aegypti</i> irradiados	30
3.4	Bioensaios para identificação de danos no DNA	34
3.4.1	Teste do Micronúcleo	35
3.4.2	Ensaio Cometa	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Criação em massa de <i>Aedes aegypti</i> em laboratório	40
4.2	Irradiação de <i>Aedes aegypti</i>	40
4.3	Avaliação do efeito da radiação gama na fecundidade e na fertilidade.	41
4.4	Avaliação genotóxica e mutagênica em <i>Aedes aegypti</i> exposto à radiação gama	42
4.4.1	Teste do micronúcleo	42
4.4.2	Ensaio cometa em <i>Aedes aegypti</i>	43
4.5	Análises estatísticas	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Efeitos da irradiação sobre a fecundidade e fertilidade	48
5.2	Efeito Genotóxico em <i>Aedes aegypti</i> pelo Ensaio Cometa	52
5.3	Efeito mutagênico em <i>Aedes aegypti</i>	55
5.3.1	Micronúcleos (MN) em neuroblastos (gânglios cerebrais) em <i>Aedes aegypti</i> .	56
5.3.2	<i>Micronúcleos em células de Túbulos de Malpighi de Aedes aegypti</i>	57
5.3.3	Micronúcleos em células de ovócitos de <i>Aedes aegypti</i> .	58
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Arboviroses como febre amarela, dengue, chikungunya e Zika têm provocado grandes impactos na saúde pública nos países tropicais, especialmente no Brasil, onde, desde 2015, tem-se observado surtos conjuntos dessas doenças. O principal vetor dessas arboviroses é o *Aedes aegypti* (FARAONE *et al.*, 2021), mosquito originário da África subsaariana, e que foi reintroduzido no Brasil, em 1976. A reintrodução no Brasil ocorreu depois de ter sido erradicado, entre as décadas de 50 e 60, numa campanha patrocinada pela Fundação Rockefeller contra a febre amarela nas Américas (BRAGA e VALLE, 2007).

O controle de insetos vetores em saúde pública é realizado com a finalidade de reduzir a densidade populacional de uma espécie-alvo, de forma consistente e progressiva, amenizando a incidência de surtos e epidemias (BRAGA e VALLE, 2007). No caso de *Aedes aegypti*, o controle populacional permanece como medida mais eficaz de redução da incidência de arboviroses devido à inexistência de vacinas ou fármacos específicos para essas enfermidades, exceto a dengue, para qual existem duas vacinas disponíveis no mercado brasileiro: DENGVAXIA (CYD- TDV), desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur e a QDENGGA (TAK-003), desenvolvida pelo laboratório japonês Takeda Pharma Ltda, sendo incorporada no Programa Nacional de Imunização (PNI), distribuída em fevereiro de 2024, para jovens de 10 a 14 anos de forma gratuita (CÂMARA *et al.*, 2009; BRASIL, 2024).

As ações de controle populacional no Brasil estão mais voltadas à eliminação mecânica de criadouros potenciais e reais para larvas do mosquito, com a aplicação focal de inseticidas químicos de efeito larvicida - aplicados em grandes reservatórios de água - ou de efeito adulticidas, sob a forma de borrifação espacial, em pontos estratégicos onde há demasiada prevalência do mosquito.

Entretanto, muitas espécies de mosquitos vêm sendo relatadas na literatura como resistentes a inseticidas (SAFI *et al.*, 2019). Além disso, o combate ao mosquito *Aedes aegypti* apresenta-se como laborioso e complexo demandando novas estratégias para o seu controle. Metodologias ainda em estado piloto são promissoras, tais como mosquitos transgênicos portadores de genes letais e mosquitos estéreis, ambas voltadas para a eliminação do mosquito em sua fase de ovo, além do uso de

micro/nanopartículas de cinzas volantes de óleo pesado como larvicidas e pupicidas (FLORÊNCIO, 2017; CARVALHO *et al.*, 2014; BOSLY *et al.*, 2023).

A utilização de mosquitos estéreis, dentro da Técnica do Inseto Estéril, conhecida como TIE, foi proposta por Knipling, nos anos 50 (KNIPLING, 1955; KLASSEN; CURTIS, 2005). A TIE é considerada uma técnica de controle genético baseada na supressão populacional por meio da esterilização de machos, geralmente por radiação ionizante (Raios-X e radiação gama), apesar de também poder serem utilizados quimioesterilizantes, como substâncias alquilantes e triazinas. No ambiente, estes machos estéreis copulam com fêmeas selvagens e a prole gerada desse cruzamento é inviável (DAME *et al.*, 1964; REISEN, 1982; MASTRANGELO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; CARVALHO, 2012; OLIVA *et al.*, 2012; LIMA, 2015; ERNAWAN *et al.*, 2017; BOND *et al.*, 2019).

A TIE tem sido aplicada no controle populacional do *A. aegypti* em diversos países, como Estados Unidos da América (CHEN *et al.*, 2022), Indonésia (ERNAWAN *et al.* 2019), China (ZHENG *et al.* 2019), experimentalmente no México (BOND *et al.* 2019) e Brasil (FLORÊNCIO, 2017). Segundo relata Apley (2010) as primeiras tentativas de controle do *Aedes aegypti* por meio da TIE foi realizada nos EUA entre os anos de 1960 e 1961 por Harvey e colaboradores, utilizando uma fonte de ⁶⁰Co. Entretanto não foram bem-sucedidas, observando-se redução da competitividade de acasalamento de machos estéreis comparado aos machos selvagens não irradiados, ocasionada por altos níveis de radiação (110-180 Gy) aplicadas muito cedo ao estágio de desenvolvimento pupal.

É de suma importância escolher a dose certa para programas TIE, oferecendo um equilíbrio entre maximizar a esterilidade dos machos irradiados e, ao mesmo tempo, minimizar os efeitos negativos da radiação nas métricas de desempenho, como longevidade e competitividade de acasalamento. Sabe-se que doses acima de 50 Gy garantem a esterilidade. Contudo, quanto maior a dose utilizada, maior é o prejuízo no desempenho do macho irradiado, reduzindo a eficácia da técnica (LIMA, 2015).

Lima (2015), avaliou, em experimentos controlados de campo e em laboratório, as doses de 30, 40 e 50 Gy de radiação gama para a esterilização do mosquito *Aedes aegypti*, que envolvem a TIE. No entanto, apenas a dose de 50 Gy promoveu a esterilidade total, mas ocorreu uma diminuição da longevidade dos machos irradiados.

Além disso, o estudo mostrou ser necessária uma proporção de 10 machos irradiados para cada macho selvagem na competição por acasalamento, de tal forma que ocorra o aumento do percentual de ovos inviáveis. Para as doses de 30 e 40 Gy, observaram-se que os percentuais de ovos viáveis de fêmeas (não irradiadas) e que cruzaram com machos irradiados, foram de 42 % e 16 %, respectivamente.

Estudo realizado por Silva *et al.* (2021A) mostrou que ocorreu uma diminuição, apesar de não acentuada, da fertilidade e da emergência de adultos para as gerações F1 e F3, descendentes dos machos irradiados com dose de 40 Gy, evidenciando a transmissão da mutação letal dominante, provocada pela radiação ionizante, para estas gerações. Porém, os autores não realizaram nenhuma avaliação citogenética nesses descendentes que permitisse identificar o dano provocado e transmitido.

A formação de micronúcleos e de aberrações cromossômicas são duas importantes consequências prejudiciais e que caracterizam algum efeito genotóxico em determinado organismo quando este sofre agressão de um agente físico, tal como a radiação ionizante (KRISHNA *et al.*, 1991; ZANONI *et al.*, 2005).

Diante os efeitos causados pela exposição à radiação ionizante por meio da TIE, a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico torna-se importante, principalmente em descendentes de mosquitos irradiados com doses semi-esterilizantes (< 50 Gy). Para avaliar as consequências desses danos genéticos, existem diferentes testes, dentre eles podemos destacar o ensaio cometa (EC), o teste de micronúcleo (MN) e a análise das aberrações cromossômicas.

É importante observar que os micronúcleos nem sempre indicam mutações letais dominantes específicas, pois sua formação pode resultar de uma variedade de eventos genotóxicos. No entanto, no caso em que o agente genotóxico que atua seja apenas a radiação ionizante, o teste pode ser bastante útil. O teste do micronúcleo *in vivo*, está bem estabelecido como um padrão em ensaios para avaliação de mutagenicidade em nível cromossômico pois sua formação está associada a eventos de quebra cromossômica e pode refletir danos genéticos (CAMMERER *et al.*, 2007). Além disso, a análise da frequência de micronúcleos em interfase é um meio rápido e fácil para determinar o efeito genotóxico sobre determinado organismo (MATSUMOTO *et al.*, 2006). O teste de genotoxicidade ensaio cometa (EC), descrito primeiramente por Ostling e Johanson (1984) e

modificado por Singh *et al.* (1988), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas, sendo um método rápido, muito sensível e de baixo custo (BELPAEME *et al.*, 1998; COLLINS *et al.*, 2008). Recentemente, o EC foi utilizado para estudos do efeito genotóxico induzido por radiação gama em *A. aegypti* (SHETTY *et al.*, 2017; VERÇOSA, 2019). Shetty *et al.* (2017) utilizando sete doses diferentes de radiação gama, variando de 1 a 50 Gy, observaram um aumento linear significativo no dano ao DNA, sendo a extensão do dano proporcional à dose de radiação gama que o organismo recebeu, exceto naqueles tratados com 1 Gy. Verçosa (2019) utilizando doses de 30, 40 e 50 Gy observou o aumento do índice de dano e da frequência do dano com o aumento da dose dos indivíduos irradiados.

Para otimização da TIE, percebe-se a necessidade de estudos que possam identificar os efeitos genotóxicos e mutagênicos causados pela radiação ionizante em *A. aegypti* irradiados e em seus descendentes, originados dos cruzamentos de fêmeas não irradiadas com machos irradiados em doses menores que 50 Gy.

Diante disso, faz-se necessários estudos que busquem identificar os possíveis efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos nos mosquitos descendentes de machos irradiados em doses menores que 50 Gy, a fim de verificar se a mutação causada pela irradiação é passada ao longo das gerações, e assim escolher a dose ideal a ser utilizada nos programas de TIE, avaliando a segurança da utilização de doses que ainda geram descendentes.

2 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito genotóxico da radiação ionizante na geração parental (F0) e nas duas gerações seguintes consecutivas (F1 e F2), de *Aedes aegypti*, por meio dos ensaios cometa e micronúcleo.

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a oviposição e eclosão de ovos de fêmeas não irradiadas que cruzaram com machos irradiados, nas doses de 20, 30, 40 e 50Gy, sendo mantidos os controles;
- Avaliar a oviposição e eclosão de ovos de fêmeas que cruzaram com machos, ambos descendentes de machos irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy, sendo mantidos os controles;
- Analisar o efeito genotóxico em hemócitos de machos adultos, controles e irradiados na fase de pupa (geração F0), nas doses de 20, 30, 40 e 50 Gy, edos descendentes adultos (machos e fêmeas das gerações F1 e F2) de machos controles e irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy, por meio do ensaio Cometa;
- Estimar a taxa de formação de micronúcleo em preparações citológicas de túbulos de Malpighi de machos adultos irradiados nas doses de 20, 30, 40 e 50 Gy e de seus descendentes, nas doses de 20, 30 e 40 Gy, sendo mantidos os respectivos controles;
- Estimar a taxa de formação de micronúcleo em preparações citológicas de gânglios cerebrais de larvas e ovócitos de fêmeas adultas de *A. aegypti*, nas gerações F1 e F2, descendentes de machos irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy, sendo mantidos os controles.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Aedes aegypti*

A ordem Diptera abrange aproximadamente 85.000 espécies de insetos das quais cerca de 200 podem agir como vetores de agentes (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) responsáveis por patologias que acometem o homem. A família Culicidae é formada por mais de 3.300 espécies de mosquitos classificados em 41 gêneros, sendo, no mínimo, sete deles de significativa relevância médica: *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Haemagogus* e *Sabethes*. No gênero *Aedes*, estão configuradas cerca de 900 espécies classificadas em 44 subgêneros, sendo um dos mais representativos o *Stegomyia* (FORATTINI, 1962; SERVICE, 2004).

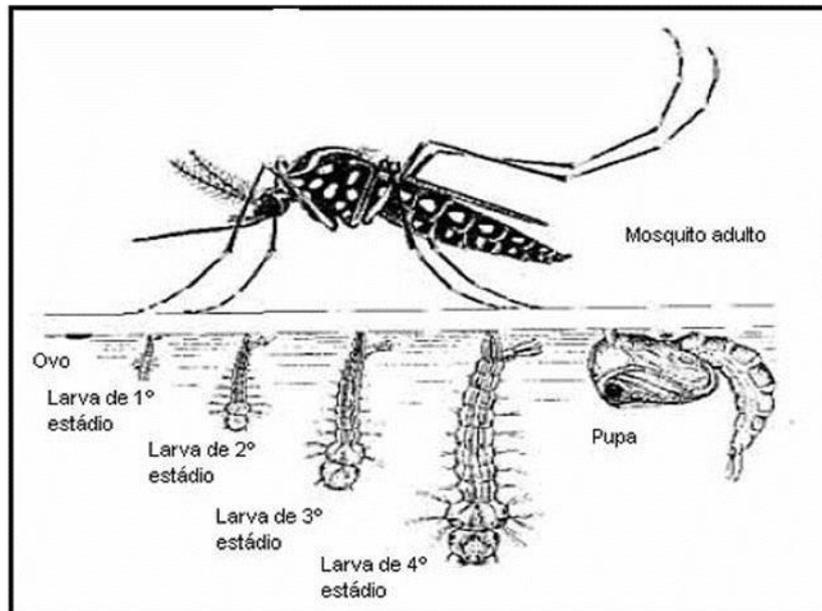
Aedes aegypti, Linnaeus 1762, 'aedes', do grego, odioso e 'aegypti', do latim, do Egito) é originário do Egito, na África, e se espalhou por regiões tropicais, subtropicais e temperadas desde o século XVI, provavelmente através de navios negreiros (CLEMENTS, 1992; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2005). No Brasil, os primeiros relatos da espécie ocorreram no período colonial, por meio do tráfego de escravos originários de regiões onde o mosquito já estava bem estabelecido, entre os séculos XVI e XIX (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

A adaptação desta espécie, a princípio silvestre, aos espaços urbanos, está ligada à existência de diversas áreas propícias ao desenvolvimento de seus estágios jovens e a seu alto grau de antropofilia (ACIOLI, 2006). Com relação a distribuição, *A. aegypti* aparece amplamente disseminado nas áreas tropicais e subtropicais, entre as latitudes 45° N e 35° S ou mesmo ultrapassando esses limites, porém nas áreas isotermais de 20 °C. A altitude também interfere na sua distribuição. Dificilmente é visto acima dos 1.000 metros, no entanto já foi divulgada sua existência a 2.200 metros acima do nível do mar, na Índia e na Colômbia, o que comprova a elevada adaptabilidade dessa espécie (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

A. aegypti (2n = 6 cromossomos), possui um par de cromossomos sexuais e dois pares de cromossomos autossômicos (HEREIRA-ROJAS, 2007). Seu ciclo de vida (Figura 1) compreende quatro estádios: ovo, larva (quatro estádios L1, L2, L3 e L4) e pupa, que ocorrem na água, e a fase adulta (alada) que é terrestre, apresentando, assim, uma metamorfose completa (FUNASA, 2001). Em regiões tropicais, que é o caso do Brasil, *A. aegypti* pode reproduzir em um período de 15 a

30 dias.

Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*: ovo, larva, pupa e



adultos.

Fonte: Cadernos de atenção básica do Ministério da Saúde (2008).

Os ovos de *A. aegypti* medem cerca de 1 mm de comprimento, possui contorno alongado e fusiforme, apresentam coloração branca quando recém postose adquirem coloração escura algumas horas após a oviposição (FORATINNI, 2002). A fêmea de *A. aegypti* oviposita cerca de 120 ovos/ciclo gonotrófico, dependendo da quantidade de sangue ingerido. A oviposição é realizada nos mais diferentes substratos capazes de acumular água, desde as paredes ásperas, umedecidas e escurecidas, troncos de árvores, cascas e frutas e outros ambientes naturais, quanto de recipientes artificiais preenchidos por água fluvial ou do abastecimento público.

Duas características são fundamentais para a dispersão do mosquito: a primeira é a forma como ocorre a oviposição, uma vez que a fêmea procura diversos locais para deixar os seus ovos e, a segunda, é a resistência dos ovos ao ressecamento, baixa de temperatura e insolação, podendo permanecer vivo por até 450 dias em quiescência/dormência, sem o contato com a água (SILVA e SILVA, 1999).

As larvas são exclusivamente aquáticas, sendo nesta fase onde ocorre a alimentação por filtração do material orgânico encontrado nos criadouros. O desenvolvimento ocorre em quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4): o primeiro estágio larval é a L1, que dura em média de 36 a 48 h e a larva mede

aproximadamente 2,5 mm; o segundo estágio é a L2, que dura de 24 a 36 h e larva mede aproximadamente 3,9 mm; o terceiro estágio, L3, dura 36 a 48 h e a larva alcança 5,05 mm aproximadamente; e o quarto e último estágio, L4, que dura de 48 a 72 h e a larva é de aproximadamente 7,3 mm (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2009).

O seu completo desenvolvimento leva em torno de 6 a 10 dias e é influenciado pela temperatura, luminosidade, salinidade, poluentes orgânicos e inorgânicos, disponibilidade de recursos alimentares e densidade populacional nos criadouros (CLEMENTS, 1992).

Ao completarem o desenvolvimento larvar, avançam para o estágio de pupa, quando não mais se alimentam e ocorre a primeira metamorfose (por se tratar de um organismo holometábolo), uma vez que utiliza as reservas energéticas, armazenadas durante o estágio de larva (CLEMENTS, 1992).

A pupa, morfologicamente, tem aspecto de “vírgula” em virtude de a cabeça unir-se ao tórax, formando o cefalotórax. Seu corpo tem coloração esbranquiçada semelhantemente à larva, porém, à medida que se aproxima da transformação em adulto, adquire coloração mais escura. Depois de 48 a 72 h do início da pupa, a forma alada do mosquito emerge, por meio da segunda metamorfose, ou seja, passagem à fase adulta (BESERRA *et al.*, 2009). Ao emergir da pupa, na fase adulta, o mosquito fica ainda por algumas horas nas paredes do criadouro até que o seu exoesqueleto e asas estejam totalmente endurecidos (CONSOLI e OLIVEIRA 1994). Neste período, os machos sofrem a torção da genitália em ângulo de 180° para tornar a cópula possível.

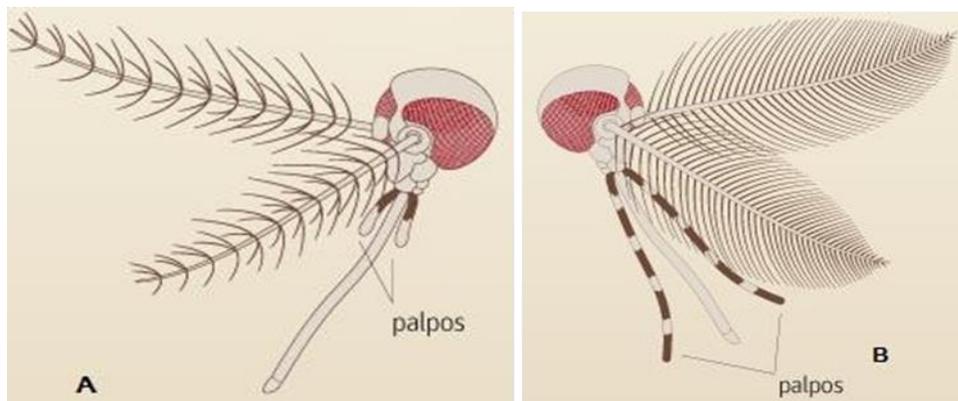
Em sua forma adulta (Figura 2), o mosquito pode chegar de 3 a 6 mm de comprimento, apresentando-se com coloração geral enegrecida, e no tórax apresenta faixas branco-prateadas, formando um padrão de linhas característico da espécie que se parece com uma “lira” (FORATTINI, 2002; BECKER *et al.*, 2003). Os mosquitos apresentam dimorfismo sexual, pois a fêmea apresenta antenas pilosas, palpos curtos e probóscide longa, ao contrário do macho que possui antenas plumosas (Figura 03).

Figura 2: Mosquito adulto de *Aedes aegypti*



Fonte: Geniton Vieira, Instituto Oswaldo Cruz (2021)

Figura 3: Dimorfismo sexual em mosquito *Aedes aegypti* adulto. (A) antenas pilosas em fêmeas. (B) Antenas plumosas dos machos



Fonte: Dossiê do mosquito (2005).

<https://www1.folha.uol.com.br/infograficos/2015/04/119391-dossie-do-mosquito.shtml>.

Machos e fêmeas procuram por fontes de carboidratos, como seivas vegetais, néctares de flores, fundamentais para seu metabolismo básico, porém, as fêmeas, que são hematófagas, também precisam de alimentação sanguínea obtida em animais vertebrados, preferindo o sangue do homem (antropofilia), para a produção de ovos, estando apta para a postura dos ovos, cerca de três dias após o repasto, dando, assim, início a um novo ciclo de vida do mosquito (FUNASA, 2001).

O mosquito fêmea está disponível para o acasalamento em um único momento em sua vida, caracterizando um comportamento de monandria. Após a cópula, o conteúdo espermático recebido é reservado em três espermatecas, as quais são fundamentais para depositar, de forma viável, os espermatozoides ao longo do

período de vida (CLEMENTS, 1992). As fêmeas vivem aproximadamente 45 dias e os machos um pouco menos que esse período (CLEMENTS, 1992; GLASSER e GOMES, 2002).

A. aegypti passou a ter um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, o que o torna a espécie de culicídeo mais associada ao ser humano, um fator determinante para a transmissão de patógenos ao homem e a possibilidade de uma rápida propagação viral, o que por sua vez pode levar a ocorrência de epidemias (GLORIA-SORIA *et al.*, 2014). Diante disso as ações de controle ao mosquito devem ser direcionadas em todas as fases do seu ciclo de vida.

3.1.1 *Aedes aegypti* como vetor de arboviroses

As arboviroses são doenças que apresentam grande morbidade e mortalidade no mundo, causadas por vírus transmitidos por artrópodes como mosquitos, moscas e carrapatos, aos hospedeiros vertebrados, inclusive o homem (WEAVER e BARRETT, 2004; VASILAKIS e TESH, 2015).

Dentre os mosquitos, *Aedes aegypti* destaca-se por ser o mais importante transmissor de arbovírus para o ser humano, sendo considerado o principal vetor nas Américas. Esse mosquito é exposto e interage com uma variedade de microorganismos em seu ambiente, o que pode resultar na formação de uma associação vitalícia (DILLON e DILLON, 2004; DOUGLAS, 2011; COON *et al.*, 2014).

Os mosquitos fêmeas de *A. aegypti* infectam mais de 400 milhões de pessoas a cada ano com patógenos virais perigosos, incluindo dengue, febre amarela, Zica e chikungunya, tornando-se um semi (LOPES *et al.* 2014; LIMA-CAMARA, 2016; MATTHEWS *et al.*, 2018, GLORIA-SORIA, 2022).

O vírus dengue, pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*, teve origem na África e difundiu-se pelo mundo, encontrando-se amplamente distribuído nas regiões Tropical e Subtropical (WEAVER, 2014). A incidência da dengue tem aumentado globalmente nas últimas décadas, sendo uma das arboviroses, transmitidas por mosquitos, de maior repercussão epidemiológica na atualidade, com uma estimativa global de cerca de 50 milhões de casos anualmente, culminando em cerca de 20 mil mortes (BHATT *et al.*, 2013; AYUKEKBONG *et al.*, 2017).

A dengue é endêmica em mais de 129 países, especialmente os localizados nas regiões tropicais e subtropicais, os quais possuem condições climáticas e ambientais favoráveis a reprodução de mosquitos (DUARTE *et al.*, 2021). No Brasil, ocorre a circulação de quatro dos cinco sorotipos existentes (DENV – 1, DENV – 2, DENV – 3, DENV – 4), sendo o DENV-2 mais prevalente (BARRETO e TEIXEIRA, 2008; GUY *et al.*, 2016; HUANG, 2021) e que tem causado uma situação hiperendêmica no país. Em 2024, entre as Semanas Epidemiológicas 01 a 04, foram notificados 243.720 casos prováveis de dengue, quando comparado com o mesmo período de 2023, observa-se um aumento de 273% no número de casos prováveis. Nesse mesmo período foi identificada a circulação dos quatro sorotipos supracitados com predominância, até o momento, do DENV1, em 17 unidades da federação, em nível acima do esperado histórico (BRASIL, 2024).

O vírus chikungunya (CHIKV), por sua vez, teve sua origem no oeste africano. Pertencente à família Togaviridae, era conhecido por causar surtos esporádicos na África e no Sudeste Asiático (PIALOUX *et al.*, 2007). Segundo relatado pela Organização Mundial da Saúde, o vírus Chikungunya foi identificado em mais de 60 países até o ano de 2018 (OMS, 2018). Em setembro de 2014, foram identificados os primeiros casos de transmissão do vírus Chikungunya no Brasil. Nesse ano, 1.425 casos foram confirmados, porém, no período que engloba 2014 até 31 de dezembro de 2016, este número aumentou expressivamente, chegando a 17.971 casos confirmados. Nas SE 01 a 04 de 2024, foram notificados 14.958 casos prováveis de chikungunya, quando comparado com o mesmo período de 2023 observa-se uma redução de 0,7% no número de casos prováveis (BRASIL, 2024).

O vírus Zika também tem sua origem em um ciclo silvestre de circulação viral, provavelmente na África. Pertencente à família Flaviviridae, foi primeiro detectado em uma floresta de Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Ficou restrita até a metade da década de 2000 ao continente africano. Em 2007 causou uma epidemia na Micronesia (DUFFY *et al.*, 2009) e, a partir de abril de 2015, foram confirmados laboratorialmente, os primeiros casos de transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika, em 18 estados da Federação Brasileira, não sendo oficialmente divulgado o número de casos confirmados. Porém, estima-se que de 500 mil a 1,5 milhões de pessoas tenham sido infectadas e foram confirmados três casos de óbito por esta doença (BRASIL, 2015). Entre as Semanas Epidemiológicas 1 a 3 de 2024, foram

notificados 105 casos prováveis de Zika no Brasil, apresentando uma redução de 63% nos casos prováveis, comparado ao mesmo período de 2023 (BRASIL, 2024).

A ausência de vacinas eficazes aos vírus torna o controle vetorial a principal forma de contenção destas doenças, exceto a dengue, para qual existe duas vacinas tetravalente disponíveis no mercado, a DENGIVAXIA (CYD-TDV) e a Qdenga. A DENGIVAXIA desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur, foi aprovada em 2015 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (SANOFI, 2019), no ano de 2017 passou a ser indicada somente para pessoas de 9 a 45 anos, por aumentar o risco de doença grave nas pessoas soronegativas para a dengue (LIM *et al.*, 2016; GUBLER e HALSTEAD, 2019; KIMBERLIN e LYNFIELD, 2021).

A Qdenga, do laboratório japonês Takeda Pharmaceutical Company, aprovada em 2023 no Brasil, passou a ser incorporada, em fevereiro de 2024, no Programa Nacional de Imunizações (PNI) pelo Ministério da Saúde, e sendo distribuída para crianças de 10 a 14 anos de forma gratuita, em cidades com alta incidência da Dengue, tornando o Brasil, o primeiro país do mundo a oferecer o imunizante no sistema público de saúde (BRASIL, 2024).

O controle de mosquitos pode ser feito de forma mecânica, biológica e química, para reduzir o seu tamanho populacional. O controle mecânico consiste em medidas visando eliminar os criadouros do vetor (ZARA *et al.*, 2016), o controle biológico consiste na utilização de animais predadores ou parasitas, como os peixes larvófagos (Bettas) e bactérias (*Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti), *Bacillus sphaericus* e *Wolbachia pipientis*) (CAVALCANTI *et al.*, 2007; MACÍAS *et al.*, 2008), e o controle químico, normalmente direcionado aos estágios imaturos, por meio do uso de larvicidas e adulticidas (GOVINDARAJAN e RAJESWARY, 2015).

A utilização inseticidas químicos para o combate do *A. aegypti* pode acarretar em desequilíbrios nos ecossistemas, poluir o meio ambiente e provocar ressurgência de pragas secundárias e ou ainda desenvolver resistência às substâncias mais empregadas (MONTELLA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Os programas de controle vetorial, conduzidos pelos órgãos públicos têm foco em estratégias que requerem a identificação de áreas onde as ações desenvolvidas podem ser mais eficientes, com a finalidade de reduzir a densidade populacional, de forma consistente e progressiva, amenizando a incidência de surtos e epidemias, utilizando para isto inseticidas químicos (BECKER *et al.*, 2003; BRAGA e VALLE, 2007;

FUNASA, 2002). No entanto, a resistência a um desses compostos tem sido referida no Brasil e em outros países, como uma característica ao seu uso prolongado e excessivo (ARAÚJO et al., 2019).

Fica evidente que são necessárias ferramentas de controle que sejam inovadoras contra esse mosquito (BONIZZONI et al., 2013; MCGRAW e O'NEILL, 2013). Diante disso, foram propostas alternativas de controle vetorial, as quais utilizam agentes biológicos à base de bactérias entomopatogênicas, o Bti (*Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*), ou técnicas de manipulação genética, como a Técnica do Inseto Estéril (ALPHEY, 2002; BENEDICT e ROBSON, 2003; DYCK et al. 2005; BELLINI et al., 2007; CATTERUCCIA, 2009; CARVALHO et al, 2014).

3.2 Técnica do Inseto Estéril (TIE)

Como medida alternativa de controle dos mosquitos, a Técnica do Inseto Estéril (TIE) ou, em inglês, *Sterile Insect Technique* (SIT), aparece como uma técnica que causa a inviabilização das progênes de *A. aegypti*, por meio da esterilização de machos através de agente físicos (radiação ionizante), químicos ou biológicos, e pode permitir a erradicação de algumas espécies de mosquitos, quando utilizada em larga escala. A TIE é, também, ambientalmente segura, usa populações locais da espécie-alvo, não apresentando riscos aos polinizadores e ao meio ambiente (ARTHUR, 1997; SILVA et al., 2007).

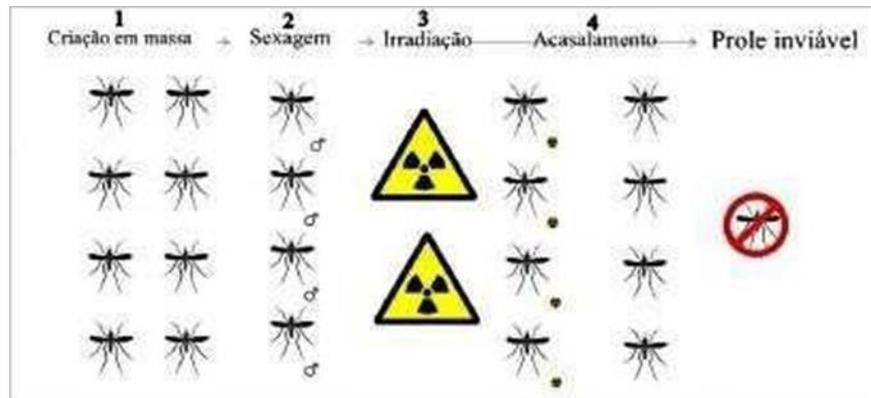
Apesar da TIE ser atribuída ao norte americano Edward F. Knipling, entomologista do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), a TIE foi proposta, de forma independente, entre 1930 e 1940, por mais dois pesquisadores: A.S. Serebrovskii, na Universidade Estadual de Moscou e, F.L. Vanderplank em uma estação de pesquisa da tsé-tsé na zona rural de Tanganyika (atual Tanzânia), os quais utilizaram o cruzamento de diferentes espécies ou linhagens genéticas de insetos para poder alcançar a esterilidade (KLASSEN, 2005).

No entanto, foi Edward F. Knipling, em 1937, quem conseguiu estabelecer o princípio que caracteriza a TIE, ao utilizar a técnica com o objetivo de erradicar a mosca varejeira, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), praga que, em 1933, trouxe sérios problemas para a bovinocultura e animais silvestres da região sudoeste dos Estados Unidos (MALAVASI e ZUCCHI, 2000; DIAS e GARCIA, 2014).

A TIE é considerada um tipo de controle autocida ou genético, na qual a praga

é utilizada para seu próprio controle. Compreende as seguintes etapas: (1) criação em massa de insetos; (2) sexagem, pois para a TIE só interessa a liberação de machos; (3) irradiação por agentes mutagênicos para induzir esterilidade; (4) liberação de machos estéreis na área alvo e acasalamento com fêmeas selvagens (Figura 4).

Figura 4. Etapas da Técnica do Inseto Estéril.



Fonte: Lima (2015).

Para o sucesso da aplicação da técnica, a população a ser dizimada precisa apresentar característica monogâmica das fêmeas, pois uma vez que elas copulam com machos esterilizados, não estarão disponíveis aos machos férteis, garantindo assim a supressão populacional (KNIPLING, 1955). Portanto, serão necessários o conhecimento e uma análise da forma como a biologia e a ecologia da espécie-alvo afetará a viabilidade e a logística para o manejo integrado e a utilização da TIE (KNIPLING, 1955; ROBINSON, 2002).

Na TIE, a esterilização de machos pode ocorrer por uso de bactérias simbiotes, como a *Wolbachia*, por uso de quimioesterilizantes, como as substâncias alquilantes e triazinas ou por radiação ionizante, proveniente de radioisótopos como Co^{60} ou Raios-X de alta energia.

No irradiador gama, mais especificamente na base desse equipamento está o local onde ocorrerá a irradiação. Este local encontra-se tipicamente preenchido por várias “pastilhas” em formato cilíndrico, de ^{60}Co . A taxa de dose é pré-determinada pela atividade atual da fonte radioativa e o operador controla a dose que será absorvida pela amostra, ajustando o tempo de exposição (HELINSLKI *et al.*, 2009).

Os irradiadores de armazenamento a seco (Figura 5) onde a fonte radioativa fica dentro de um escudo protetor de chumbo e geralmente possuem um mecanismo

para o manuseio das amostras. A amostra biológica é armazenada nos canisters e exposta a uma fonte radioativa.

Figura 5: irradiador de amostra biológica Gammacell-220, pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (DEN-UFPE), Recife, Brasil.



Fonte: Os autores (2024)

Considerada a TIE clássica, o uso de radiação ionizante para esterilização de insetos machos apresenta vantagens sobre o uso de químicos e organismos modificados, uma vez que não deixa resíduos tóxicos e nem envolve o uso de outros organismos. Além disso, é compatível com a utilização concomitante de compostos com ação larvívica e/ou ovívica (TWEEN, 2002; MOSCAMED, 2014). Bakri *et al.* (2005) apresentam três benefícios ao empregar radiação ionizante para esterilizar insetos: o aumento de temperatura durante o processo é irrelevante; insetos estéreis podem ser soltos rapidamente após a irradiação; a irradiação pode passar através de vários materiais, possibilitando que os insetos sejam irradiados, mesmo estando acondicionados.

Knipling (1955) relatou o primeiro sucesso de aplicação da TIE no campo, com a erradicação de moscas varejeiras (*Dermatobia hominis*), em 1954, meses após liberações semanais e inundativas de moscas varejeiras estéreis na Ilha de Curaçao, na Venezuela, em 1954. Em 1955, Knipling propôs o conceito de liberação de insetos estéreis para controlar pragas agrícolas, e, a partir daí, a técnica foi utilizada para a erradicação de várias outras pragas a exemplo de *Anastrepha ludens*, no sudoeste da Califórnia, em 1954; *Bactrocera tryoni* na Austrália, em 1962; *Bactrocera cucurbitae*, nas ilhas sudoestes do Japão (LANCE e MCINNIS, 2005; KOYAMA *et al.* 2004; ENKERLIN, 2005).

Posteriormente, outros relatos de sucesso com a incorporação a TIE a um programa integrado para o manejo de pragas em área extensa (originalmente, em inglês, “Area-wide Integrated Pest Management” ou AW-IPM), para a eliminação de *C. hominivorax* em outras regiões do mundo foram referidos (BUSHLAND *et al.*, 1958). Os locais que se tornaram livres desta praga foram: Flórida, em 1958; Sudoeste dos Estados Unidos e México, em 1962; Porto Rico e Ilhas Virgens, em 1975; América central, em 1984; África do Norte, em 1989, Belize e Guatemala, em 1994, El Salvador, em 1995, Honduras, em 1996, Nicarágua, em 1999, Costa Rica, em 2000 e Panamá, 2001 (BUSHLAND, 1985; MEYER; MASTRANGELO, 2011; HENDRICHS *et al.*; 2005).

Posteriormente, a TIE foi aplicada para o controle de vetores, capazes de transmitir doenças ao homem (DAME *et al.*, 1964; REISEN, 1982; DAME *et al.* 2009, OLIVA *et al.*, 2012; BELINI *et al.*, 2013; ERNAWAN *et al.*, 2017; FLORÊNCIO, 2017; BOND *et al.*, 2019).

No caso de algumas espécies, como *A. aegypti* e *A. albopictus*, o uso da esterilização por radiação ionizante também pode interromper a reprodução livre de populações selvagens, porém é um processo gradativo, sendo necessárias várias solturas de machos irradiados para se atingir o objetivo. Isso é consequência, principalmente, do fato de que podem existir na natureza uma grande quantidade de ovos, que, após um longo período de quiescência (de até 450 dias, no caso do *A. aegypti*), podem eclodir e originar insetos viáveis (FLORÊNCIO, 2017).

Lima (2015), utilizando a TIE para controle de *Aedes aegypti* apresentaram resultados promissores, em seus experimentos de laboratório. Os autores utilizaram doses de 30, 40 e 50 Gy de radiação gama para a esterilização do mosquito. No

entanto, apenas a dose de 50 Gy promoveu a esterilidade total. Para as doses de 30 e 40 Gy, observaram-se que os percentuais de ovos viáveis de fêmeas (não irradiadas) e que cruzaram com machos irradiados, foram de 42 % e 16 %, respectivamente.

A partir de 2015, Florêncio (2017), realizou a liberação em massa de mosquitos machos *A. aegypti* irradiados, na Praia da Conceição, Ilha de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. Foram empregados dois esquemas de liberação: o primeiro, que iniciou em dezembro de 2015, com a liberação de machos expostos a 40 Gy e perdurou por 16 semanas sucessivas (dez/2015 a abril/2016) e, o segundo (a partir de maio/2016), com machos esterilizados com 50 Gy nos eventos subsequentes que perdurou até nov/2016. A soltura de machos estéreis na vila da Praia da Conceição levou a uma diminuição do nível de infestação por *A. aegypti* nesta localidade, no período de maio a setembro de 2016, tendo as autoras concluído que o conjunto de informações técnicas geradas no estudo confirmaram a viabilidade da TIE para o controle de *A. aegypti* em ambientes insulares e apontaram para seu uso potencial em contextos urbanos em áreas continentais.

Considerando os resultados observados por Lima (2015) e Florêncio (2017), Verçosa (2019) utilizou a TIE em *A. aegypti* a fim de investigar os efeitos genotóxicos de diferentes doses de radiação gama em pupas por meio do Ensaio Cometa. O autor verificou que quanto maior a dose de radiação gama aplicada maior o dano genético, sendo este efeito diretamente associado ao aumento crescente dos níveis de esterilidade em machos adultos.

3.3 Citogenética em *Aedes aegypti* irradiados

A citogenética é o ramo da genética que estuda os cromossomos, quanto a seu número, sua função, estrutura, morfologia, comportamento biológico e alterações cromossômicas, assim como o mapeamento de genes específicos (GUERRA, 1998).

Tais variações, estruturais, funcionais ou morfológicas, por exemplo, revelam alterações a nível individual, que envolvem anomalias cromossômicas; populacional, referentes a variações intraespecíficas; e a nível espécie, como eventos de especiação.

Consiste na análise dos cromossomos da célula em divisão, em particular, na metáfase, fase de maior condensação dos cromossomos. Após a interrupção da mitose, seguem-se procedimentos técnicos, como hipotonia e fixação, preparo do espalhamento cromossômico, coloração por banda G, pareamento e montagem do cariótipo.

Desde o início da década de 1950, diversas técnicas foram desenvolvidas a fim de melhor observação dos cromossomos. Entre elas estão o uso de solução hipotônica, que causa edema celular, ruptura e melhor separação dos cromossomos individuais, e o uso de corantes que são absorvidos em partes diferentes dos cromossomos.

A expressiva contribuição dos estudos citogenéticos em insetos possibilita o conhecimento de diversas particularidades, incluindo aspectos numéricos, morfológicos, estruturais, de diferenciação e deslocamento cromossômico durante os eventos de reprodução celular, e ainda é capaz de elucidar processos associados a evolução cromossômica desta classe (GUERRA, 2002).

A citogenética tem se mostrado uma excelente ferramenta para análise de várias espécies, visando um maior conhecimento sobre evolução, taxonomia e espécies vetores. Um exemplo são os mosquitos da família Culicidae, que apresentam um cariótipo $2n = 6$ cromossomos.

O primeiro relato sobre o número de cromossomos da espécie *Aedes aegypti* foi em 1918 por Carter. A autora, utilizando gônadas seccionadas descreve um cariótipo de $2n = 4$. Sutton (1942), por sua vez, usando uma técnica consideravelmente melhorada de esmagamento, em glândulas salivares, indicou que o número somático de cromossomos era seis. O que foi confirmado por Rai e Chaig (1961) e Breland e Gassner (1961), utilizando células cerebrais de larvas de 4º estágio.

Rai (1963) indicou que dois pares (um grande, um pequeno) são metacêntricos e um dos pares maiores é ligeiramente submetacêntrico. Assim, pelo comprimento do cromossomo e pela posição do centrômero, os três pares foram reconhecidos individualmente e designados I, II e III. Segundo a classificação de McDonald e Rai (1970), o mosquito *Aedes aegypti* possui um cromossomo menor designado como I, um maior como II e um mediano como III, sendo os pares de cromossomos menor e maior metacêntricos, enquanto o par III (mediano) submetacêntrico (RAI e

HARTBERG, 1975).

Mosquitos da ordem Diptera apresentam cromossomos politênicos, os quais têm facilitado os estudos citogenéticos, a fim de obter informações estruturais e funcionais dos cromossomos, estudos citotaxonômicos e rearranjos cromossômicos. Diferentes tecidos foram utilizados para detectar cromossomos politênicos, como brânquias anais, intestino, glândulas salivares, papilas e túbulos de Malpighi em larvas de *A. aegypti* (SUTTON, 1942). Estudos citogenéticos para *A. aegypti*, em sua grande maioria, foram realizados em cromossomos mitóticos de gânglios cerebrais ou cromossomos meióticos de testículos (RAI, 1963; NEWTON *et al.*, 1964).

Na década de 1960, *Aedes aegypti* foi o mosquito mais utilizado para estudos de respostas dos cromossomos à irradiação (RAI, 1967). Rai (1963 *apud* RAI (1967) utilizando células cerebrais em divisão, verificou os efeitos da radiação nas atividades mitóticas, expondo larvas de 4^o instar a quatro doses de Raio-X (500 R, 1000 R, 2000 R, 4000 R ou 4,385 Gy, 8,77 Gy, 17,54 Gy, 35,08 Gy, respectivamente). O autor observou que todas as doses suprimiram a atividade mitótica quase completamente. Após um tempo (dependendo da dose utilizada), houve um grande aumento na divisão celular, sendo a taxa de 500 R e 1000 R mais do que o dobro da taxa do grupo controle (não irradiados). O raio X induziu nas células somáticas deleções, trocas, anéis, dicêntricos e pontes anafásicas.

A radiação pode interagir diretamente com a molécula de DNA (efeito direto) ou de modo indireto, resultando em alterações celulares e moleculares (SEGRETO e SEGRETO, 2000). Na forma indireta, a radiação transfere sua energia para moléculas intermediárias, como a água, ocorrendo a radiólise, o que acarreta na formação de produtos altamente reativos, os radicais livres, que são capazes de difundir e promover a quebra da dupla fita do DNA, ou da fita simples. Este efeito indireto é responsável pela maioria dos danos ao DNA, uma vez que aproximadamente 80% do conteúdo celular consiste em água (METTLER JUNIOR e UPTON, 1995; HALL, 2000).

Os efeitos das radiações ionizantes podem ser categorizados como somáticos ou hereditários. Os efeitos hereditários são observados, sobretudo, nos descendentes do indivíduo irradiado, enquanto os efeitos somáticos ocorrem no próprio indivíduo exposto à radiação. (SEGRETO e SEGRETO, 2000).

A manifestação dos efeitos biológicos pode ocorrer através do efeito determinístico e do efeito estocástico. Os efeitos determinísticos aparecem para

exposições acima de um valor limite de dose, aumentando a gravidade com o aumento da dose absorvida. Existe um limiar de dose absorvida necessário para desencadear esses efeitos, e sua gravidade aumenta conforme a dose radioativa aumenta (NAVARRO *et al.*, 2008). Essas reações teciduais são provocadas por doses radioativas consideráveis e só se manifestam quando ultrapassam um limiar específico, cujo valor varia conforme o tipo de radiação e o tecido irradiado. Um dos principais efeitos determinísticos é a morte celular (SEGRETO e SEGRETO, 2000).

Tal como os efeitos determinísticos, os efeitos estocásticos só aparecem a partir de um limiar de dose. Porém, diferentemente dos efeitos determinísticos, os efeitos estocásticos não ocorrem necessariamente, sendo governados pelas leis da probabilidade.. São efeitos não imediatamente aparentes, geralmente associados a doses baixas de radiação, e se desenvolvem ao longo de um período mais longo, tornando difícil estabelecer uma relação clara de "causa e efeito". Em células germinativas, podem ocorrer efeitos genéticos ou hereditários como resultado dessas mutações (BIRAL, 2002; D'IPPOLITO e MEDEIROS, 2005).

As alterações na sequência de bases do DNA podem induzir na melhoria da adaptação da célula, ou, mais frequentemente, alterar a funcionalidade de algumas moléculas, podendo levar à morte ou transformação celular e afetar os sistemas de controle da proliferação celular, convertendo gene normal para um oncogene (PIETRIASA e OSTMANB, 2010).

Essas aberrações podem ocorrer durante a meiose, na formação dos gametas e/ou formação do embrião, como também durante a mitose, podendo causar desequilíbrio na formação, no crescimento, no desenvolvimento e no metabolismo dessas células (HASSOLD e HUNT, 2001).

As aberrações cromossômicas podem ser instáveis ou estáveis. As estáveis (deleções, inserções e translocações), tendem a permanecer nas células ao longo dos processos de divisão celular. As aberrações instáveis (fragmêntos acêntricos, cromossomos discêntricos e em anel), são alterações na estrutura dos cromossomos quantificadas em exposições recentes à radiação ionizante (IAEA, 2001).

A transferência Linear de Energia (LET) é uma medida da taxa em qual a energia é transferida da radiação ionizante para tecido. O valor do LET varia com a velocidade, massa e carga da radiação ionizante (HALL, 2000). Em geral, radiações de alto LET, como partículas alfa e nêutrons, são mais eficazes na indução de danos

biológicos comparada à radiações de baixo LET, como raios X, radiação gama e partículas beta (DOWND e TILSON, 1999).

3.4 Bioensaios para identificação de danos no DNA

Os materiais genéticos dos organismos podem sofrer mutações causadas por agentes mutagênicos de natureza química, física ou biológica. Por ser capaz de causar lesão no DNA esses agentes são conhecidos como genotóxicos (DA COSTA e MENK, 2000).

Entende-se como genotoxicidade as alterações na estrutura dos cromossomos, por exposição a agentes tóxicos para os genes (DA COSTA e MENK, 2000). As lesões causadas por agentes tóxicos afetam processos celulares (WATSON *et al.*, 2006), e podem ser ou não corrigidas através de mecanismos de reparo da célula, levando à apoptose, ou causar alterações permanentes no DNA, (ERDTMANN, 2003).

Um agente é considerado mutagênico quando possui a capacidade de aumentar o número de mutação em um organismo. Mutação se refere a qualquer alteração estável numa sequência nucleotídica de DNA, capaz de proporcionar novas combinações genéticas e, conseqüentemente, uma variabilidade genética, onde essas modificações podem ser gênicas ou cromossômicas (GATEHOUSE *et al.*, 1990).

Apesar da mutação ser importante para a variabilidade nos processos evolutivos, proporcionando novas combinações genéticas e, conseqüentemente, uma variabilidade genética, podem exercer, na maioria das vezes, efeitos negativos ao fenótipo e provocar aparecimento de tumores (SNUSTAD e SIMMONS; 2001).

A radiação ionizante comporta-se como um agente genotóxico e/ou mutagênico para as células (VAISNAV *et al.*, 2014), pois é capaz de modificar o material genético e provocar uma cadeia de eventos biológicos prejudiciais ao DNA, como a dimerização das bases pirimidínicas, originar vias deletérias para os eventos da transcrição e replicação do material genético, troca de base, quebra de cadeia simples e quebras de cadeia dupla (NIKJOO *et al.*, 1998), além de afetar os processos biológicos normais, alterar a variabilidade genética das populações naturais e afetar variadas características como reprodução, morfologia e fisiologia, podendo induzir o surgimento de câncer e doenças degenerativas (UNSCEAR,2000).

O estudo sobre o efeito da radiação ionizante sobre os parâmetros genéticos pode oferecer informações importantes sobre as consequências da exposição no nível da população das espécies analisadas (MUSSALI-GALANTE *et al.*, 2014).

Diversos métodos são aplicados para avaliar o potencial mutagênico de moléculas variadas (AMES, 1979; NATARAJAN, 2002; OBE *et al.*, 2002). Esses estudos têm sido possíveis graças à citogenética, que por sua vez analisa os cromossomos, isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (GUERRA, 1988).

Atualmente diversos ensaios citogenéticos têm sido utilizados para monitorar populações expostas a agentes mutagênicos, com destaque ao Teste Citogenético do Micronúcleo (MN) e o Ensaio Cometa, que vêm se mostrando como boa alternativa em estudos a nível celular, que permite analisar lesões no material genético dos organismos (JESUS e CARVALHO, 2008), sendo útil na verificação do potencial genotóxico das substâncias e dos danos provocados aos organismos (HEDDLE *et al.*, 1983). Por esta razão é utilizado no estudo da genotoxicidade e/ou mutagenicidade, com o propósito de biomonitoramento (VILLELA *et al.*, 2006; SILVA, 2010).

A detecção de danos celulares, como micronúcleos (MNs), pontes nucleoplasmáticas (PNP), brotos nucleares, quebra cromossômica, dentre outras anomalias, são parâmetros genéticos que auxiliam em estudos de resposta de células expostas a agentes genotóxicos (FENECH *et al.*, 2011).

3.4.1 Teste do Micronúcleo

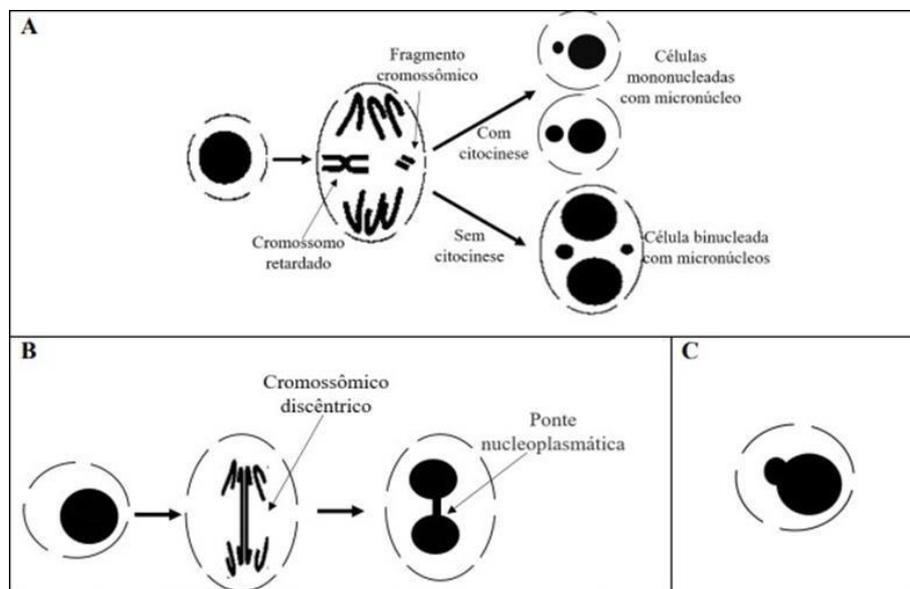
O Teste do Micronúcleo, desenvolvido por Schmid (1976), utilizando células de medula óssea de mamíferos, é utilizado em uma variedade de células animais e vegetais, tanto em sistema *in vitro* (FENECH, 2000) quando *in vivo* (RIBEIRO, 2003). Os micronúcleos foram descobertos por Howel (1900) no citoplasma de eritrócitos, que inicialmente receberam o nome de “fragmento de material nuclear”. No entanto, Boller e Schmid (1970), passaram a chamar esses fragmentos de micronúcleos.

Essas aberrações são resultado de anormalidades cromossômicas ou difuso, levando à formação de micronúcleos, que tendem a ser irreversíveis, passando para as futuras gerações por meio da hereditariedade, podendo levar à redução na diversidade de espécies do ecossistema impactado (OBIAKOR *et al.*, 2012).

O MN consiste em fragmentos cromossômicos acêntricos ou por cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula. É formado por agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), como também aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (RIBEIRO *et al.*, 2003, NATARAJAN, 2002; MATEUCA *et al.*, 2006; FENECH, 2007; 2010).

Os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso ou que possam induzir a perda de material genético, como cromossomos inteiros ou fragmentos de cromossomos (SCHMIDT, 1975; SILVA, 2010). Esses por sua vez ficam no citoplasma da célula e é envolvido por um envoltório nuclear, adquirindo características semelhantes às do núcleo principal (FENECH *et al.*, 2011) (Figura 6).

Figura 6: Formação de micronúcleo por perda de fragmento cromossômico acêntrico e cromossomo atrasado (A). Formação de ponte nucleoplasmática, a partir de um cromossomo dicêntrico (B). Broto nuclear (C).



Fonte: Adaptado de Fenech (2011), por Silva (2018)

As pontes nucleoplasmáticas são estruturas formadas após os rearranjos cromossômicos discêntricos, ou através de cromátides, que mantêm os núcleos das células filhas ligadas por finos fios de cromatina (SALVADORI *et al.* 2003; PALAZZO e MALUF, 2009). Já os brotos nucleares, são estruturas semelhante ao micronúcleo, que estão em contato com o núcleo principal.

Segundo Fenech (2000) essa estrutura de material genético presente no citoplasma precisa apresentar as seguintes características para ser considerado um MN: possuir um tamanho entre 1/6 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal, apresentar envoltório nuclear visivelmente distinto, não apresentar nenhuma conexão com o núcleo principal, ter intensidade de coloração similar ou igual à do núcleo principal e não ser birrefringente.

O teste de MN é um método simples, eficiente na detecção de lesão de DNA em uma célula, confiável, sensível, de baixo custo, pode ser realizado em qualquer população celular em proliferação (HAYASHI *et al.*, 1998; KRISHNA e HAYASHI, 2000), e pode ser aplicado em testes *in vivo* e *in vitro* (KRISHNA e HAYASHI, 2000; SEVERIN *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de célula nucleada de diversos organismos, como humanos (TONELINI *et al.*, 2014; BARBON *et al.*, 2015; COSTA JÚNIOR, *et al.*, 2018) peixes (BUENO *et al.*, 2017; ROBSON *et al.*, 2011), moluscos (SOTIL *et al.*, 2007, ROCHA e ROCH, 2016), e insetos (SANTOVITO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021 (b)) podem ser usadas para detecção de micronúcleos.

3.4.2 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa ou teste de Eletroforese em Gel de Célula Única, foi originalmente desenvolvido por Östling e Johanson (1984) e posteriormente aprimorado por Singh e colaboradores em 1988 em condições alcalinas (pH >13). Com a modificação foi possível otimizar a desnaturação do DNA e permitiu detectar um aumento na migração do DNA em decorrência do aumento nos níveis de quebras de fitas simples e sítios álcali lábeis (sítiosapurínicos), além das quebras defita dupla.

O Ensaio Cometa (EC) é uma técnica para análise genotóxica e reparo do DNA originalmente *in vivo* (BRENNAN *et al.*, 2012), no entanto recentemente tem-se realizado alguns testes *in vitro* (GUANGGANG *et al.*, 2013). O EC detecta apenas

danos no DNA, que podem resultar em mutações se o dano não for reparado, caso o reparo não aconteça, essas alterações no DNA são detectadas por outros testes (GONTIJO e TICE, 2003), como por exemplo o Teste do Micronúcleo.

Para execução da técnica do EC, as células são incorporadas em gel de agarose, e submetidas a detergente e soluções salinas para a lise celular (para remoção das proteínas histonas), induzindo a desespiralização do DNA e a liberação dos fragmentos por meio de soluções alcalinas, de forma que o DNA ocupará todo o espaço celular, assumindo a forma de um nucleóide (UMBUZEIRO e ROUBICEK, 2006) .

Durante a corrida de eletroforese, O DNA migra para o polo positivo (ânodo) do aparato (fragmentos menores migram mais rapidamente). Essa migração forma um arrasto, que lembra ligeiramente a cauda de cometa (SINGH *et al.*, 1988; KAŠUBA *et al.*, 2012). Assim, as lâminas são avaliadas de acordo com comprimento e quantidade de material genético presente na cauda, comparada à chamada “cabeça” do cometa (Figura 7). Essa migração é indicativa da frequência e da intensidade dos danos causados ao DNA onde, quanto mais rápida a migração da cauda (mais longa), maior a intensidade de danos ao DNA (AZQUETA e COLLINS, 2013). A análise dos nucleóides pode ser visualmente ou por meio de softwares de análise de imagem (GONTIJO e TICE, 2003; OCDE, 2014).

Figura 7: Padrão visual de um nucleóide.



Fonte: Os autores (2024)

O Ensaio Cometa é um método rápido, muito sensível e de baixo custo (BELPAEME *et al.*, 1998; COLLINS *et al.*, 2008) que tem mostrado sensibilidade para detecção de danos genéticos induzidos por diferentes agentes genotóxicos, como poluentes atmosféricos (SANTANA *et al.*, 2018), pesticidas (MISHRA *et al.*, 2014; CRUZ *et al.*, 2023), radiação induzida (KUMAR *et al.*, 2014; DOBRZYNSK *et al.*, 2014,

SHETTY *et al.*, 2017; VERÇOSA, 2019), radiação natural (VERÇOSA *et al.*, 2017), entre outros. O teste tem sido usado amplamente como ferramenta de investigação de danos ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares, em resposta a uma série de agentes genéticos nocivos em diferentes grupos animais, desde humanos (GODSCHALK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2014) a invertebrados, como o *Aedes aegypti* (SHETTY *et al.*, 2017; VERÇOSA, 2019).

No entanto, se faz necessário e urgente implementar novas abordagens para o estudo da mutagenicidade associada à técnica do inseto estéril, a fim de viabilizar uma rápida e qualificada caracterização destas alterações no material genético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação em massa de *Aedes aegypti* em laboratório

No presente estudo, foi utilizada uma linhagem de *Aedes aegypti*, coletada no arquipélago de Fernando de Noronha-PE, geração 13^a (FN-F13) e mantidas no Insetário do Departamento de Entomologia/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz.

Seguindo a metodologia utilizada por Florêncio (2017) para produção em massa de mosquitos *A. aegypti* em laboratório, o processo de criação foi padronizado nas seguintes etapas: produção larval; sexagem pupal; manutenção de mosquitos adultos e coleta de ovos. Todos os eventos foram feitos em salas com condições controladas de temperatura (26°C). Umidade (50 a 60%) e fotoperíodo (12:12 claro: escuro).

O processo de sexagem foi baseado no tamanho relativo das pupas, levando em conta que os machos são menores do que as fêmeas e são os primeiros a entrarem no processo de pupação. Após esta etapa, as pupas com idade entre 24 e 40 horas foram transferidas, com auxílio de uma pipeta Pasteur, para placas de Petri forradas com papel de filtro umedecido, para garantir a hidratação das pupas durante o procedimento de irradiação. O confinamento das pupas em placas de Petri, sem água, tem por objetivo reduzir sua mobilidade e assegurar a uniformidade durante a exposição à radiação.

4.2 Irradiação de *Aedes aegypti*

Para o processo de irradiação, pupas machos com idade entre 24 e 40 horas foram separadas das fêmeas e submetidas à exposição à fonte de radiação. Para o processo de irradiação das amostras biológicas foi utilizado o Irradiador de Armazenamento a Seco (Gammacell) pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (DEN/UFPE). As pupas machos foram irradiadas nas doses de radiação gama de 20, 30, 40 e 50 Gy, além de serem mantidos os controles não irradiados. A fonte radioativa utilizada foi o Cobalto-60 (Taxa de dose: 1,081 kGy/h).

Para a última dose de 50 Gy, apenas os mosquitos da geração parental (F0)

foram avaliados, conforme protocolo estabelecido por Lima (2015) e Florêncio (2017). Os grupos testados contabilizaram 70 indivíduos por placa, por dose. Um grupo controle negativo com 70 indivíduos foi separado e mantido com as demais amostras, porém não irradiado. Para cada dose de radiação e para o controle negativo foram consideradas triplicatas.

4.3 Avaliação do efeito da radiação gama na fecundidade e na fertilidade.

Para determinação do nível de esterilidade induzido nos mosquitos machos da geração parental (F0), foram formados dois grupos: Grupo A representado pela separação aleatória de 15 machos irradiados (MI) de cada tratamento (20, 30 40 Gy e 50 Gy) e 15 fêmeas não irradiadas (FNI) e Grupo B (grupo controle) representados por 15 machos não irradiados (MNI) e 15 fêmeas não irradiadas (FNI). Os indivíduos descritos como irradiados referem-se a indivíduos irradiados na fase de pupa. Estas avaliações foram realizadas em triplicata.

Os grupos foram colocados em recipiente plástico transparente (16 X 8 cm), telado. Machos e fêmeas foram alimentados com solução de açúcar a 10%, adicionalmente, às fêmeas foi oferecido por um período de 20 minutos, um repasto com sangue de camundongo para a obtenção das progênes dos grupos.

Para determinações da fecundidade e fertilidade dos descendentes da primeira geração filial (F1), foram formados três grupos para cada tratamento (0, 20, 30 e 40 Gy): Grupo A, formado com machos e fêmeas descendentes dos machos irradiados (FI x MI); Grupo B, formado com fêmeas descendentes dos machos não irradiados e machos descendentes de machos irradiados (FNI x MI); Grupo C formado por fêmeas descendentes de machos irradiados e machos descendentes de machos não irradiados (FI x MNI). Estes grupos foram comparado ao grupo controle, composto por fêmeas e machos descendentes de machos não irradiados (FNI x MNI). Os mosquitos descendentes destes cruzamentos deram origem à segunda geração filial (F2).

Em todos os experimentos, após o primeiro repasto sanguíneo das fêmeas, cada casal foi colocado em copo parafinado e telado para cruzamento, além de um copo plástico (50 mL) com papel de filtro e água (20 mL) para oviposição, onde ficaram por sete dias, sendo alimentados com solução de sacarose a 10%. Em seguida, os ovos foram contabilizados com o auxílio de estereoscópio (Zeiss) e do contador manual de células. Os ovos postos pelas fêmeas, apenas no primeiro ciclo gonotrófico,

para cada repetição de cada grupo, foram contados para estimar a fecundidade média de ovos por grupo.

Os ovos foram colocados para eclodir em água potável logo após a finalização da embriogênese (72 h). Ao final, a fertilidade foi estimada como o percentual médio de larvas em L1 em cada grupo/dose de radiação com relação ao número de ovos para cada cruzamento.

4.4 Avaliação genotóxica e mutagênica em *Aedes aegypti* exposto à radiação gama

4.4.1 Teste do micronúcleo

O procedimento utilizado para preparação das lâminas no teste do micronúcleo seguiu a metodologia estabelecida por Silva (2010), sendo utilizado para as preparações citológicas, o método de espalhamento de Imai *et al.* (1988), com adaptações por Rafael e Tadei (1998). O efeito mutagênico foi analisado em larvas e em machos e fêmeas adultos, seguindo os seguintes critérios:

(i) **Larvas:** Foram analisadas preparações citológica do gânglio cerebral, para avaliação dos neuroblastos, de larvas, no 3^o estágio, das gerações filiais F1 e F2, sendo consideradas dez larvas em cada tratamento (20, 30 e 40 Gy) e o controle negativo, totalizando 50 lâminas;

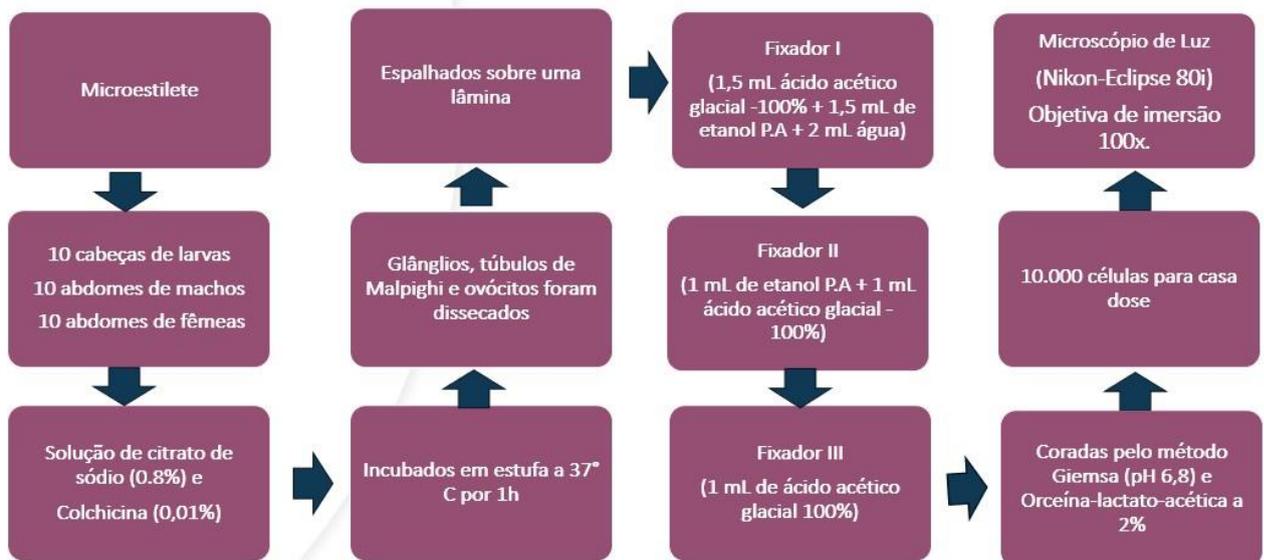
(ii) **Adultos:** foram analisadas lâminas contendo células mitóticas de túbulos de Malpighi de machos adultos (F0 a F2), onde na geração F0 foram analisados indivíduos que foram irradiados nas doses de 20, 30, 40 e 50 Gy, e nas gerações subsequentes, aqueles descendentes de machos irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy. Também foram analisadas lâminas contendo células meióticas de ovócito de fêmeas adultas, das gerações F1 e F2, descendentes de machos irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy. Nas duas avaliações, em cada dose foram analisadas 10 lâminas, sendo mantidos os controles.

Com o auxílio de microestiletos (palito de madeira com ponta de alfinete) e estereoscópio, retirou-se as cabeças das larvas e abdômens dos machos e das fêmeas. os quais foram transferidos para solução de citrato de sódio 0.8% e colchicina 0.01% (concentração final de 0.005%), e incubados em estufa a 37 °C por 1 hora.

Posteriormente, com o auxílio do microestilete, os gânglios cerebrais, túbulos

de Malpighi e ovários foram dissecados e espalhados sobre a lâmina, adicionando-se uma gota do fixador I (1,5 mL ácido acético glacial 100% + 1,5 mL de etanol P.A + 2 mL água). Em seguida, adicionou-se mais uma gota do fixador I, para retirar o excesso de material. Após 5 minutos, adicionou-se gotas do fixador II (1 mL de etanol P.A + 1 mL ácido acético glacial 100%) e, passados mais 5 minutos, adicionou-se o fixador III (1 mL de ácido acético glacial 100%). As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente (T.A) por 4 horas e, posteriormente, foram coradas pelo método de Giemsa (pH 6,8) e orçéia-lacto-acética a 2%, por 10 minutos e, em seguida, foram lavadas em água destilada e secas em T.A. por 24 horas. Após esse período, foi adicionada sobre as lâminas uma gota de Entellan[®], e sobre esta, uma lamínula. O excesso de Entellan[®] foi removido com o solvente Xilol e, após 4 horas, as lâminas foram armazenadas em caixa e mantidas em freezer à temperatura - 20 °C, para posterior análise. A Figura 8 é um esquema simplificado destas etapas.

Figura 8: Esquema simplificado da metodologia do teste do Micronúcleo.



Fonte: Os autores (2024)

Em cada geração, a avaliação da genotoxicidade foi realizada mediante as frequências de anomalias em núcleos mitóticos de neuroblastos, mitóticos de túbulos de Malpighi e meióticos de ovócitos de *A. aegypti*. Para cada dose determinou-se a contagem de 10 mil células núcleos interfásicos e em divisão de células de neuroblastos de 10 larvas (n = 10), 10 mil dos túbulos de Malpighi e 10 mil dos ovários

(n = 10) de indivíduos adultos, respectivamente. Para isto, utilizou-se microscópio de luz Nikon-Eclipse 80i, por meio de objetiva de imersão 100x. Na contagem dos núcleos normais e micronúcleos encontrados, foi utilizado um contador mecânico hematológico de células (Blood Cell Counter, DigiTimer).

4.4.2 Ensaio cometa em *Aedes aegypti*

No experimento do Ensaio Cometa foram utilizadas células da hemolinfa (hemócitos), de adultos de *A. aegypti* da geração F0, células da hemolinfa de larvas e adultos das gerações F1 e F2. A metodologia do ensaio Cometa em *A. aegypti* foi baseada na descrição de Verçosa *et al.* (2019).

- Obtenção dos hemócitos:

A extração dos hemócitos presentes na hemolinfa de *A. aegypti* foi realizada em indivíduos em cada fase de desenvolvimento. No total, foram estabelecidas três repetições para cada dose, com cada repetição contendo 20 indivíduos, o que totalizou 60 indivíduos por dose. Os indivíduos foram contados e mantidos em uma placa de Petri, resfriadas a 4 °C por 1 min para a diminuição metabólica, facilitando a sua manipulação. Seguido ao resfriamento, os indivíduos foram transferidos, individualmente, em uma placa escavada Kline, contendo solução de EDTA, para evitar a coagulação da hemolinfa. Para esse processo, foi utilizado um microscópio estereoscópico (lupa), e com a ajuda de um bisturi e uma pinça de relojoeiro nº 5 e uma seringa de 5 mL, foram realizados dois cortes nas cutículas de cada indivíduo (larvas e adultos): uma transpassando o tórax e uma segunda lesão, no abdômen.

A hemolinfa depositada no fundo da placa escavada foi retirada com a ajuda de uma micropipeta e colocada em tubos de microcentrífuga (1,5 mL). A hemolinfa obtida de cada uma das três repetições foi transferida para um único tubo, constituindo um pool celular de todos os indivíduos, por cada repetição. O volume final de solução de EDTA + hemolinfa foi equivalente a 0,5 mL por tubo. O material foi submetido à centrifugação a 3.000 rpm por 6 minutos, sendo descartados 100 µL do sobrenadante, seguido do acréscimo de mais 100 µL de solução de EDTA, completando o volume do tubo novamente para 0,5 mL, para a segunda centrifugação.

- **Montagem das lâminas:**

Lâminas de vidro foram previamente lixadas, lavadas em água destilada e esterilizadas em álcool. Na sequência, as lâminas foram banhadas em agarose padrão. Após este preparo das lâminas e obtenção do material biológico de larvas e indivíduos adultos de *A. aegypti*, estas foram montadas com uma camada de 60 µL de suspensão celular, homogeneizado em 100 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LMP) a 37 °C. Esse homogeneizado foi aplicado na lâmina previamente banhada em agarose padrão. Sobre o material foi colocada uma lamínula. As lâminas assim preparadas foram submetidas a 4 °C por 10 min com o objetivo de solidificar o material. Após esse tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas com o material biológico foram submersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10 e mantidas a 4 °C por 72 h. Ao término do período de lise celular, as lâminas foram submetidas a uma solução tampão a 4 °C (1M NaOH e 200 mM EDTA), pH > 13 por um período de 20 min a fim de desnaturar o material genético.

Na sequência, foi realizada a corrida eletroforética durante 20 min a 40 V e 300 mA, em uma cuba com 40 cm. Após a corrida, as lâminas foram neutralizadas em solução específica (0,4 M Tris-HCl pH 7,5) por 15 min, e após, foram fixadas em etanol absoluto por 5 min, secas em temperatura ambiente, e armazenadas a 4 °C até o momento da análise em microscopia fluorescente.

-**Análise em microscopia:**

As lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRedTM, diluído em água para injeção, na proporção de 1:500, sendo observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com o aumento de 400x, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Em cada repetição dos tratamentos foram observados um total de 100 nucleoides (sendo 50 em cada uma das duas lâminas analisadas). Um a um os cometas foram classificados em cinco classes, de 0 a 4. A classe 0 compreende os cometas considerados intactos, ou seja, sem danos causados pela exposição; a Classe 1 corresponde a cometas com danos mínimos; Classe 2 a cometas com danos

médios; Classe 3 a cometas com danos intensos; e a Classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos.

Foram utilizados três índices de análise visual: a Percentagem de Classe de Dano (PCD), o Índice de Danos (ID) e a Frequência de Danos (%) (Andrade *et al.* 2004).

A Percentagem de Classe de Dano (PCD) (Eq. 01) foi calculada como a percentagem de ocorrência de cada classe no total de cometas contados.

$$PCD\% = \frac{n^{\circ} \text{ de determinada classe} \times 100}{n^{\circ} \text{ total de cometas}} \quad (\text{Eq. 01})$$

Os valores obtidos através do Índice de Dano (ID), podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x dano 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x dano 4). Deste modo, o ID total foi calculado pela seguinte fórmula:

$$ID = 0 \times (n^{\circ} \text{ Classe } 0) + 1 \times (n^{\circ} \text{ Classe } 1) + 2 \times (n^{\circ} \text{ Classe } 2) + 3 \times (n^{\circ} \text{ Classe } 3) + 4 \times (n^{\circ} \text{ Classe } 4) \quad (\text{Eq. 02})$$

A **Frequência de Dano** (FD%), que representa a percentagem de todos os cometas com danos (Classe 1 até a Classe 4) em relação ao total de cometas contabilizados, que corresponde desde a classe 0 até a classe 4 (nº total). Assim, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$FD(\%) = \frac{[(n^{\circ} \text{ total de cometas} - n^{\circ} \text{ de cometas com Dano } 0)]}{n^{\circ} \text{ total de cometas}} \times 100\% \quad (\text{Eq. 03})$$

4.5 Análises estatísticas

A análise estatística final dos resultados foi realizada através dos testes ANOVA e o pós-teste de Tukey. Foi estabelecido um nível de significância em todos os testes de $p < 0,05$ e o *software* utilizado foi o STATA versão 13.0., na avaliação das

diferenças entre tratamentos para as determinações dos parâmetros fecundidade e fertilidade ($p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos da irradiação sobre a fecundidade e fertilidade

Na Tabela 01 são apresentados os resultados obtidos nas determinações da fecundidade e da fertilidade para a geração F0. A análise dos dados obtidos indicam que os machos irradiados parecem influenciar no número de ovos postos pelas fêmeas não irradiadas (FNI), uma vez que foram observadas reduções nas quantidades médias de ovos postos pelas fêmeas que acasalaram com MI em comparação com as quantidades médias de ovos postos pelas fêmeas que acasalaram com machos não irradiados (MNI) (Tabela 01).

As maiores reduções foram observadas para as FNI que acasalaram com MI nas doses de 20 e 40 Gy, sendo os percentuais médios de redução de oviposição de $(47,03 \pm 0,41) \%$ e $(39,22 \pm 0,31) \%$, respectivamente. Para as FNI que acasalaram com MI nas doses de 30 e 50 Gy, os percentuais médios de redução de oviposição foram de $(15,63 \pm 0,45) \%$ e $(25,19 \pm 0,11) \%$, respectivamente.

Este resultado difere do observado por Helinski *et al.*, (2006), que estudou o mosquito *An. Arabiensis* (Diptera: Culicidae) irradiados nas doses de 25, 50, 60, 70, 80, e 100 Gy, e Mendonça *et al.* (2021), que estudou a geração parental de *A. aegypti* e os descendentes de machos irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy. Estes autores irradiaram o mosquito na fase de pupa e observaram que não ocorreu influência da radiação na fecundidade das fêmeas que acasalaram com machos da geração parental, em comparação com o controle.

Os resultados apresentados por Shetty *et al.* (2017) indicam que ocorreu diferença da fecundidade de fêmeas que copularam com machos irradiados na fase adulta em doses a partir de 30 Gy, em comparação ao controle. Os autores atribuíram os resultados obtidos ao fato de os machos irradiados não produzirem ou transferirem às fêmeas esperma suficiente durante a cópula, o que provavelmente, pode explicar os resultados aqui obtidos.

Tabela 01 – Valores médios para a fecundidade e fertilidade dos indivíduos da geração parental (F0), submetidos aos diferentes tratamentos. N= 70

Dose (Gy)	Fecundidade	Ovos eclodidos	Fertilidade
Controle	810,0 ± 5,0 ^a	557,7 ± 2,1	68,85 ± 0,54 ^a
20	429,0 ± 6,0 ^b	297,3 ± 2,1	69,30 ± 0,52 ^a
30	683,0 ± 3,5 ^c	439,7 ± 4,2	64,43 ± 0,46 ^b
40	492,0 ± 3,1 ^d	149,3 ± 3,5	30,33 ± 0,90 ^c
50	606,0 ± 3,6 ^e	12,0 ± 2,6	1,99 ± 0,44 ^d

Fonte: Os autores (2024). *Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste estatístico utilizando a ANOVA one-way seguida de Tukey, ao nível de significância de 5%. Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentaram diferença estatística significativa entre si.

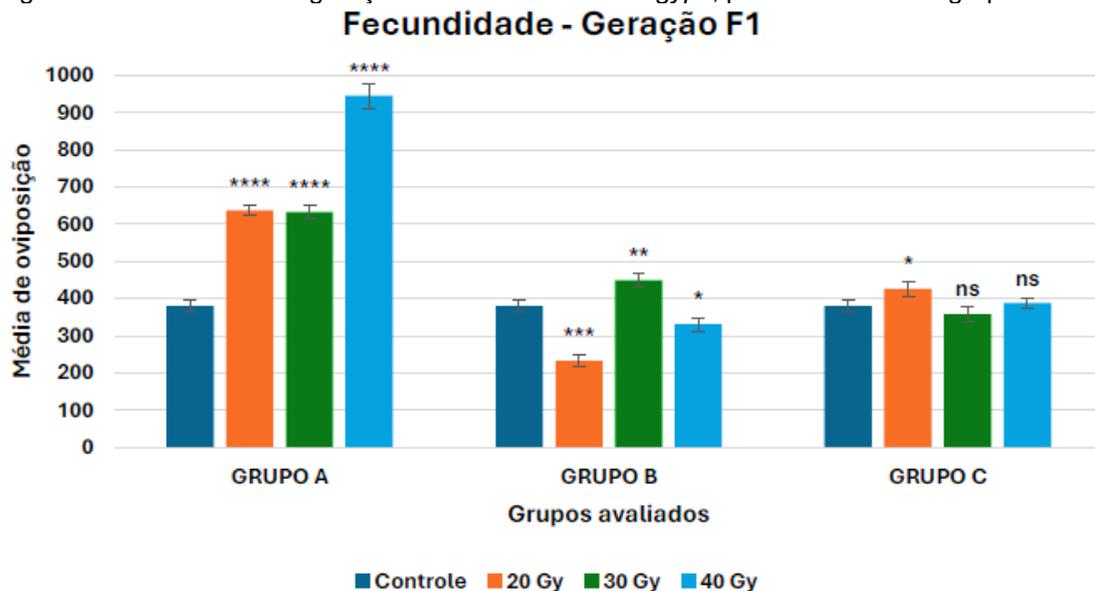
Apesar de ter havido diminuição significativa na quantidade de ovos postos por fêmeas que cruzaram com machos irradiados, indicando a influência dose-dependente da radiação na fecundidade, a viabilidade desses ovos (fertilidade) na dose de 20 Gy não diferiu da observada para o grupo controle. Já a partir da dose de 30 Gy, a análise estatística mostrou haver diferença significativa com relação ao controle, mostrando que para o parâmetro fertilidade, a influência da radiação foi dose-dependente a partir dessa dose.

Os resultados aqui obtidos para a fertilidade para a geração parental corroboram com aqueles apresentados por Balestrino *et al.*, (2010), Lima (2015), Florêncio (2017), Ernawan (2017) e Shetty *et al.*, (2017), os quais também observaram a diminuição da fertilidade de forma dose-dependente, em mosquitos irradiados em diferentes fases de desenvolvimento. Como afirmado por Bushland e Hopkins, apud Klassen *et al.* (2021), a radiação gama pode induzir mutações letais em todas as células, especialmente nas células germinativas, as quais estão em constante divisão. Este efeito pode causar a morte do embrião, resultando em ovos não viáveis, como observado no presente estudo.

Na Figura 09 são apresentados os resultados das fecundidades das fêmeas de cada grupo avaliado nos diferentes tratamentos para a geração F1. A análise estatística mostrou que o **Grupo A**, formado por casais compostos por machos e fêmeas descendentes dos machos irradiados (FI x MI), apresentou aumento da fecundidade para as diferentes doses estudadas, sendo este aumento significativo (p -valor < 0,0001). Já para o **Grupo B**, formado por casais compostos por fêmeas descendentes dos machos não irradiados e machos descendentes de machos irradiados (FNI x MI), houve uma diminuição da fecundidade para as doses de 20 e

40 Gy, enquanto para a dose de 30 Gy, houve um aumento. Os resultados observados para o **Grupo C**, compostos por fêmeas descendentes de machos irradiados e machos descendentes de machos não irradiados (FI x MNI), mostram a diminuição da fecundidade apenas para as fêmeas descendentes dos machos irradiados com 20 Gy. Para as doses de 30 e 40 Gy não foram observadas diferenças significativas com relação ao controle.

Figura 9: Fecundidade da geração filial F1 de *Aedes aegypti*, para os diferentes grupos estudados.



Fonte: Os autores (2024). Legenda: Grupo A, composto por fêmeas e machos adultos descendentes de machos irradiados (FI x MI); Grupo B, composto por fêmeas descendentes de machos não irradiados e por machos descendentes de machos irradiados (FNI x MI); Grupo C, composto por fêmeas descendentes de machos irradiados e machos descendentes de machos não irradiados (FI x MNI). O grupo controle foi formado por fêmeas e machos descendentes de machos não irradiados (FNI x MNI). Cada valor representa a Média \pm Desvio Padrão de experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada comparando o controle com os tratamentos dentro de cada grupo, utilizando o teste t-Student para amostras independentes, ao nível de 5% de significância. LEGENDA: **** p-valor < 0,0001; *** 0,0001 \leq p-valor \leq 0,0009; ** 0,001 \leq p-valor \leq 0,009; * 0,01 \leq p-valor < 0,05; ns = não significativo.

Na Tabela 02 é apresentado o resultado das comparações das fecundidades entre grupos. Observa-se que a fecundidade das fêmeas foi maior para o Grupo A, formado por FI x MI, independentemente da dose recebida pelo macho ascendente. Pode-se interpretar este resultado como sendo uma resposta adaptativa das fêmeas quando estas tentam compensar os efeitos deletérios herdados, aumentando a produção de ovos.

Tabela 02 – Comparação, entre grupos, da fecundidade de *A. aegypti*, para a primeira geração filial (F1). Valores expressos como médias \pm desvio padrão.

Grupo*	20 Gy	30 Gy	40 Gy
A	637,0 \pm 14,5 ^{A,a}	633,0 \pm 18,2 ^{A,a}	946,0 \pm 33,7 ^{A,b}
B	233,0 \pm 17,4 ^{B,a}	449,0 \pm 17,6 ^{B,b}	331,0 \pm 18,2 ^{B,c}
C	426,0 \pm 19,6 ^{C,a}	358,0 \pm 21,2 ^{C,b}	388,0 \pm 11,8 ^{C,b}

Fonte: Os autores (2024). **LEGENDA:** *Grupo A, composto por fêmeas e machos adultos descendentes de machos irradiados (FI x MI); Grupo B, composto por fêmeas descendentes de machos não irradiados e por machos descendentes de machos irradiados (FNI x MI); Grupo C, composto por fêmeas descendentes de machos irradiados e machos descendentes de machos não irradiados (FI x MNI). Análise estatística realizada a partir do teste t-Student. Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre doses (comparação com o controle). Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre grupos. Foi considerado um nível de significância de 5% para todos os testes.

Na Tabela 03 são apresentados os resultados obtidos para o parâmetro fertilidade para a geração F1. É possível observar a que as fêmeas apresentaram diminuição estatisticamente significativa da fertilidade, nos três grupos avaliados, com o aumento da dose até 30 Gy. Na dose de 40 Gy, apesar da fertilidade com relação ao controle e à dose de 20 Gy ser menor, existe um aumento estatisticamente significativo com relação à dose de 30 Gy, nos três grupos avaliados.

Tabela 03 – Avaliação da fertilidade de *A. aegypti*, para a primeira geração filial (F1). Valores expressos como médias \pm desvio padrão.

Dose (Gy)	Grupo A*	Grupo B**	Grupo C***
Controle		82,5 \pm 0,8 ^A	
20 Gy	69,2 \pm 0,4 ^{B,a}	75,6 \pm 2,3 ^{B,b}	87,9 \pm 1,0 ^{B,c}
30 Gy	46,8 \pm 0,5 ^{C,a}	48,0 \pm 1,4 ^{C,a}	51,7 \pm 0,8 ^{C,b}
40 Gy	49,5 \pm 1,6 ^{D,a}	52,1 \pm 1,0 ^{D,a}	72,6 \pm 1,1 ^{D,b}

LEGENDA: *Grupo A, composto por fêmeas e machos adultos descendentes de machos irradiados (FI x MI); **Grupo B, composto por fêmeas descendentes de machos não irradiados e por machos descendentes de machos irradiados (FNI x MI); ***Grupo C, composto por fêmeas descendentes de machos irradiados e machos descendentes de machos não irradiados (FI x MNI). Análise estatística realizada a partir da ANOVA one way seguida de Tukey. Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre doses (comparação com o controle). Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre grupos. Foi considerado um nível de significância de 5% para todos os testes.

Na comparação entre grupos, observa-se que, em média, os Grupos A (FI x MI) e B (FNI x MI) apresentaram fertilidades menores que as do Grupo C (FI x MNI), sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Os resultados de fecundidade mostraram que o Grupo A foi o grupo que apresentou os maiores valores de fecundidade. No entanto, os baixos valores de fertilidade sugerem que os machos

descendentes dos machos irradiados podem ter herdado mais dos danos genéticos sofridos por seus ascendentes, em comparação com as fêmeas (F1), acarretando em uma menor fertilidade das fêmeas com as quais copulam. Estes resultados são os primeiros apresentados na literatura, não sendo possível, portanto, realizar uma comparação com outros resultados.

5.2 Efeito Genotóxico em *Aedes aegypti* pelo Ensaio Cometa

Os valores absolutos e médios do nível de dano genético (zero a quatro), do cálculo do Índice de Dano (ID) e da Frequência de Dano (FD%) de hemócitos de larvas e adultos de *Aedes aegypti*, para o grupo controle negativo (0 Gy) e para os grupos (F1 e F2) descendentes dos expostos à radiação (20, 30 e 40 Gy), estão apresentados na Tabela 5. Observa-se valores baixos do ID e FD% em todos os grupos comparados aos valores apresentados pela geração parental (F0) apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos danos genéticos observados por meio do ensaio Cometa em adultos de *Aedes aegypti* irradiados com diferentes doses (20, 30 40 e 50Gy) de radiação gama (Cobalto-60), e grupo controle negativo (0 Gy), para geração parental (F0).

Grupos	Geração Parental (F0) - Adultos						
	Nível de Dano Genético					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
Controle negativo							
Média	87,67	10,00	2,33	0	0	14,67	12,33
Desvio Padrão	0,58	1,00	1,53	0	0	2,08	0,58
20 Gy							
Média	33,00	5,33	3,33	32,00	26,33	213,33	67,00
Desvio Padrão	1,00	0,58	0,58	1,00	0,58	2,31	1,00
30 Gy							
Média	27,67	3,33	1,33	32,00	35,67	244,67	72,33
Desvio Padrão	2,31	0,58	0,58	1,00	1,53	8,33	2,31
40 Gy							
Média	20,33	1,67	2,00	36,67	39,33	273,00	79,67
Desvio Padrão	2,08	0,58	0,00	0,58	1,53	6,93	2,08
50 Gy							
Média	18,00	1,00	1,67	38,33	41,00	283,33	82,00
Desvio Padrão	1,00	0,00	0,58	1,53	1,00	4,04	1,00

Fonte: Os autores (2024).

Tabela 5: Resultados dos danos genéticos observados por meio do ensaio Cometa em larvas e adultos dos grupos F1 e F2, descendentes de *Aedes aegypti* irradiados com diferentes doses (20, 30e 40Gy) de radiação gama (Cobalto-60).

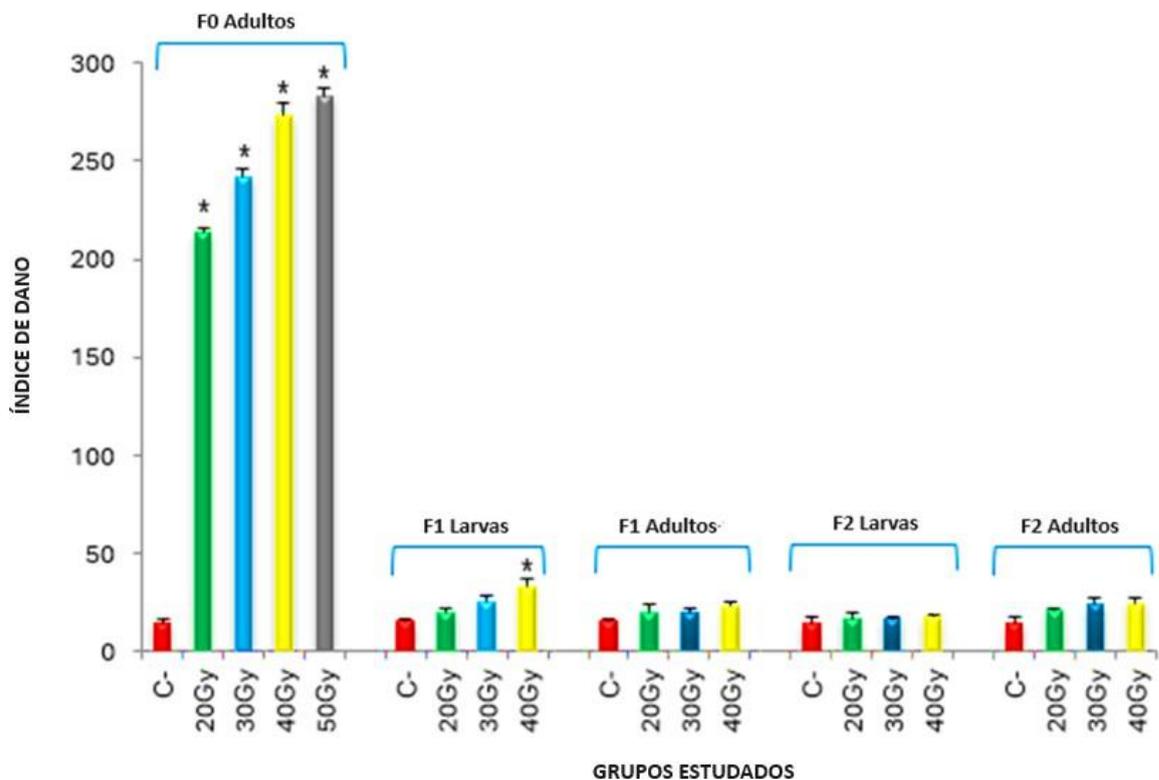
Grupos	1ª Geração Filial (F1) - Larvas							1ª Geração Filial (F1) - Adultos							
	Nível de Dano Genético							Nível de Dano Genético							FD %
	0	1	2	3	4	ID	FD %	0	1	2	3	4	ID		
Controle negativo															
Média	86,33	12,00	1,67	0	0	15,33	13,67	87,33	10,33	2,33	0	0	15,00	12,67	
Desvio Padrão	1,15	1,00	0,58	0	0	1,53	1,15	0,58	1,53	1,53	0	0	1,73	0,58	
20 Gy															
Média	86,00	8,67	5,33	0	0	19,33	14,00	87,33	8,00	4,67	0	0	17,33	12,67	
Desvio Padrão	1,00	2,31	2,52	0	0	3,06	1,00	1,53	1,00	0,58	0	0	2,08	1,53	
30 Gy															
Média	83,33	8,33	8,33	0	0	25,00	16,67	86,33	7,33	6,33	0	0	20,00	13,67	
Desvio Padrão	2,08	0,58	1,53	0	0	3,61	2,08	1,15	1,15	1,15	0	0	2,00	1,15	
40 Gy															
Média	78,67	10,67	9,67	1,00	0	33,00	21,33	83,67	9,67	6,67	0	0	23,00	13,67	
Desvio Padrão	1,53	0,58	1,15	1,00	0	4,58	1,53	1,53	0,58	1,15	0	0	2,65	1,53	
2ª Geração Filial (F2) – Larvas															
Grupos	Nível de Dano Genético							Nível de Dano Genético							FD %
	0	1	2	3	4	ID	FD %	0	1	2	3	4	ID		
Controle negativo															
Média	86,67	12,33	1,00	0	0	14,33	13,33	86,67	12,33	1,00	0	0	14,33	13,33	
Desvio Padrão	2,89	3,06	1,00	0	0	3,06	2,89	2,52	1,53	1,00	0	0	3,51	2,52	
20 Gy															
Média	88,00	7,00	5,00	0	0	17,00	12,00	86,33	7,00	6,67	0	0	20,33	13,67	
Desvio Padrão	1,73	1,00	1,00	0	0	2,65	1,73	0,58	2,00	1,53	0	0	1,15	0,58	
30 Gy															
Média	88,33	6,67	5,00	0	0	16,67	11,67	84,33	7,33	8,33	0	0	24,00	15,67	
Desvio Padrão	1,15	2,08	1,00	0	0	0,58	1,15	2,52	1,53	1,15	0	0	3,61	2,52	
40 Gy															
Média	87,67	7,33	5,00	0	0	17,33	12,33	84,00	7,67	8,33	0	0	24,33	16,00	
Desvio Padrão	1,15	1,15	0,00	0	0	1,15	1,15	2,00	1,15	1,15	0	0	3,06	2,00	

Fonte: Os autores (2024)

O teste ANOVA e pós-teste de Tukey foram aplicados aos resultados utilizando o programa STATA versão 13.0. Observa-se que em F0 (adultos resultantes de pupas irradiadas), as análises estatísticas comparativas do ID entre os grupos expostos (20, 30, 40 e 50Gy) e entre os grupos expostos e o controle negativo (adultos

resultantes de pupas não irradiadas) resultaram em diferenças significativas ($p = 0.0001$). Entretanto, entre F1 e F3 (larvas e adultos), os resultados demonstraram que não houve diferença significativa nas análises estatísticas comparativas do ID, assim como na comparação desses grupos em relação ao controle negativo (adultos descendentes de pupas não irradiadas), com exceção ao F1, na fase larval (40Gy), que apresentou diferença ($p = 0,0001$) quando comparado ao controle negativo, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10. Médias do Índice de Dano (ID) em hemócitos de adultos de *Aedes aegypti* irradiados em fase de pupa com doses de 20,30,40 e 50Gy (geração parental - F1) e médias do ID em hemócitos de larvas e adultos da primeira (F2) e segunda (F3) geração filial.



Fonte: Os autores (2024). Legenda: Os asteriscos (*) no topo da coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, comparados ao controle negativo (C-). As barras verticais no alto das colunas representam os valores de desvio padrão. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste ANOVA e pós-teste Tukey.

A adaptação da metodologia do ensaio cometa para avaliar a genotoxicidade em insetos é relativamente recente (SILVA *et al.*, 2021B), onde os primeiros relatos se dão ao organismo modelo *Drosophila melanogaster* (SIDDIQUE *et al.*, 2005; VERÇOSA *et al.* 2017), e em machos adultos de *A. aegypti* (SHETTY *et al.*, 2017).

Cruz *et al.* (2023) avaliou o efeito de produtos químicos em larvas de *A. Aegypti* utilizando o ensaio cometa.

O presente estudo utilizou o ensaio cometa para avaliar o efeito genotóxico da radiação gama em *Aedes aegypti*, em machos adultos (F0) que passaram pelo processo de irradiação na fase de pupa, nas doses de 20, 30, 40 e 50 Gy. Os efeitos da radiação gama (^{60}Co) foram claramente detectáveis por meio do ensaio cometa, indicando alta sensibilidade dos hemócitos do *Aedes aegypti*, apontando esse método como promissor no que se refere na avaliação dos danos genéticos promovidos pela TIE, com vistas ao controle populacional do *A. aegypti*. Os resultados demonstraram que quanto maior a dose de radiação ionizante, maior o índice de dano, corroborando os estudos de Shetty *et al.*, (2017) e Verçosa (2019).

No presente estudo, procurou-se também analisar o efeito da radiação ionizante nos indivíduos descendentes de F0 (gerações F1 e F2), nas fases de larvas e adultos. Os resultados encontrados para ambas as fases não diferiram do controle negativo (indivíduos descendentes de machos e fêmeas não irradiados), exceto para F2 larvas na dose de 40 Gy, demonstrando que os danos encontrados em F0 foram reparados e, portanto, não passaram à descendência. Portanto, apesar de ter sido observado aumento linear significativo de danos ao DNA, foi observado em todas as amostras da geração F0, sendo o índice de dano proporcional à dose que o organismo recebeu, para as gerações filiais (F1 e F2) não foram observadas diferenças significativas em comparação ao grupo controle. Isso pode indicar reparo do DNA danificado e/ou perda de células contendo muitos danos à medida que passa às gerações futuras.

Percebe-se com os resultados obtidos que a compreensão dos impactos da radiação ionizante no DNA é fundamental para avaliar os riscos vinculados à exposição e para a concepção de estratégias de proteção. A investigação dos danos genéticos decorrentes da radiação assume uma relevância significativa em diversos domínios, abrangendo desde a medicina nuclear até a preservação ambiental.

5.3 Efeito mutagênico em *Aedes aegypti*

Foram analisadas lâminas preparadas com tecido de gânglios cerebrais de larvas, túbulos de Malpighi de machos adultos e de ovários de fêmeas adultas, de *A.*

aegypti, para determinar o efeito mutagênico. Na geração parental foi verificada a presença de micronúcleos. Entretanto, foram raramente encontrados em indivíduos descendentes (F1 e F2) dos indivíduos irradiados nas doses de 20, 30 e 40 Gy, principalmente no controle negativo. As frequências totais de micronúcleos são apresentadas em cada geração.

5.3.1 Micronúcleos (MN) em neuroblastos (gânglios cerebrais) em *Aedes aegypti*.

Nas análises de células de gânglios cerebrais de larvas de 3º estágio (L3) da primeira e segunda geração filial (F1 e F2) expostas a diferentes doses de radiação (20, 30, 40 e 50 Gy), foram registradas as presenças de células com micronúcleos.

Na geração F1, a frequência média do total de micronúcleo foi de 0,003; 0,003, 0,004 e 0,005% para as doses de 20, 30, 40 e 50 Gy e frequência 0,003; 0,003 e 0,004%, nas doses de 20, 30 e 40 Gy, na geração F2. No controle negativo foi de 0,002 para F1 e F2, como mostra a Tabela 6.

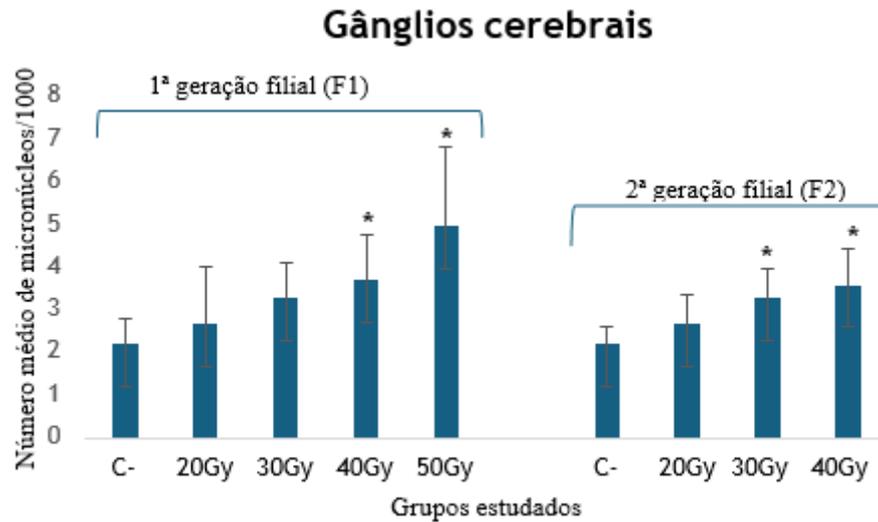
Tabela 6: Comparação da média e desvio padrão da frequência de micronúcleo em neuroblatos de larvas nas gerações F1 e F2, tratadas com diferentes doses de radiação ionizante (20, 30, 40 e 50 Gy*) e o controle negativo (não-irradiado).

Dose recebida (Gy)	Micronúcleos	
	$\bar{x} \pm s$	
	F1	F2
(Controle)	0,002 ± 0,063	0,002 ± 0,063
20	0,003 ± 0,134	0,003 ± 0,067
30	0,003 ± 0,082	0,003 ± 0,067
40	0,004 ± 0,106	0,04 ± 0,084
50	0,005 ± 0,183	-

Fonte: Os autores (2024). Legenda: F = geração; \bar{x} = média; s = desvio padrão. *Não há resultados da dose de 50 Gy na geração F3 porque não houve descendentes.

Em neuroblasto de larvas descendentes (F1 e F2) houve aumento significativo de micronúcleos, comparado ao controle negativo ($p < 0.05$), nas doses de 30 e 40 Gy (Figura 11).

Figura 11: Número médio de micronúcleos em células mitóticas de gânglios cerebrais de larvas de *Aedes aegypti* e controle negativo (não-irradiado) da primeira e segunda geração filial (F1 e F2) expostos a diferentes doses de radiação.



Fonte: Os autores (2024). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de experimentos independentes. ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey; * $p < 0,05$. Nota: não há resultados da dose de 50 Gy na geração F2 porque não houve descendentes.

5.3.2 Micronúcleos em células de Túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti*

Na Tabela 7 são apresentados os valores de frequência de micronúcleos para a geração parental (F0) e para as gerações filiais F1 e F2. Observou-se, para as gerações filiais, uma diminuição na frequência de micronúcleos, sendo registradas frequências de 0,003; 0,003; 0,004%, para as doses de 20, 30 e 40 Gy, respectivamente.

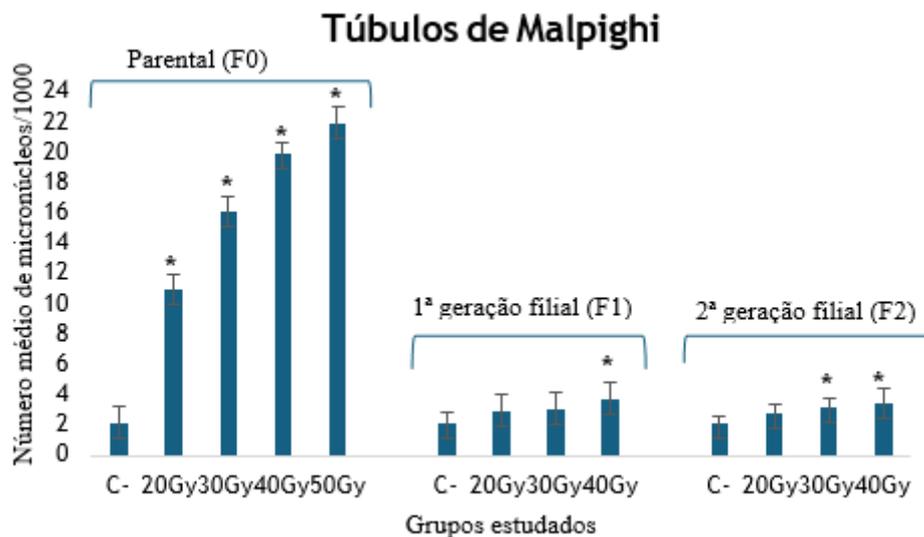
Tabela 7: Comparação da média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) da frequência de micronúcleo em túbulos de Malpighi de machos adultos de *A. aegypti*, nas gerações F0 a F2, tratadas com diferentes doses de radiação ionizante (20, 30, 40 e 50 Gy*) e o controle negativo (não-irradiado).

Dose recebida (Gy)	Micronúcleos		
	F0	F1*	F2*
(Controle)	0,002 \pm 0,120	0,002 \pm 0,074	0,002 \pm 0,042
20	0,011 \pm 0,094	0,003 \pm 0,120	0,003 \pm 0,063
30	0,016 \pm 0,092	0,003 \pm 0,110	0,003 \pm 0,063
40	0,020 \pm 0,074	0,004 \pm 0,116	0,004 \pm 0,097
50	0,022 \pm 0,105	-	-

Fonte: Os autores (2024). Legenda: F = geração; \bar{x} = média; s = desvio padrão. *Não há resultados da dose de 50 Gy para as gerações F1 e F2 porque não houve descendentes.

Na Figura 12 são apresentadas as frequências de micronúcleos em células mitóticas de túbulos de Malpighi de machos adultos de *A. aegypti* da geração parental F0 e das gerações filiais F1 e F2. Observa-se que a frequência de micronúcleos foi influenciada de forma dose-dependente pela radiação ionizante, na geração F0, sendo as diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle e entre as doses. Para a geração F1, a frequência de micronúcleos na dose de 40 Gy diferiu significativamente do controle (não-irradiado); e, na geração F2, houve diferença significativa entre as doses de 30 e 40 Gy e o controle.

Figura 12: Número médio de micronúcleos em células mitóticas de Túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti* de três gerações consecutivas (F0 a F2) expostos a diferentes dosagens de radiação.



Fonte: Os autores (2024). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de experimentos independentes. ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey; * $p < 0,05$ Nota: não há resultados dados de 50 Gy na geração F2 porque não houve descendentes

5.3.3 Micronúcleos em células de ovócitos de *Aedes aegypti*

Ao analisar células de ovócitos de fêmeas de *A. aegypti*, foi possível observar que as frequências de micronúcleos obtidas para as segunda e terceira gerações (F1 e F2) foram de 0,003%, para ambas as gerações. Na dose de 40 Gy, as gerações filiais apresentaram frequência de 0,004 %. Os controles negativos apresentaram frequência de 0,002%, como mostra a Tabela 8.

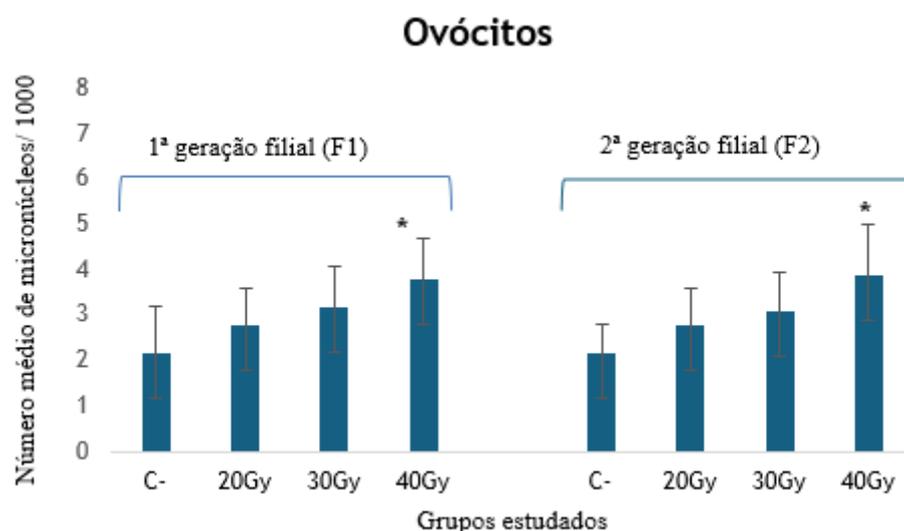
Tabela 8: Comparação da frequência de micronúcleo em ovócitos de fêmeas adultas de *A. aegypti*, nas gerações F1 e F2, tratadas com diferentes doses de radiação ionizante (20,30, 40) e o controle negativo (0 Gy).

Dose recebida (Gy)	Micronúcleos $\bar{x} \pm s$	
	F1	F2
0 (Controle)	0,002 ± 0,103	0,002 ± 0,063
20	0,003 ± 0,079	0,003 ± 0,079
30	0,003 ± 0,092	0,003 ± 0,088
40	0,004 ± 0,092	0,004 ± 0,110

Fonte: Os autores (2024). Legenda: F= geração; \bar{x} = média; s = desvio padrão.

Na Figura 13 é apresentado o comportamento das frequências de micronúcleos em células meióticas de ovócitos de fêmeas adultas de *A. aegypti*, descendentes de machos expostos às diferentes doses de radiação ionizante. É possível observar um aumento significativo de micronúcleos em fêmeas descendentes de machos irradiados na dose de 40 Gy, quando comparado ao controle negativo ($p < 0.05$).

Figura 13: Número médio de micronúcleos em células meióticas de ovócitos de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* de duas gerações filiais (F1 e F2) de organismos extraídos de indivíduos descendentes de machos expostos a diferentes doses de radiação ionizante (20,30 e 40Gy).



Fonte: Os autores (2024). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de experimentos independentes. ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey; * $p < 0,05$.

Estudos de mutagenicidade em insetos são escassos na literatura. Silva *et al.*, (2021C) avaliaram o efeito mutagênico do Temefós, em neuroblastos de larvas e

ovócitos de fêmeas adultas de *A. aegypti*, ao longo de quatro gerações (F1–F4), observando a formação de micronúcleos. Essa mesma substância foi avaliada por Cruz *et al.* (2023) por meio do ensaio cometa, tendo sido observado que todas as concentrações estudadas apresentaram efeito genotóxicos em *A. aegypti*.

O presente estudo também avaliou o efeito mutagênico da radiação ionizante (doses de 20, 30, 40 e 50 Gy), ao longo de três gerações (F0 à F2) em diferentes células de *A. aegypti* (Neuroblastos de larvas, Túbulos de Malpighi de machos adultos e ovócitos de fêmeas adultas). Na geração parental (F0) foi verificada a presença de micronúcleos em células de túbulos de Malpighi, onde sua frequência foi diretamente proporcional a dose.

Para as gerações F1 e F2, os micronúcleos foram raramente encontrados, apesar de células de neuroblastos terem apresentado aumento significativo de micronúcleos quando comparado ao controle negativo, nas doses de 30 e 40 Gy. Em células meióticas de ovócitos de fêmeas adultas foi observado um aumento significativo na frequência apenas na dose de 40 Gy. Estes resultados evidenciam que o efeito deletério em decorrência da exposição à radiação ionizante é permanente ao longo das gerações.

Em função da sensibilidade na identificação de danos, o ensaio de micronúcleos revela-se uma ferramenta relevante para traçar estratégias de biocontrole e monitoramento populacional de insetos, sobretudo aqueles cujo impacto é prejudicial ao ser humano. Ao analisar os danos genéticos induzidos por agentes genotóxicos, esse método proporciona uma abordagem técnica robusta para a avaliação do estado genômico e potenciais intervenções em populações de insetos-alvo (MISHRA e SRIVASTAVA, 2023). Neste estudo, evidenciamos resultados promissores ao combinar a Técnica do Inseto Estéril com o teste de Micronúcleo para avaliar o comportamento de gerações de *Aedes aegypti* após exposição à radiação gama.

Diante disso, este trabalho segue a recomendação de Bond *et al.* (2019), Ranathunge *et al.* (2022) e Silva *et al.* (2022), sugerindo a dose de 50 Gy a ser utilizada em futuras avaliações e programa de controle de *A. aegypti*, garantindo assim maior segurança, visto que nessa dose, a taxa de fertilidade observada é baixa, menor que 2%.

Por fim, este estudo também reafirma a importância e a eficácia do teste do

micronúcleo em ensaios citogenéticos para a avaliação da mutagenicidade, especialmente em *Aedes aegypti*, um invertebrado de interesse na área da saúde. Por se tratar de um inseto, a realização do teste do micronúcleo em *A. aegypti* é complexa e requer extrema atenção em todas as etapas, incluindo a correta extração de gânglios, ovários e túbulos de Malpighi, assim como a fixação e coloração adequadas, para garantir resultados confiáveis. Dado o número limitado de relatos sobre a aplicação da técnica do micronúcleo em insetos, esta pesquisa apresenta resultados promissores para a expansão das possibilidades de ensaios com *A. aegypti* e do bioensaio em questão, amplamente reconhecido na comunidade científica.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo é pioneiro no acompanhamento do efeito genotóxico e mutagênico nos indivíduos descendentes de *A. aegypti*, expostos a radiação gama. Os resultados obtidos, referentes aos parâmetros fecundidade e fertilidade, indicam que houve transferência dos danos recebidos pela geração parental para a primeira geração filial, o que foi confirmado pelos dados mutagênicos obtidos a partir do teste do micronúcleo.

Os valores de fertilidade para os grupos avaliados (Grupo A, composto por fêmeas e machos adultos descendentes de machos irradiados (FI x MI); Grupo B, composto por fêmeas descendentes de machos não irradiados e por machos descendentes de machos irradiados (FNI x MI); Grupo C, composto por fêmeas descendentes de machos irradiados e machos descendentes de machos não irradiados (FI x MNI), mostram que ocorreu uma diminuição dos valores indicativos deste parâmetro para as doses de 20 e 30 Gy. Porém, para a dose de 40 Gy, a fertilidade aumentou em todos os grupos avaliados. A ausência de dados para a dose de 50Gy se dá porque não houve descendentes.

Estes resultados sugerem que a dose de 50 Gy apresenta maior segurança para uso na Técnica do Inseto Estéril, visto que nessa dose, a taxa de fertilidade observada é menor que 2%.

REFERÊNCIAS

- ACIOLI, R. D. **O uso de armadilhas de oviposição (ovitrapas) como ferramenta para monitoramento populacional do *Aedes spp* em bairros do Recife. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.**
- ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.32,p.1243-1247, 2002.
- AMES, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, v.204, n. 4393, p. 587-593, 1979.
- ANDRADE, Vanessa Moraes; DE FREITAS, Thales RO; DA SILVA, Juliana. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 560, n. 1, p. 57-67, 2004.
- ARAÚJO, A. P. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. ***Parasites & Vectors***, London, v. 6, p. 297, 2013.
- AYUKEKBONG JA, OYERO OG, NNUKWU SE, MESUMBE HN, FOBISONG CN. Value of routine dengue diagnosis in endemic countries. ***World J Virol.*** v., n.1, p.9-16, 2017.
- AZQUETA A.; COLLINS A.R. The essential Comet Assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. ***Arch Toxicol.*** v.87, n.949-968, 2013.
- BAKRI, A.; MEHTA, K.; LANCE, D. Sterilizing insects with ionizing radiation. ***Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management***, p. 355-398, 2021.
- BALESTRINO, F. et al. Gamma ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. ***Journal of Medical Entomology, Annapolis***, v.47, p. 581–591, 2010.

BARBON, FJ; Wiethölter P; Burille, A.; Casarin, D; Solda, C; Flores, RA; Sabadin, CES. Micronúcleos em fumantes e etilistas. **Journal of Oral Investigations**, v.3, n.2, p.42-45, 2015.

BARRETO, M.L; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. Av.** v. 22, n.64, p. 53-72, 2008.

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

BELLINI, R.; CALVITTI, M.; CARRIERI, M.; MAINI, S. **Use of the sterile insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: First results of a pilot trial**. In: VREYSEN MJB, ROBINSON AS, HENDRICHS J. (eds) *Area-Wide Control of Insect Pests*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 2007; pp. 505–515.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.

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

BESERRA, E.B.; FERNANDES, C.R.M; RIBEIRO, P.S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotrop Entomol.** v.38, p. 47-852, 2009.

BHATT, S., GETHING, P., BRADY, O.; MESSINA, J.P; FARLOW A.W.; MOYES, C.L.; DRAKE, J.M.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, AG.; SANKOH, O. *et al.*, A distribuição global e o ônus da dengue. **Nature** v.496, p. 504–507, 2013.

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

BOND JG, OSÓRIO AR, ÁVILA N, GÓMEZ-SIMUTA Y, MARINA CF, FERNÁNDEZ-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.

BONIZZONI, M.; GASPERI, G.; CHEN, X.; JAMES, A.A. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. **Trends Parasitol.** n.29, p. 460-468, 2013.

BOSLY, H. Abo El-Kassem *et al.*, Oil fly ash as a promise larvicide against the *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 237, p. 106735, 2023.

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

BRASIL (2019). Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Volume 50, Nº 22. Brasília: DF.

BRASIL. (2002). Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Programa nacional de controle da dengue**. Brasília: DF.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2023. Anvisa aprova nova vacina contra a dengue. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>>.

Acesso em: 21, dez., 2023.

BRASIL. Boletim epidemiológico 01: **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022**. Volume 54, N.º 1, Jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Anvisa aprova nova vacina para a dengue: a vacina Qdenga, da empresa Takeda, está indicada para uso entre 4 e 60 anos de idade**. Brasília(DF), 2024.

BRELAND, O.P.; GASSNER, G. III. Notes on the chromosome complement of the mosquito, *Aedes aegypti* (L). **Texas J. Sci.** v.13, p.391-397, 1961.

BRENNAN LJ, HAUKEDAL JA, EARLE JC, KEDDIE B, HARRIS HL. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of Wolbachia-infected *Drosophila simulans*. **Insect Mol Biol.** v.21, p. 510-520, 2012.

BUENO, APM; VASCONCELOS, MG; FRANCISCO, CM; PAVANIN, LA. Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocais, MinasGerais. **Acta Brasiliensis** v.1, n.3, p. 32-36, 2017.

BUSHLAND. R. C. Screw-Worm Research and Eradication: New Developments. **SpecialCollections, USDA National Agricultural Library**, p. 1956-1959. 1958.

BUSHLAND, R. C. 1985. **Eradication program in the southwestern United States**, pp. 12–15. In O. H. Graham (ed.), Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America 62.

CÂMARA, F.P. et al. Clima e epidemias de dengue no estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 137 -140, 2009.

CAMMERER, Z.; ELHAJOUJI, A.; SUTER, W. In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. **Mutation Research**, v.626, p. 26-33, 2007.

CARTER, LA. The somatic mitosis of *Stegomyia fasciata*. **Quart. J. micr. Sci.** v.63, p.375-386, 1918.

CARVALHO, D.O. **Estudo de dispersão de machos da linhagem transgênica OX513A de *Aedes aegypti***. São Paulo, 2012, 93 p.

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

CATTERUCCIA, F.; CRISANTI, A.; WIMMER, E.A. Transgenic technologies to induce sterility. **Malaria J.** v. 8 (Suppl 2): S7, 2009.

CESTARI, MM. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n. 1, p.103-107, 2004.

CHEN, C. ALDRIDGE, R.L.; GIBSON, S.; KLINE, J.; ARYAPREMA, V.; QUALLS, W.; XUE, R.D.; BOARDMAN, L.; LINTHICUM, K.J; HAHN, D.A. Developing the radiation-based sterile insect technique (SIT) for controlling *Aedes aegypti*: identification of a sterilizing dose. **Pest Management Science**, v. 79, n. 3, p. 1175-1183, 2022.

CLAYSON, D.B.; IVERSON, F; NERA, E.A.; LOK, E. Early indicators of potential neoplasia produced in the rat forestomach by non-genotoxic agents: the importance of induced cellular proliferation. **Mutation Research**, v.248, n.2, p. 321-331, 1991.

CLEMENTS AN. **The biology of mosquitoes**. London: CABI, 1992; 752p.

COLLINS, A. KOPPEN, G. ; VALDIGLESIAS, V. ; DUSINSKA, M. ; KRUSZEWSKI, M. ; MØLLER, P. ; ROJAS, E. ; DHAWAN, A. ; BENZIE, I. ; COSKUN, E. ; MORETTI, M. ; SPEIT, G. ; BONASSI, S.; COMNET PROJECT. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research**, v. 759, p. 27-39, 2014.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.K.; SMITH, C.C.; ŠTĚTINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

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

COON, K.L.; VOGEL, K.J.; BROWN, M.R.; STRAND, M.R. Os mosquitos dependem de sua microbiota intestinal para o desenvolvimento. **Mol Ecol**. v.23, p.2727 – 2739, 2014.

COSTA JÚNIOR, CEO; SILVA, L.M.B; FERNANDES, T.S; MORAES, A.S; AMARAL, A; BORGES, E. Evaluation of Pb-210 in urine and frequency of micronuclei in exfoliated cells as indicators of exposure to cigarettes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 825, p. 59-64, 2018.

DA COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, v.3, p.24-26, 2000.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L., BRACCO, J. E. Genetic lineages in the

yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 539–544, 2005.

DAME, D.A.; WOODARD, D.B.; FORD, HR.; WEIDHAAS, D.E. Field behavior of sexuallysterile *Anopheles quadrimaculatus* males. **Mosq News**, v.24, p.6-14, 1964.

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

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.

DILLON, R.J.; DILLON, VM. As bactérias intestinais dos insetos: interações não patogênicas. **Annu Rev Entomol.** v.49, p. 71 – 92, 2004.

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

DOBZYNSKI, M.M.; KRZYSZTOF, A.P; GAJOWIK, A.; RADZIKOWSKA, J.; SACKIEWICZ, A. The effect occupational exposure to ionizing radiation on the DNA damage in peripheral blood leukocytes of nuclear medicine personnel. **J Occup Health.**v.56, p. 379-386, 2014.

DOUGLAS, A.E. Lições do estudo de simbioses de insetos. **Micróbio hospedeiro celular.** v.10, n.4, p. 359 – 367, 2011.

DOWN, S.B.; TILSON, E.R. **Practical radiation protection and applied radiobiology.** 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. 352p.

DUARTE, J.L; FILIPPO, L.D.D.; ARAUJO, V.H.S.; OLIVEIRA, A.E.M.F.M; DE ARAÚJO, J.T.C.; SILVA, F.B.D.R.; PINTO, M.C; CHORILLI, M. Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. **Acta Tropica**, v. 216, p. 105848, 2021.

DUFFY, M. R.; CHEN, T.H; HANCOCK, W.T; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI R.S; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; *et al.*, .Zika virus

outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536– 2543, 2009.

DYCK, V.A ; HENDRICHS, J. ; ROBINSON, A.S. 2005. **Sterile Insect Technique Principles and Practice in AreaWide Integrated Pest Management**. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Springer; 2005. 787 pp.

ERDTMANN, B.A. **Genotoxicidade nossa de todos os dias**. In.: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. 2003. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Ed. Alcance, 422p.

ERNAWAN, B.; TAMBUNAN, U.S.F; SUGORO, I.; SASMITA, H. Effects of gamma irradiation dose-rate on sterile male *Aedes aegypti*. **Proceedings of the International Biology Conference 2016**; 1854, 2017.

ERNAWAN, B.; SASMITA, H.I; SADAR, M.; SUGORO, I. Current status and recent achievements of the sterile insect technique program against dengue vector, *Aedes aegypti*, in Indonesia. **Atom Indonesia**,v. 45, n. 2, p. 115-121, 2019.

FARAONE, J.; FISCHER, S.; APONTE, C.A.; ETCHEPARE, E.; STECHINA, O.S.; STEIN, M. Hatching pattern and coexistence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Culicidae) in a subtropical city, Argentina, after three decades of coexistence. **Acta Tropica**, v. 218, p. 105885, 2021.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLES, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H; EASTMOND, D.A; TUCKER, J.D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125132, 2011

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p.81-95, 2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. **Health physics**, v. 98, n. 2, p. 234-243, 2010.

FLORÊNCIO, S.G.L. (2017). **Potencial de uso de machos esterilizados por radiação gama (60CO) para o controle populacional de Aedes aegypti (Diptera - Culicidae): um caminho biotecnológico do laboratório para o campo**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. (Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares), 2017

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

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

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed., rev. Brasília, DF: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

GATEHOUSE, D. et al. Bacterial mutation assays. **Basic Mutagenicity Tests: UKEMSPart**, v. 1, p. 13-61, 1990.

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

GLORIA-SORIA, A.; BROWN, J. E.; KRAMER, V.; YOSHIMIZU, H. M.; POWELL, J. R. Origin of the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*, in California. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, e3029, 2014.

GLORIA-SORIA, A. FARAJI, A.; HAMIK, J.; WHITE, G.; AMSBERRY, S.; DONAHUE, M.; BUSS, B.; PLESS, E.; COSME, L.V.; POWELL, J.R. Origins of high latitude introductions of *Aedes aegypti* to Nebraska and Utah during 2019. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 103, p.105333, 2022.

GODSCHALK, R.W.; ERSSON, C.; RISO, P.; PORRINI, M.; LANGIE, S.A.; VAN

SCHOOTEN, F.J.; AZQUETA, A.; *et al.*, DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 757, n. 1, p. 60-67, 2013. ISSN 1383-5718.

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *Mutagenese ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M. Ovicidal and adulticidal potential of leaf and seed extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Family: Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.114, n.5, p.1949-1961, 2015.

GUANGGANG X, DIQIU L, JIANZHONG Y, JINGMIN G, HUIFENG Z, MINGANS, et al. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food Chem Toxicol**. v.53, p.352-358, 2013.

GUBLER, Duane J.; HALSTEAD, Scott B. Is Dengvaxia a useful vaccine for dengue endemic areas?. **Bmj**, v. 367, 2019.

GUERRA, M. (1998). **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

GUY, B.; LANG, J.; SAVILLE, M.; JACKSON, N. Vaccination against dengue: challenges and current developments. **Annual review of medicine**, v. 67, p. 387-404, 2016.

HALL, E. J. Radiobiology for the Radiologist Lippincot Williams e Wilkins. cap. 3, Cell survive curves, p. 33-50, 2000.

HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nat. Rev. Genet.**, v.2, p. 280-291, 2001.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2,

p. 125-133, 1998.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

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

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

HENDRICHS J.; ROBINSON, A. S. Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management. **The Netherlands: Springer**, 2005. p. 233268.

HEREIRA-ROJAS, W.J. **Efeito genotóxico do extrato de *Piper aduncum* L. (dilapiol) em biomarcadores nucleares, micronúcleos e cromossomos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**, Manaus, AM. 2007. Dissertação (Mestrado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 62p.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical report series. Vienna, n. 405, 2001.

HUANG, C.; TSAI, Y.T.; WANG, S.F.; WANG, W.H.; CHEN, Y.H. Dengue vaccine: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 19, n. 12, p. 1495-1502, 2021.

IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **The Japanese Journal of Genetics**, v.63, n. 2, p. 159-185, 1988.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. ***Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*: uma ameaça aos trópicos**. Produção Áudio Visual e tratamento de imagem do IOC, FIOCRUZ.

Produzido por Genilton José Vieira e Autoração de Leonardo Perím. Rio de Janeiro, 2009. 1 DVD (21 min).

INSTITUTO OSWALDO CRUZ, Dengue: vírus e vetor. Instituto Oswaldo Cruz. 2021. Disponível em: <<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/galeria.html>>. Acesso em 10. mar.2024.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680-693, 2008.

KAŠUBA, V.; ROZGAJ, R.; MILIĆ, M.; ZELJEŽIĆ, D.; KOPJAR, N.; PIZENT, A.; KLJAKOVIĆ-GAŠPIĆ, Z.; JAZBEC, A. Evaluation of genotoxic effects of lead in pottery-glaze workers using micronucleus assay, alkaline comet assay and DNA diffusion assay. **International archives of occupational and environmental health**, v. 85, n. 7, p. 807818, 2012.

KIMBERLIN, D.W; BARNETT, E.; LYNFIELD R. Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics, 2021.

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

KNIPLING E.F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **J Econ Entomol**. v.48, p.459–462, 1955.

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

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 155-166, 2000.

KRISHNA, G.; KROPKO, M.L.; CIARAVINO, V.; THEISS, J.C. Simultaneous

micronucleus and chromosome aberration assessment in the rat. **Mutation Research**, v.264, p.29-35, 1991.

KUMAR, M.K.P.; SHYAMA, S.K; SONAYE, B.S.; NAIK, U.R.; KADAMA, S.B.; BIPIN, P.D.; COSTA, A.D.; CHAUBEY, R.C. Evaluation of γ -radiation-induced DNA damage in two species of bivalves and their relative sensitivity using comet assay. **Aquat Toxicol.**v.150, n. 1-8, 2014.

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

LIM, S.; LEE, Y.S.; NAMKUNG, S.; LIM, J.K.; YOON, I.K. Prospects for dengue vaccines for travelers. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 5, n. 2, p. 89, 2016.

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

LIMA-CAMARA, T.N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Rev. Saúde Pública**. v.50,n.36, p.1-7, 2016.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**. v.5, n.3, p.55-64, 2014.

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

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

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M.

Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANIII, .S.; MALAGUTTIIII, M.I.A.; ANA LÚCIA DIASII; FONSECAIV, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p. 148-158, 2006.

MATTHEWS, B.J; DUDCHENKO, O.; KINGAN, SB *et al.* O genoma de referência aprimorado do *Aedes aegypti* informa o controle vetorial do arbovírus. **Nature** v.563, p.501– 507, 2018.

McGRAW EA, O'NEILL SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem **Nat.Rev Microbiol.** v.11, p.181-193, 2013.

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

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

MISHRA, M.; SHARMA, A.; SHUKLA ,A.K.; KUMAR, R.; DWIVEDI, U.N.; CHOWDHURI D.K. Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* defective in DNA repair. **Mutat Res.** v.766, p.35-41, 2014.

MUSSALI-GALANTI, P.; TOVAR-SANCHEZ, E. ; VALVERDE M. ; ROJAS, E. Genetic Structure and Diversity of Animal Populations Exposed to Metal Pollution. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** v. 227, p.79106, 2014.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1, p.3-16, 2002. ISSN 0027-5107.

NEWTON, M.E.; SOUTHERN, D.I.; WOOD, R.J. Cromossomos X e Y de *Aedes aegypti* (L.) distinguidos por bandas C de Giemsa. **Chromosoma**. v.49, p. 41–49, 1974.

NIKJOO, H.; UEHARA, S.; WILSON, WE.; HOSHI, GOODHEAD, D.T. Track structure in radiation biology: theory and applications. **International Journal of Radiation Biology**.v.73, n.4, p. 355-364, 1998.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.504, n. 1, p. 17- 36, 2002.

OBIAKOR,M.; NNABUDE, P.; EZEONYEJIAKU, C.D. Eco-ecotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution. **J Anim Sci Adv**, v. 2, n. 1, p. 123-133, 2012.

OCDE. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2014. Disponível em: < <http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1455135783&eid=id&accname=guestchecksum=FAA3E240036470DE7F48522BC3B7FFFA> >. Acesso em: 10. mar.2024.

OLIVA, C.F. ; JACQUET, M. ; GILLES J. ; LEMPERIERE, G.; MAQUART, P.O.; QUILICI S, *et al.* The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating vigour of sterilized males. **Plos One**.v.7, e499414, 2012

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

OMS- Organização Mundial da Saúde. Foco epidêmico. Esperando nas asas: epidemias de mosquitos *Aedes* e flavivírus. **Wkly Epidemiol Rec**. n.91, p.249 – 250, 2018.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. Micro electrophoretic study of radiation-induced DNA

damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PALAZZO, R. P.; MALUF, S.W. 2009. **Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular**. In.: MALUF, S.W.; RIEGEL, M. Citogenética Humana. Artmed Editora.

PIALOUX, G.; GAÜZÈRE, B.A.; JAURÉGUIBERRY, S.; STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **Lancet Infectious Diseases** v.7,n,5, p.319-327, 2007.

PIETRASA, K.; ÖSTMANB, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research** , 1324 – 1331, 2010.

RAFAEL, M.S.; HEREIRA-ROJAS, W.J.; ROPER, J.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n. 3, p. 772-778, 2008.

RAFAEL, M.S.; TADEI, W.P. Metaphase karyotypes of *Anopheles* (Nyssorhynchus) *darlingi* Root and *A. (N.) nuneztovari* Gabaldón (Diptera; Culicidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n. 3, p. 351-354, 1998.

RAI, K.S. A comparative study of mosquito karyotypes. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v.56, p.160-170, 1963.

RAI, K.S.; CRAIG, G.B. A study of the karyotypes of some mosquitoes. **Genetics** v.46, p. 891, 1961. (Abstract).

RAI, KS. Cytogenetics of *Aedes aegypti*. **Bull. Org. mond. Sante** v.36, p. 563-565, 1967.

RAI, KS. Um estudo comparativo de cariótipos de mosquitos. **Ann Entomol Soc Amer** v.56, p.160–170, 1963.

RANATHUNGE, T.; HARISHCHANDRA, J.; MAIGA, H.; BOUYER, J.; GUNAWARDENA YINS, HAPUGODA, M. Development of the Sterile Insect Technique to control the dengue vector *Aedes aegypti* (Linnaeus) in Sri Lanka. **PLoS One**. 4;17(4): e0265244,2022.

REEVES WC. Attempted suppression of a semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recently colonized strain. **Mosq News**, v. 42, p.565-575, 1982.

REISEN WK, MILBY MM, ASMAN SM, BOCK ME, MEYER RP, MCDONALD PT, RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, Canoas, p. 173-178, 2003.

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

ROBSON, S; RANZANI-PAIVA, MJT; SILVA-SOUZA, AT; NAPOLEÃO, SR. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v..33, n.1, p.107(6), 2011.

ROCHA, SM; ROCH, CAM. Micronucleus test in bivalve mollusks as an important tool for xenobiotic exposure risk assessment. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.4,n.1, 70- 79, 2016.

SAFI, N.H.Z.; AHMADI, A.A.; NAHZAT, S.; WARUSAVITHANA, S.; SAFI, N.; VALADAN, R.; SHEMSHADIAN, A.; SHARIFI, M.; ENAYATI, A.; HEMINGWAY, J. Status of insecticide resistance and its biochemical and molecular mechanisms in *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) from Afghanistan. **Malar. J.**, 18,p. 249, 2019.

SALAS, I.; OSORIO, A.R, AVILA N, GÓMEZ-SIMUTA, Y.; MARINA, C.F, FERNÁNDEZ-SALAS I, LIEDO P.; DOR, A.; CARVALHO, D.O.; BOURTZIS, K.; WILLIAMS, T. Optimization of irradiation dose to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in a sterile insect technique program **PLoS ONE**, v.14, n.2, e0212520, 2019.

SALVADORI, D.M.F, RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. 2003. **Teste do micronúcleo em células humanas in vitro**. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES E.K. (eds). **Mutagênese Ambiental**. Ulbra, Canoas, pp 201-219.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, LA.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review Biochemistry**, v.73, p. 39-85, 2004.

SANOFI. Dengvaxia®: **Um guia de referência rápido para auxiliar Profissionais de Saúde.**(2019).

SANTANA, S.L.; VERÇOSA, C.J.; CASTRO Í.F.A.; DE AMORIM É.M.; DA SILVA, A.S.; BASTOS TMR.; DA SILVA NETO, L.J.; DOS SANTOS T.O.; DE FRANÇA, E.J.; ROHDE, C. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 32409-32417, 2018.

SANTOVITO, A.; AUDISIO, M.; BONELLI, S. A Micronucleus assay detects genotoxic effects of herbicide exposure in a protected butterfly species. **Ecotoxicology**. 29, p. 1390-1398, 2020.

SCHMID, W. 1976. **The micronucleus test for cytogenetics analysis**. In: Principles and Methods for Their Detection (ed. Hollaender, A.). Plenum Press, New York, Vol.4, p.31-53

SCHMIDT, W., The micronucleus test, **Mutation Research**. v. 3, p. 9–15, 1975.

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

SEVERIN, I.; DUMONT, C.; JONDEAU-CABATON, A.; GRAILLOT, V; CHAGNON, M.C. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. **Toxicology letters**, v. 192, n. 2, p. 189-194, 2010.

SHETTY, V.; SHETTY N.J, HARINI B.P; ANANTHANARAYANA, S.R.; JHA, S.K.; CHAUBEY RC. Effect of gamma radiation on life history traits of *Aedes aegypti* (L.). **Parasite Epidemiology and Control**. v1, n.2, p.26-35, 2016

SHETTY, V.; SHETTY, NS; ANANTHANARAYANA, SR; JHA, SK; CHAMBEY, RC. Evaluation of gamma radiation induced DNA damage in *Aedes aegypti* using the comet assay. **Toxicology and Industrial Health**. v.33, p. 930-937, 2017.

SILVA HHG, SILVA IG. Influência do período de quiescência sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev Soc Bras Med Trop**. v,4, p.349-355, 1999.

SILVA, JS. **Avaliação do semissintético éter metil dilapiol (EMD) em *Aedes aegypti*, da Amazônia: uma abordagem genotóxica em nível cromossômico**, 2018. Dissertação (Mestrado), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, 2018.

SILVA, J. S. **(B)**; PINTO, A. C. S. ; SANTOS, L. H. F. ; SILVA ; CRUZ, D. L. V. ; RAFAEL, Míriam Silva. Genotoxic and mutagenic effects of methyl ether dillapiole on the development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 00, p. 1-11, 2021.

SILVA, L. R. S. **Detecção de micronúcleo em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos a radiação gama de ^{60}Co** . Dissertação. PROTEN- Programa de tecnologias. Energéticas nucleares, 2010.

SILVA, E.B.; MENDONÇA CM, MENDONÇA JA, DIAS ESF, FLORÊNCIO SGL, GUEDES DRD, PAIVA MHS, AMARAL A, NETTO AM, MELO-SANTOS MAV. Effects of gamma radiation on the reproductive viability of *Aedes aegypti* and its descendants (Diptera: Culicidae). **ACTA TROPICA**, v. 228, p. 106284, 2021

SINGH, N. P. MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191., 1988.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Mutação, Reparo do DNA e Recombinação**. In: Fundamentos de Genética. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314, 2001.

SOTIL, G; ALVIS, R; FRANCIA, JC; SHIGA, B. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. **Revista Peruana de Biología**, v.13, p.3, p.249-254, 2007.

SURENDRAN NS, JUDE JP, THABOTHINY V, RAVEENDRAN S, RAMASAMY R. Pre-imaginal development of *Aedes aegypti* in brackish and fresh water urban domestic wells in Sri Lanka. **J Vector Ecol**. n.37, p. 471-473, 2012.

SUTTON, E. Salivary gland type chromosomes in mosquitoes. **Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)**, v.28, p.268272, 1942.

TEIXEIRA, M. G. ANDRADE AM, COSTA MDA C, CASTRO JN, OLIVEIRA FL, GOES CS, MAIA M, SANTANA EB, NUNES BT, VASCONCELOS PF. East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906-917 2015.

TONELINI, MP; BOSCHINI FILHO, J. RODRIGUEIRO, DA; NOVO, NF. Frequency of micronuclei and other nuclear abnormalities in diabetic patients. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.16, n.2, p.80-85,2014.

UMBUZEIRO, GA, ROUBICEK, DA. **Genotoxicidade Ambiental**. In: ZAGATTO PA, BERTOLETTI. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos: *RiMa*. 2006; 14:327-346.

UNSCEAR (United Nations Scientific Committee) 2000. **Effects of Atomic Radiation Exposures from natural radiation sources**, 1-74, 2000.

VAISNAV M, XING C, KU HC, HWANG D, STOJADINOVIC S, PERTSEMLIDIS A, et al. Genome-wide Association Analysis of Radiation Resistance in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One** v.9, n.8, e104858, 2014.

VASILAKIS, N.; TESH, R. B. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 69–74, 2015.

VERÇOSA CJ, MORAES FILHO AV, CASTRO ÍFA, SANTOS RG, CUNHA KS, SILVA DM, GARCIA ACL, NAVONI JA, AMARAL VS, ROHDE, C. Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotox Environ Saf**. v.141, p.148-153, 2017.

VERÇOSA CJ. **Efeito genotóxico resultante da esterilização de machos de *Aedes aegypti* pela técnica do inseto estéril, e avaliação do potencial tóxico-genético dlarvicida pyriproxyfen em dípteros**, 2019. Tese (Doutorado), Universidade de Pernambuco, Biologia Celular e Molecular Aplicada, 2019.

VICARI T, FERRARO MVM, RAMSDORF WA, MELA M, RIBEIRO CAO, CESTARIMMA. Ecotoxicology and environmental safety genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH₃Hg^b) in *Hoplias malabaricus*. **Ecotox Environ**

Saf. v.82, p.47-55, 2012.

VILLELA I.V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P.; DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants; **Mutation Research** v. 605, p. 78– 86,2006.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. 2006.**Mutabilidade e Reparo de DNA.** In: Biologia Molecular do Gene. 5 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed.

WEAVER, S. C.. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS neglected tropical diseases**, v.8, n.6, e2921, 2014.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789– 801,2004.

ZANLUCA, C.; MELO VC, MOSIMANN AL, SANTOS GI, SANTOS CN, LUZ K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZANONI, F.D.; ANDRADE, S.F.; BASTOS, J.K.; MAISTRO, E.L. Clastogenicity of the *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) bark wood extract in Wistar rat bonemarrow cells.**Cytologia**, v.70, p. 303-308, 2005

ZHENG, X.; ZHANG, D.; LI, Y.; YANG, C.; WU Y.; LIANG X.; *et al.*, Incompatible and sterile insect techniques combined eliminatemosquitoes. **Nature**, v. 572, n. 7767, p. 56-61, 2019.