

## ESTUDO DA OVIPOSIÇÃO DIÁRIA DE UMA POPULAÇÃO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti* COM A INTRODUÇÃO DE MACHOS ESTERILIZADOS POR RADIÇÃO

Guilherme Rodrigues<sup>1</sup>, Ariane C. Cristino<sup>1</sup>, Daniela R. Cantane<sup>1</sup>, Helenice O. Florentino<sup>1</sup>, Marco Antônio Rodrigues Fernandes<sup>2</sup>, Paulo E. M. Ribolla<sup>1</sup>, Rogério A. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia.

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Dermatologia e Radioterapia.

[g.rodriques2@unesp.br](mailto:g.rodriques2@unesp.br)

### RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor responsável por várias doenças, tais como a febre amarela, o zika vírus, a febre *chikungunya* e a dengue. Devido a sua capacidade de adaptação aos mais diversos ambientes, incide em áreas urbanas onde encontra as condições favoráveis para reprodução: água parada e alimentação sanguínea para oviposição. Dentre os métodos de controle utilizados pelos órgãos de vigilância epidemiológica, destacam-se o controle mecânico (eliminação dos depósitos de água), controle químico (inseticidas e larvicidas) e controle biológico (transgenia e esterilização de machos via radiação). A esterilização por radiação ionizante pode ser uma grande aliada no combate do vetor porque interfere diretamente em seu ciclo biológico, diminuindo a taxa de nascimentos. O presente trabalho visa analisar a taxa de oviposição de uma população de mosquitos *Aedes aegypti* com a inserção de machos irradiados com doses iguais a 30 e 40 Gy. Para a análise dos dados coletados diariamente, foram utilizados modelos lineares generalizados para dados de contagem, buscando avaliar a interferência deste método de esterilização no ciclo biológico do mosquito.

**Palavras-chave:** Dengue. Modelos Lineares Generalizados. Análise de dados.

### 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o mosquito *Aedes aegypti* tem se tornado um grave problema de saúde pública devido à grande dificuldade de controlar o crescimento de sua população em áreas urbanas, onde encontra condições favoráveis para sua proliferação. O aumento de casos das doenças tropicais: dengue, *Chikungunya* e zika, por exemplo, está fortemente relacionado ao crescimento acelerado da população destes vetores nas cidades. O ciclo de transmissão da doença ocorre por meio do mosquito fêmea, a qual demanda de sangue humano para maturação de seus ovos. Logo, ao ferroar uma pessoa doente, pode se contaminar transmitindo a doença a outras pessoas saudáveis (ZARA *et al.*, 2016).

O Brasil, por ser um país de clima tropical, propicia as condições ideais para o crescimento das populações de mosquitos *Aedes aegypti*. Além disso a falta de

infraestrutura e saneamento básico em grande parte das cidades do país possibilita a formação de depósitos com água parada que são utilizados para a postura dos ovos. As fêmeas apresentam facilidade em encontrar alimento, principalmente em locais com grandes densidades populacionais, onde encontram sangue humano em abundância (BRAGA; VALLE,2007).

A dengue é a doença tropical de maior incidência na população brasileira. Estima-se que em 2020, até o mês de agosto foram notificados 918.773 casos prováveis de dengue no país, com incidência de 437,2 casos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Existem quatro sorotipos para o vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Segundo o Ministério da Saúde, as pessoas podem ser infectadas pelos quatro sorotipos e a infecção por um sorotipo gera imunidade permanente para o mesmo. Indivíduos podem apresentar o quadro mais grave da doença, denominada dengue hemorrágica, que pode levar a óbito se não tiver tratamento médico adequado.

Segundo Neves (2005), os métodos de controle das populações do mosquito mais utilizados atualmente pelos órgãos de vigilância epidemiológica são: controle mecânico, controle químico e controle biológico. O controle mecânico é realizado por meio da eliminação de criadouros contendo água parada, interrompendo o seu ciclo biológico. O controle químico consiste na utilização de inseticidas e larvicidas químicos nos criadouros onde dificilmente se elimina totalmente a água parada. O controle biológico pode ser realizado por meio da introdução de peixes em reservatórios ou lagos artificiais, por meio de mosquitos geneticamente modificados que transferem um gene que interrompe a reprodução a cada geração. Outra técnica utilizada como método de controle biológico é a denominada *Sterile Insect Technique (SIT)* que consiste na utilização de radiação ionizante para gerar infertilidade nos mosquitos machos. A liberação destes mosquitos machos inférteis na natureza causa alterações no ciclo reprodutivo da espécie (YANG & THOMÉ, 2007).

O objetivo do presente trabalho consiste em analisar a taxa de oviposição de uma população de mosquitos *Aedes aegypti* com a inserção de mosquitos machos esterilizados por radiação ionizante em diferentes proporções, utilizando modelos lineares generalizados (MLGs) para dados de contagem.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Após proporcionar crescimento de uma população de mosquitos em condições ótimas no insetário do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu, IBB- Unesp, as pupas dos mosquitos machos foram separadas para o procedimento de radiação, baseada na técnica empregada no Centro de Energia Nuclear e Agricultura (CENA), utilizando fonte de cobalto-60 presente na UNESP de Botucatu, da marca GE/CGR/MEV e modelo *Alcyon II*. Aproximadamente 70 pupas foram colocadas em dois recipientes plásticos com 250 ml de água para receber as doses de 30 e 40 Gy, segundo planejamento prévio de tempo de exposição à fonte de radiação (CRISTINO, 2015).

Após este processo, as pupas foram colocadas em gaiolas apropriadas e devidamente numeradas de acordo com as proporções descritas a seguir:

- **Gaiola 1:** Para cada mosquito fêmea (F) foi inserido um macho estéril (E);
- **Gaiola 2:** Para cada mosquito fêmea foi inserido um macho natural (N) e um macho estéril (E);
- **Gaiola 3:** Para cada dez fêmeas (F) foi inserido dez machos naturais (N) e um macho estéril;
- **Gaiola 4:** Para cada dez fêmeas (F) foi inserido dez machos estéreis (E) e um macho natural (N);
- **Gaiola 5:** Para cada mosquito fêmea (F) foi inserido um macho estéril (E);
- **Gaiola 6:** Para cada mosquito fêmea foi inserido um macho natural (N) e um macho estéril (E);
- **Gaiola 7:** Para cada dez fêmeas (F) foi inserido dez machos naturais (N) e um macho estéril;
- **Gaiola 8:** Para cada dez fêmeas (F) foi inserido dez machos estéreis (E) e um macho natural (N).

Para as Gaiolas de 1 a 4 foram utilizados mosquitos machos irradiados com dose de 30 Gy e para as Gaiolas de 5 a 8 os mosquitos machos foram irradiados com dose de 40 Gy. As Gaiolas 1 e 5 foram utilizadas como grupo controle para observar a eficácia da esterilização dos mosquitos machos.

Na fase alada, os mosquitos adultos foram alimentados com uma solução de água e sacarose com concentração de 10%. Para proporcionar a oviposição das fêmeas, estas foram alimentadas com sangue de camundongos devidamente anestesiados. Para alimentação sanguínea foram utilizados 25 camundongos durante todo o experimento, procedimento submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IBB-Unesp) com certificação correspondente ao protocolo de número 624-CEUA.

A oviposição das fêmeas nas gaiolas foi coletada diariamente para posterior contagem dos ovos. Devido ao tipo de dados coletados, a aplicação de modelos lineares generalizados para dados de contagem foi utilizada estudar a relação entre a quantidade de ovos nas diferentes proporções de machos radiados, considerando as doses e também os dias após a alimentação sanguínea. Os modelos lineares generalizados (MLG) tem uma grande flexibilidade para dados biológicos, pois a distribuição da variável resposta pode assumir outras distribuições da família exponencial além da distribuição Normal, e o vetor de variáveis explicativas pode ser qualquer função diferenciável. Portanto, para o presente trabalho foram considerados o Modelo de Regressão de Poisson e o Modelo de Distribuição Binomial Negativa, ambas modelagens indicadas quando a variável resposta é uma variável relacionada à contagem (ALVARENGA, 2015).

O Modelo de Regressão de Poisson é uma importante ferramenta de análise de dados, a qual assume que os dados seguem uma distribuição de Poisson, onde a média da variável resposta deve ser igual a variância. O objetivo deste modelo é avaliar a relação entre a variável independente  $Y$  e um vetor de variáveis independentes  $x_i$ , com  $i = 1, 2, 3, \dots, n$ . A regressão de Poisson é da forma:

$$f(y_i|\mu_i) = \frac{\mu_i^{y_i} e^{-\mu_i}}{y_i!}, y_i = 0, 1, 2, 3 \dots \quad (1)$$

em que as covariáveis são incorporadas no modelo de regressão por meio do vetor de médias esperadas  $\mu_i$  e a função de ligação logarítmica, ou seja,  $\ln(\mu_i) = x_i' \beta$  e  $\beta$  é o vetor de parâmetros do modelo de regressão.

Este modelo também deve garantir que o valor médio condicional seja igual a variância condicional, ou seja, ele assume uma variação constante em relação a média, como mostrado na equação abaixo:

$$E(y|x) = var(y|x) = \mu = e^{x_i' \beta} \quad (2)$$

Quando esta relação não ocorre, o modelo de Poisson não pode ser utilizado e recomenda-se o ajuste do modelo para a distribuição Binomial Negativa, pois este possui maior flexibilidade para incorporar a alta variabilidade observada na variável resposta. A Distribuição Binomial Negativa considera um parâmetro adicional de dispersão  $\alpha$  no cálculo da variância condicional. Como este parâmetro é caracterizado como não negativo, a variância pode ser maior do que a média. Uma das possíveis causas do fenômeno de sobredispersão é a heterogeneidade das unidades amostrais que pode ocorrer devido as variabilidades experimentais. A Distribuição Binomial Negativa é dada por:

$$f(y_i|\mu_i) = \frac{\Gamma(\alpha+y_i)}{\Gamma(y_i+1)\Gamma(\alpha)} \left(\frac{\alpha}{\mu_i+\alpha}\right)^\alpha \left(\frac{\mu_i}{\mu_i+\alpha}\right)^{y_i}, y_i = 0,1,2,3.. \quad (3)$$

em que  $\Gamma$  é a função Gama.

O valor médio e a variância são dados respectivamente por:

$$E(Y_i) = \mu_i \quad (4)$$

$$Var(Y_i) = \mu_i + \alpha(\mu_i)^2 \quad (5)$$

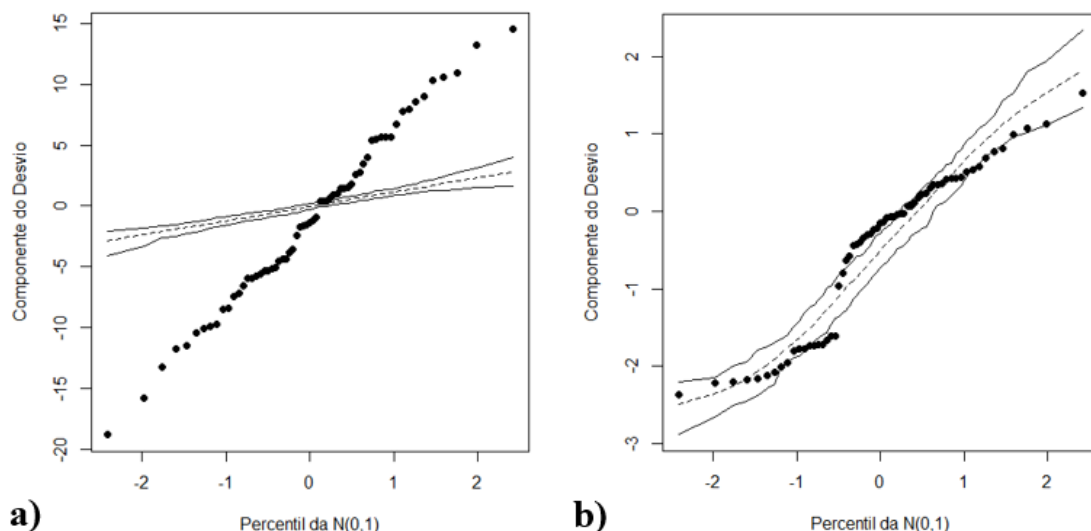
E as covariáveis são inseridas no modelo da mesma forma que na regressão de Poisson, ou seja,  $\ln(\mu_i) = \mathbf{x}'_i\boldsymbol{\beta}$  e  $\boldsymbol{\beta}$  é o vetor de parâmetros do modelo de regressão.

Vários modelos de Poisson e Binomial Negativa foram ajustados para os dados de contagem, porém a escolha do melhor modelo foi feita com a utilização de gráficos de Resíduos de Quantis Envelope, os quais permitem avaliar o comportamento dos resíduos gerados pelos modelos ajustados aos dados. Se todos os resíduos se encontrarem dentro do “envelope” gerado sem apresentar nenhuma tendência sistemática, isto indica que o modelo proposto pode ser o mais adequado (PAULA, 2013). As análises estatísticas foram realizados no software estatístico R e o nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% (valor  $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Alguns modelos de regressão foram ajustados para as distribuições de Poisson e Binomial Negativa. A Figura 1 apresenta apenas dois gráficos de envelope para os modelos ajustados dentre todos os considerados, justificando a escolha pelo modelo da Binomial Negativa, que apresentou melhor ajuste aos dados de oviposição diária.

**Figura 1.** Gráfico de resíduos de quantis envelope para o **a)** Modelo de Regressão de Poisson e **b)** Modelo de Distribuição Binomial Negativa



Observa-se na Figura (1.a) que os dados não são ajustáveis ao modelo de Regressão de Poisson visto que a os resíduos se encontram completamente fora do envelope. A Figura (1.b), por outro lado, deixa evidente a tendência dos dados em se ajustar ao modelo de Distribuição Binomial Negativa onde os resíduos permanecem em sua maior parte dentro do envelope. Os gráficos foram gerados utilizando o *software* estatístico R, que pôde ser acessado gratuitamente para realização das modelagens apresentadas neste trabalho. Após a confirmação de que o melhor ajuste é observado para o modelo da distribuição Binomial Negativa, a Tabela 1 mostra as estimativas dos parâmetros deste modelo.

**Tabela 1.** Estimativas do Modelo de Regressão Binomial Negativa para a contagem da oviposição diária por fêmeas

<i>Parâmetro</i>	<i>Estimativa</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>Exp(<math>\beta</math>)</i>	<i>Valor p</i>
<i>Intercepto</i>	0,1735	0,5602	1,1894	0,757
<i>Dose 30 Gy versus 40 Gy</i>	0,1679	0,3933	1,1828	0,670
<i>1F:1N:1E versus 1F:1E</i>	0,4390	0,5526	1,5512	0,427
<i>10F:10N:1E versus 1F:1E</i>	0,0173	0,5514	1,0175	0,975
<i>10F:1N:10E versus 1F:1E</i>	0,3901	0,5621	1,4771	0,488
<i>Dia 1 versus Dia 0</i>	1,8564	0,5642	6,4011	0,001
<i>Dia 2 versus Dia 0</i>	2,3328	0,5639	10,3074	<0,001
<i>Dia 3 versus Dia 0</i>	2,3109	0,5639	10,0839	<0,001

A modelagem utilizou a dose de 30 Gy, a proporção de 1 fêmea (1F) para 1 macho estéril (1E) e o dia 0 (início da alimentação sanguínea) como as categorias de referência na comparação dos efeitos das demais categorias das covariáveis.

A partir dos resultados da Tabela 1, pode-se afirmar que as doses de radiação de 30 e 40 Gy não apresentaram diferença estatisticamente significativa na taxa de oviposição diária média (valor de  $P = 0,670$ ). Nota-se que as proporções de machos naturais (N) e estéreis (E) junto com as fêmeas (F) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na oviposição média pois os valores de  $p$  são maiores que 5%. Logo, a oviposição média não tem relação com a dose de radiação e tampouco com a proporção de machos naturais e irradiados.

Observou-se que as fêmeas começaram a sua oviposição dois dias após a 1ª alimentação, denotado como “Dia 0”. Utilizando a exponenciação das estimativas dos parâmetros, podemos ver que na segunda alimentação (Dia 1), obtêm-se um aumento de 6,4 vezes a quantidade de ovos observados para a primeira alimentação (Dia 0). Para a

3ª e 4ª alimentação, pode-se observar um aumento de mais de 10 vezes na oviposição média observada desde a primeira alimentação sanguínea das fêmeas.

A Tabela 2 apresenta a oviposição média observada e seus intervalos de confiança de 95% para cada uma das gaiolas, considerando também as doses de radiação.

**Tabela 2.** Oviposição diária média para as gaiolas observando as diferentes doses de radiação

Dose	Gaiolas	Oviposição Diária Média			
		Média	Desvio Padrão	IC 95%	
30 Gy	1	41,75	43,69	11,47	72,02
	2	71,87	67,18	25,31	118,43
	3	173,50	154,72	66,28	280,71
	4	75,50	67,82	28,49	122,50
40 Gy	5	40,5	36,94	14,89	66,10
	6	52,375	37,66	26,27	78,47
	7	113,75	81,91	56,98	170,51
	8	78,375	60,73	36,29	120,45

Os resultados tornam evidente que a oviposição ocorreu normalmente variando muito pouco entre as doses de radiação utilizadas no processo de esterilização dos machos. A maior diferença ocorreu entre os casos 3 e 7 com um aumento na oviposição diária média de aproximadamente 65,6%, embora não seja estatisticamente significativo.

Do Nascimento (2019) apresentou que a introdução de machos estéreis diminui a taxa de nascimento de larvas, interrompendo a proliferação e o crescimento acelerado das populações de mosquitos quando em condições ótimas de temperatura e locais com água parada. A inserção de machos estéreis é uma técnica de controle biológico que pode ajudar no combate ao *Aedes aegypti* porque são soltos apenas mosquitos machos, que não exercem alimentação sanguínea.

#### 4 CONCLUSÕES

As vastas dificuldades em promover um controle eficiente do crescimento das populações de *Aedes aegypti* nas cidades torna importante o estudo de métodos de controle relacionadas a sua reprodução, buscando amenizar os impactos que este vetor traz ao sistema público de saúde do Brasil por meio da transmissão de diferentes doenças tropicais. Devido a grande variabilidade dos dados coletados para a oviposição diária, o modelo de regressão para a Binomial Negativa apresentou o melhor ajuste,

quando comparada ao modelo de regressão de Poisson. As duas doses utilizadas para esterilização dos machos bem como as proporções de machos naturais e estéreis não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na oviposição média. Entretanto, as alimentações sanguíneas aumentaram significativamente a oviposição média, logo quanto maior o acesso a alimentação sanguínea, maior será a quantidade de ovos depositados pelas fêmeas.

## 5 REFERÊNCIAS

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

BRAGA, Ima A.; VALLE, Denise. **Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência**. Epidemiol. Serv. Saúde, v.16, n.4, p.279-293, out-dez, 2007.

SAÚDE, M. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, *chikungunya* e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 32, 2020. **Boletim Epidemiológico| Secretaria de Vigilância em Saúde| Ministério da Saúde**, v. 51, n. 34, pg. 11, 2020.

NEVES, D. P.; LINARDI, P. M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana. 11ª edição**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 355-367.

YANG, M. H.; THOMÉ, Roberto CA. Controle ótimo do Mosquito Aedes aegypti via técnica de insetos estéreis. **In: CONGRESSO NACIONAL DE MATEMÁTICA APLICADA E COMPUTACIONAL**, 2007.

CRISTINO, Ariane C. **Estimação de taxas de um modelo matemático de dinâmica populacional do mosquito transmissor da dengue**. Trabalho de Conclusão de Curso, UNESP, Botucatu, 2015.

ALVARENGA, Ana M. T. **Modelos lineares generalizados: aplicação a dados de acidentes rodoviários**. Dissertação (Mestrado em Gestão de Informação, Especialização em Gestão e Análise de Dados). Universidade de Lisboa, Portugal, 2015.

PAULA, G. A. **Modelos de Regressão com Apoio Computacional**. Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, 2013. p. 290-321.

DO NASCIMENTO, Leandro Augusto et al. Análise estatística de um delineamento de experimento para esterilização por radiação de mosquitos Aedes aegypti. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, v. 7, n. 3, 2019.