



## GRUPO DE ESTUDO DE DESEMPENHO AMBIENTAL DE SISTEMAS ELÉTRICOS - GMA

### CONTROLE DA INFESTAÇÃO DO MEXILHÃO-DOURADO POR INDUÇÃO GENÉTICA DA INFERTILIDADE

**JULIANA ALVES AMERICO(1); HUMBERTO FREITAS DE MEDEIROS FORTUNATO(2); FÁBIO SENDIM  
MANOEL(1); JOÃO GABRIEL RODINHO NUNES FERREIRA(1); RAQUEL MEDEIROS ANDRADE  
FIGUEIRA(2); YASMIN RODRIGUES DA CUNHA(1); LUANA FERREIRA AFONSO(1); MAURO DE FREITAS  
REBELO(3); DANIELLE LUCIANA AURORA SOARES DO AMARAL; MURILO GUIMARAES RODRIGUES  
BIO BUREAU BIOTECNOLOGIA LTDA(1); HUBZ(2); COPPE/UFRJ(3)**

#### RESUMO

Após 30 anos da chegada do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) na América Latina, a sua ocorrência continua a avançar e a causar prejuízos econômicos, principalmente para o setor elétrico, e impactos ambientais. O desenvolvimento de um método biotecnológico foi proposto como uma solução definitiva para o seu controle. A tecnologia se baseia em uma linhagem de mexilhão-dourado, manipulado através de biologia sintética, que ao se reproduzir com mexilhões selvagens, tornará as próximas gerações progressivamente inférteis. O programa de desenvolvimento desta tecnologia, iniciado em 2017, é apresentado, com foco na fase atual, que tem como objetivo principal obter o protótipo laboratorial.

#### PALAVRAS-CHAVE

*Limnoperna fortunei*, gene drive, biotecnologia, controle, espécie invasora

#### 1.0 INTRODUÇÃO

Espécies invasoras são a segunda maior ameaça à biodiversidade mundial e estima-se que sejam responsáveis por pelo menos 39% das espécies extintas nos últimos quatro séculos (Bellard, Cassey & Blackburn, 2016; Kiruba-Sankar et al., 2018). Além de impactos ambientais, causam prejuízos econômicos para os setores afetados pela sua proliferação. O setor elétrico é o principal impactado pela incrustação de mexilhões invasores, como o mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*), na América Latina, incluindo o Brasil. Os prejuízos se devem principalmente à incrustação dos mexilhões em trocadores de calor, filtros, tubulações, válvulas e outras estruturas, levando à interrupção da operação para manutenção e consequente perda de receita, além de custos com monitoramento e manutenção (Nakano & Strayer, 2014).

De acordo com Adelino e colaboradores (2021), os custos reportados com o gerenciamento (prevenção e controle) do mexilhão-dourado no Brasil são de no mínimo US\$ 9,97 milhões. Porém, tais custos ainda são subnotificados. Rebelo e colaboradores (2018) estimaram ainda os prejuízos com perda de receita, monitoramento e manutenção causados pelo mexilhão-dourado em UHEs brasileiras. Com a ocorrência de *L. fortunei* registrada em cerca de 40% das UHEs com potência instalada maior que 30 MW no Brasil, estimou-se que os prejuízos anuais podem ultrapassar US\$ 120 milhões, em perda de receita, enquanto os custos com monitoramento e manutenção podem variar entre US\$ 6,9 e 8 milhões ao ano.

Os impactos ecológicos do mexilhão-dourado são tão expressivos que a espécie é considerada um engenheiro de ecossistemas, pois modifica a estrutura e o funcionamento dos ambientes onde ocorre. Por exemplo, por ser um filtrador muito eficiente, altera a disponibilidade de nutrientes e aumenta a transparência da água e, consequentemente, a penetração de luz, favorecendo a proliferação de algas, em alguns casos tóxicas, e de vegetação aquática, como macrófitas. A ictiofauna também é impactada, pois algumas espécies de peixes passam a se alimentar do mexilhão, deixando de consumir suas presas usuais (Darrigran & Damborenea, 2011 e Boltovskoy & Correa, 2015). Seus impactos ambientais motivaram o Ministério do Meio Ambiente a classificar o mexilhão-dourado como uma das três espécies invasoras prioritárias para ações de controle e prevenção no Brasil até 2030 (MMA 2018).

Os métodos físicos atualmente empregados no controle desta espécie, tais como remoção mecânica por raspagem e jateamento são caros, demorados e podem causar danos às estruturas e exigir a interrupção da operação (MMA 2017). O controle químico, através da aplicação de compostos clorados, é desafiador, pois em resposta, o mexilhão-

dourado fecha suas valvas por tempos prolongados. Mesmo com estratégias de controle químico promissoras, que visam contornar este mecanismo de defesa, como os biocidas microencapsulados (Tang & Aldridge, 2019; Calazans et al., 2013), é improvável que populações invasoras já estabelecidas, como as do mexilhão-dourado, possam ser controladas ou erradicadas apenas através destes métodos (Teem et al., 2020).

Trinta anos após a primeira detecção do mexilhão-dourado na América Latina, a invasão continua a avançar pelo continente. Não existem relatos de erradicação do mexilhão-dourado após a sua introdução e invasão em países na América Latina (MMA 2017) e novas ocorrências continuam sendo reportadas. Em 2015, *L. fortunei* foi registrado pela primeira vez no nordeste brasileiro, no rio São Francisco (Barbosa et al., 2016) e, mais recentemente, em mais duas bacias hidrográficas (Atlântico Sudeste e Atlântico Nordeste Oriental) (Hermes-Silva et al., 2021). Uma das maiores preocupações é que o mexilhão-dourado chegue à bacia Amazônica, onde ameaçaria a maior biodiversidade aquática do mundo, além de um dos maiores potenciais hidroenergéticos do país (Uliano-Silva et al., 2013). Modelos matemáticos preditivos indicam que *L. fortunei* deve chegar à Amazônia na década de 2050, um evento que pode ainda ser antecipado por atividades antrópicas que agem como vetores para a dispersão do mexilhão, como programas de repovoamento de peixes realizados na região (Barbosa et al., 2018).

Sem uma tecnologia de controle eficiente para uma espécie invasora agressiva como o mexilhão-dourado, a meta de controlar sua invasão até 2030, e assim impedir a sua chegada a bacia Amazônica e interromper os prejuízos para o setor elétrico, pode ser muito ambiciosa para ser alcançada.

## 2.0 A SOLUÇÃO PROPOSTA

O desafio de controlar a proliferação do mexilhão-dourado motivou a proposta de uma estratégia de controle inovadora, baseada na vanguarda da biologia sintética. O *gene drive* (ou propulsor genético, em português) é um mecanismo que existe naturalmente em algumas espécies e aumenta a probabilidade de um ou mais genes serem herdados pelos descendentes, ao longo das gerações. O seu princípio foi mimetizado pela biologia sintética para favorecer a introdução de novas características ou funções em organismos-alvo. O desenvolvimento da ferramenta de modificação genética CRISPR/Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014), mais simples, customizável, precisa e eficiente que as até então existentes, contribuiu para tornar a implementação do mecanismo de gene drive mais simples e acessível a mais organismos.

O controle biotecnológico proposto para o mexilhão-dourado é fundamentado no mecanismo de *gene drive* baseado no sistema CRISPR/Cas9, análogo ao desenvolvido para o controle de mosquitos transmissores da malária, *Anopheles gambiae*, que induz a propagação da infertilidade nas fêmeas da espécie (Hammond et al., 2016; Kyrrou et al., 2018). Os resultados mais recentes com estes mosquitos demonstraram a supressão total da população em menos de um ano, em um experimento de grande escala em sistema fechado (Hammond et al., 2021), reforçando a eficiência da tecnologia para o controle de populações destes vetores.

A tecnologia de gene drive baseado em CRISPR/Cas9 consiste na inserção de um dispositivo genético no genoma do organismo a ser controlado, inativando uma das duas cópias de um gene-alvo essencial para a sua reprodução. Este dispositivo é uma molécula de DNA, constituída minimamente pelo gene da nuclease Cas9, responsável por clivar o DNA, e pelo gene do RNA guia (RNAg), responsável por guiar a Cas9 até o gene-alvo de forma específica. Programado para ser ativado apenas na linhagem celular que dá origem aos gametas (ovócitos ou espermatozoides), o dispositivo corta e se insere na cópia remanescente do gene-alvo, fazendo com que todos os gametas produzidos carreguem apenas a cópia interrompida, não funcional, do gene-alvo que afeta a reprodução, superando o padrão de herança tradicional (mendeliana) de 50% dos gametas (**Figura 1**). Consequentemente, as gerações subsequentes se tornam inférteis mais rapidamente na presença do *gene drive* (**Figura 1 - b**), levando a população invasora ao colapso.

## 3.0 O PROGRAMA DE DESENVOLVIMENTO DO CONTROLE BIOTECNOLÓGICO DO MEXILHÃO-DOURADO POR INDUÇÃO GENÉTICA DA INFERTILIDADE

A rota tecnológica para o desenvolvimento do controle biotecnológico foi planejada e mapeada de acordo com a escala de Nível de Prontidão Tecnológica (*Technology Readiness Level* -TRL), desenvolvida pela NASA para medir o nível de maturidade de uma tecnologia, desde os seus princípios básicos (TRL#1) até a sua inserção no mercado (TRL#9) (Hirshorn and Jefferies 2016). A **Figura 2** apresenta o principal avanço tecnológico de cada TRL e a correspondência desta escala com as fases da cadeia da inovação do Programa de P&D da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL).

Em 2017, o Programa de Desenvolvimento “Controle da Infestação do mexilhão-dourado por indução genética da infertilidade” foi iniciado com apoio e financiamento pioneiro da CTG Brasil, no âmbito do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento da ANEEL. Os princípios básicos (TRL#1) da tecnologia, já haviam sido observados e se basearam na primeira versão do genoma de *L. fortunei* (Uliano-Silva et al. 2018), essencial para o desenvolvimento

do controle biotecnológico, e no mecanismo de *gene drive* validado para o controle de mosquitos transmissores da malária (Hammond et al. 2016). O modelo conceitual (TRL#2) foi então elaborado através de um estudo de viabilidade técnica e econômica, que demonstrou a exequibilidade de um futuro negócio de desinfestação da espécie (Rebello et al., 2018).

A prova de conceito (TRL#3) correspondeu a demonstração da modificação genética de gametas masculinos (espermatozoides) do mexilhão-dourado e à compilação de uma lista de genes-alvo para interferência com a sua reprodução. Os espermatozoides, obtidos por um processo de liberação de gametas *ex vivo*, ou seja, por dissociação das suas gônadas em placas de *Petri* (Markovic et al. 2018), foram transfectados com o gene repórter que produz uma proteína verde fluorescente, demonstrando a viabilidade de modificação genética da espécie. Os genes-alvo candidatos foram selecionados a partir de um processo de prospecção por bioinformática no genoma de *L. fortunei* e também envolveu um estudo que buscou quantificar e comparar, em grande escala, os genes expressos nas gônadas de mexilhões machos e fêmeas (Afonso et al. 2019). Nesta fase, também foram prospectadas e desenvolvidas ferramentas moleculares, como sequências promotoras para controlar a atividade do gene da Cas9 e do seu RNA guia, além de genes de referência para uma investigação mais precisa dos níveis de expressão de genes-alvo específicos nas gônadas do mexilhão (Americo et al. 2019).

O TRL#4 teve início com uma avaliação da diversidade genética do mexilhão-dourado de reservatórios de cinco diferentes localidades geográficas brasileiras: Usina de Garibaldi (Abdon Batista, SC), Usina de Jupia (Três Lagoas, MS), Usina de Sobradinho (Sobradinho, BA), Usina de Itaipu (Foz do Iguaçu, PR) e Usina de Chavantes (Chavantes, SP). Os resultados das análises realizadas sugerem a ausência de diferenciação genética entre as populações geográficas analisadas e que, portanto, o controle biotecnológico pode ser funcional independente da população-alvo, sem a necessidade de customização para cada localidade (Ferreira et al. 2020).

No entanto, o avanço tecnológico que marca o alcance pleno do TRL#4 é o protótipo laboratorial da tecnologia que, no caso do controle biotecnológico, corresponde a geração do mexilhão-dourado geneticamente modificado com o *gene drive* para a disseminação da infertilidade. Este é o objetivo principal da fase atual, iniciada em 2019 com o apoio e financiamento da CTG Brasil, Tijoá Energia e SPIC Brasil. Além do protótipo laboratorial, a fase em execução tem também outros objetivos relevantes para o desenvolvimento principal, organizados em quatro grandes áreas: biologia sintética, genômica de bivalves, modelagem ecológica e identificação da severidade da infestação em reservatórios.

Para uma tecnologia de base biotecnológica como a proposta neste programa, um genoma referência de altíssima qualidade é essencial para o desenvolvimento e, futuramente, avaliação e monitoramento dos resultados do controle biotecnológico. Por esta razão, na fase atual, o genoma do mexilhão-dourado está sendo aprimorado para alcançar as métricas de acurácia, completude e contiguidade necessárias para elevá-lo à categoria de genoma platinum. O genoma platinum do mexilhão-dourado contribuirá também com a construção de uma base de genes compartilhados entre o mexilhão-dourado e outros moluscos, gerando subsídios para testar hipóteses e validar premissas para o desenvolvimento do mexilhão-dourado geneticamente modificado. Com o apoio de abordagens de genômica comparativa e filogenia molecular, informações sobre a função dos genes determinadas em outras espécies, mais bem descritas na literatura e em bancos de dados, podem fornecer evidências importantes para a caracterização funcional dos genes de *L. fortunei*.

Este processo tem sido empregado na curadoria dos genes-alvo candidatos para causar infertilidade no mexilhão-dourado, além de outros genes de interesse para a tecnologia. A curadoria envolve, entre outras etapas, inspeção manual dos modelos gênicos e avaliação de pré-requisitos, como expressão restrita a tecidos somáticos e evidências de haplosuficiência, que diz respeito ao número de cópias funcionais do gene-alvo necessárias para a fertilidade. Como resultado, a lista de genes-alvo foi triada e priorizada, e um gene-alvo foi selecionado como o mais promissor para induzir a infertilidade do mexilhão. Este gene pertence à família gênica DMRT (*Doublesex and Mab-3 related transcription factor*), cujos membros estão envolvidos na determinação e diferenciação sexual em outros organismos modelo (Kopp 2012) e inclui o gene-alvo utilizado com sucesso no controle do mosquito *A. gambiae* (Kyrou et al. 2018).

A área de biologia sintética está diretamente relacionada à modificação genética deste gene-alvo. Para viabilizar esta etapa, estão sendo implementados protocolos de alimentação, cultivo e reprodução do mexilhão-dourado em condições laboratoriais. Processos moleculares e celulares para a caracterização da espécie também estão sendo desenvolvidos. A modificação genética do gene-alvo está sendo planejada e testada primeiramente *in silico* (por abordagens computacionais) e *in vitro* (por ensaios enzimáticos, fora do organismo) para quando aplicada *in vivo* (no organismo), as chances de sucesso serem maiores.

A implementação reprodutível e sistemática da reprodução laboratorial é desafiadora. As condições fisiológicas e o estágio de desenvolvimento das matrizes coletadas na natureza exercem uma influência importante, assim como uma oferta adequada de alimento para os animais mantidos em cativeiro, sem a qual a reprodução pode ser

inviabilizada. Apesar destes desafios, pela primeira vez no mexilhão-dourado, foi realizada a fertilização em laboratório com o uso de espermatozoides e ovócitos obtidos através de um processo *ex vivo*, sem a indução de desova, um passo essencial para a modificação genética da espécie.

Em paralelo, as sequências genéticas para compor o dispositivo genético do *gene drive* são projetadas *in silico*. Um dos seus componentes mais importantes é o chamado RNA guia (gRNA), que deve direcionar a nuclease Cas9 para o gene-alvo de forma específica. As sequências projetadas para o gene-alvo DMRT passaram pela validação *in silico* e, após sua síntese, foram submetidas a um ensaio de clivagem *in vitro*, onde as moléculas de gRNA foram incubadas com o DNA do mexilhão e a enzima Cas9. Todas as moléculas de sgRNA testadas cortaram o gene-alvo, como antecipado pela avaliação *in silico*, diminuindo o risco das próximas etapas de modificação genética *in vivo*.

Antes mesmo da obtenção do mexilhão geneticamente modificado, estão sendo analisados parâmetros que influenciam a dinâmica populacional do mexilhão-dourado e que podem afetar o futuro serviço de desinfestação e mesmo antecipar possíveis riscos e requisitos para o sucesso do controle biotecnológico. Para isso, estão sendo investigados fatores que possam influenciar parâmetros como razão sexual, densidade populacional e distribuição espacial do mexilhão-dourado no ambiente, além do padrão de herança da propagação da infertilidade.

O primeiro modelo desenvolvido para avaliar o padrão de herança mendeliana e super mendeliana para disseminação da infertilidade no mexilhão-dourado indicou a viabilidade do controle biotecnológico para eliminar suas populações invasoras. Em um cenário promissor, a redução de quase 50% da população de mexilhões seria alcançada após cerca de 3 anos da introdução de mexilhões com *gene drive*. No entanto, o modelo também sugeriu que a associação da estratégia de *gene drive* com métodos de controle tradicionais pode acelerar a disseminação da infertilidade e, portanto, o controle da espécie. Neste cenário, a eliminação da população invasora ocorreria após cerca de oito anos da introdução do *gene drive*, concomitantemente a um segundo método de controle tradicional. Estes primeiros resultados são promissores e este modelo continuará sendo utilizado como apoio durante todo o desenvolvimento da tecnologia de controle, sendo aplicado e aprimorado para avaliar novos cenários e hipóteses, conforme novas informações e mais dados experimentais sejam obtidos.

O dimensionamento da infestação da espécie invasora é outro parâmetro essencial para que a aplicação do controle biotecnológico tenha resultado positivo. Para tal, metodologias clássicas e tecnológicas vêm sendo testadas para elaboração de um procedimento de quantificação mais rápido e eficiente. Testes têm sido realizados nas UHEs Ilha Solteira, Jupia e Três Irmãos (SP / MS) e na UHE São Simão (GO / MG). Em habitats heterogêneos dos reservatórios, 34 quadrados (25 x 25 cm) em transectos (80 m<sup>2</sup>) foram fotografados e raspados para quantificação de indivíduos e biomassa. Os fotoquadrados foram processados no programa CPCe para obtenção da abundância e dominância do mexilhão (Kohler & Gill, 2006). Os resultados também serviram como medida de calibragem e comparação com um método novo de Inteligência Artificial (IA). Essa ferramenta computacional desenvolvida em Python, usando Redes Neurais Convolucionais (Tang et al 2019, Kusumoto, 2019), vem sendo treinada para gerar estimativas automatizadas de abundância/m<sup>2</sup> e biomassa/m<sup>2</sup>, permitindo um processamento rápido de amostras que poderá ser utilizada por um usuário não especialista em identificação de moluscos. A quantificação por IA atingiu taxa de acerto acima de 85% quando comparada à contagem manual ou pelo CPCe, um resultado extremamente promissor.

Adicionalmente, dados abióticos foram obtidos com sonda multiparâmetros para correlação com dados biológicos e imagens de satélite Landsat-8 foram geoprocessadas com *Google Earth Engine* (GEE) para obtenção de temperatura, profundidade de Secchi, concentração de clorofila-a e Índice de Estado Trófico (Page et al., 2019, Mishra & Mishra, 2012, Carlson, 1977, Pires & Ferreira Jr, 2015). Observou-se uma abundância média de 8.200 indivíduos/m<sup>2</sup>, sendo as maiores concentrações em áreas construídas nas quais o mexilhão teve dominância acima de 80%. Ambientes contendo o mexilhão facilitaram a presença de outras espécies exóticas, reduzindo a densidade das nativas. A densidade do mexilhão não apresentou correlação significativa com os fatores abióticos mensurados, indicando a disponibilidade de substrato como o fator mais relevante nesse caso.

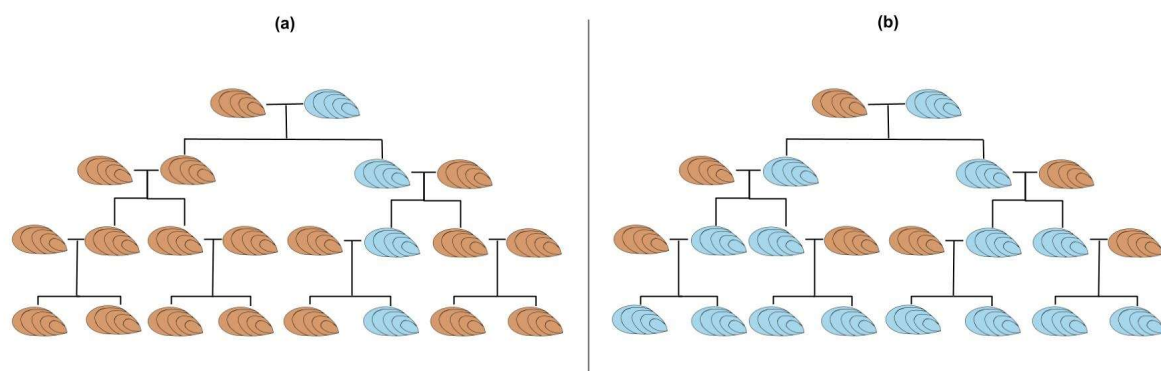
Outra ferramenta computacional, desenvolvida em MatLab, para simulação do padrão de dispersão de larvas nos reservatórios e de assentamento e progressão de mexilhões adultos, foi baseada nos dados de campo, resultados da análise de fotoquadrados e bibliografia sobre o mexilhão-dourado ou mexilhão-zebra, (Montresor, 2014, van de Koppel et al., 2005, Cangelosi et al, 2014). A simulação aplica o método dos Elementos Finitos triangulares lineares (Johnson, 1987) em combinação com o método de Crank-Nicholson (LeVeque, 2007). Essa ferramenta corroborou dados de campo e da literatura, exibindo distribuição preferencial em sítios contendo estruturas sólidas e obstáculos que reduzem a velocidade da água. Por esse método pode-se avaliar a progressão das populações a partir de uma colonização inicial ou após procedimento de desinfestação, permitindo planejamento prévio de aplicação de métodos de controle em pontos estratégicos e previsão mais precisa de resultados, aumentando a eficiência e sucesso do projeto.

#### 4.0 CONCLUSÃO

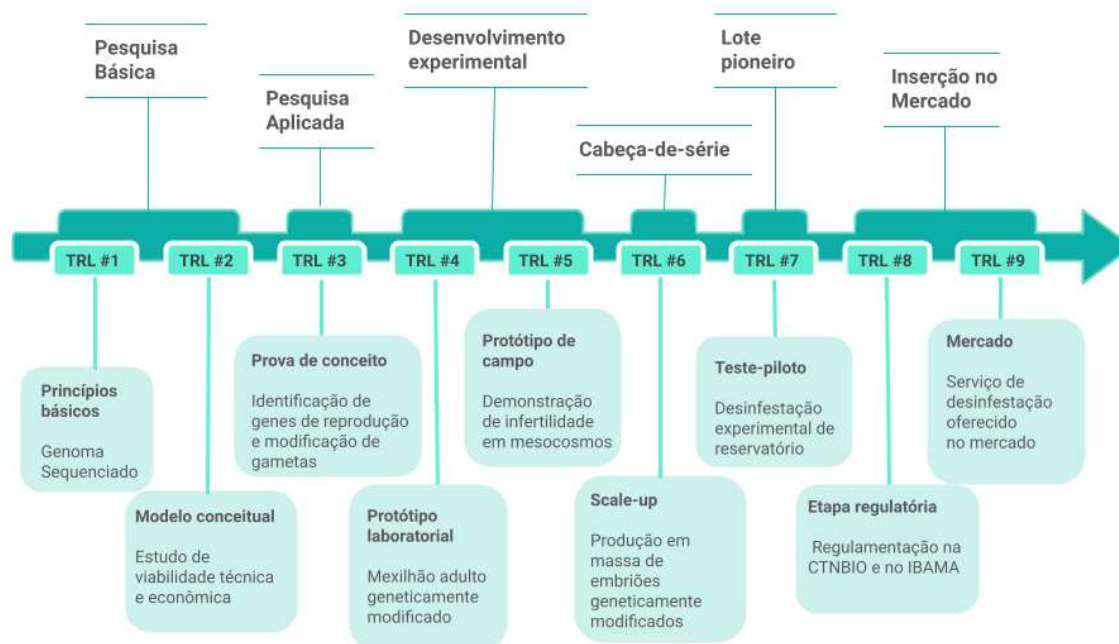
A infestação do mexilhão-dourado em lagos, rios, reservatórios e UHEs é atualmente um dos principais problemas ambientais do país e um risco para a produção de energia, com prejuízos ainda subestimados. A possibilidade de erradicação da espécie dos locais já infestados, utilizando apenas os métodos já disponíveis, é improvável e sem precedentes. Neste cenário, o controle biotecnológico em desenvolvimento se destaca como uma solução inovadora e com potencial para solucionar a infestação de forma definitiva, mitigando os impactos econômicos e ambientais desta agressiva espécie invasora. Desde o início do programa de desenvolvimento, em 2017, os avanços tecnológicos alcançados permitiram trazer a tecnologia para o nível de prontidão TRL#3 (prova de conceito) e a execução do TRL#4 (protótipo laboratorial) está em andamento, com resultados promissores, obtidos por modelagem da herança genética, que reforçam o potencial e viabilidade da tecnologia para recuperar corpos d'água e UHEs ocupados pelo mexilhão-dourado. Com um mercado esperado que engloba todas as UHEs infestadas pelo mexilhão-dourado, cerca de 20.000 km<sup>2</sup> de reservatórios, o controle biotecnológico, quando pronto, trará benefícios econômicos, socioambientais e tecnológicos para o setor elétrico e para a sociedade.

#### 5.0 AGRADECIMENTOS

O programa de desenvolvimento apresentado neste trabalho recebeu financiamentos no âmbito do programa de P&D da ANEEL. As duas primeiras fases foram financiadas pela CTG Brasil (PD-07514-0002/2017 e PD-07514-0118/2018), enquanto a fase atual, iniciada em 2019, é financiada pela CTG Brasil, Tijoá Energia e SPIC Brasil (PD-10381-0419/2019).



**FIGURA 1** - Representação do padrão de herança (a) mendeliana e (b) super mendeliana (com gene drive). Os mexilhões selvagens (férteis e sem *gene drive*) são representados em laranja. Em azul, estão representados mexilhões que portam pelo menos uma cópia do gene-alvo não funcional. As três gerações subsequentes à reprodução de um único casal de mexilhões são representadas horizontalmente. Na ausência de *gene drive*, nota-se que a propagação de um gene-alvo não funcional (azul) é mais restrita que no padrão de herança impulsionado pelo gene drive. Os mexilhões se tornam estéreis quando possuem duas cópias não funcionais do gene-alvo, ou seja, quando são gerados a partir do cruzamento de dois mexilhões portadores do gene não funcional (azuis). Desta forma, o cruzamento entre os indivíduos representados na terceira geração do cenário com gene drive, (b) daria origem a uma prole totalmente infértil.



**FIGURA 2** – Rota tecnológica do desenvolvimento do controle biotecnológico do mexilhão-dourado por indução genética da infertilidade. O principal avanço tecnológico de cada nível da escala de prontidão tecnológica (TRL) é destacado na parte inferior do painel. Na parte superior, é apresentada a correlação entre a escala TRL e as fases da cadeia da inovação do programa de P&D da ANEEL.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Adelino, J. R. P. *et al.* (2021) 'The economic costs of biological invasions in Brazil: a first assessment', *NeoBiota*, pp. 349–374. doi: 10.3897/neobiota.67.59185.
2. Afonso, L. F. *et al.* (2019) 'Gonad transcriptome of golden mussel *Limnoperna fortunei* reveals potential sex differentiation genes', *bioRxiv*. doi: 10.1101/818757.
3. Americo, J. A. *et al.* (2019) 'Identification of suitable reference genes for qPCR expression analysis on the gonads of the invasive mussel *Limnoperna fortunei*', *bioRxiv*. doi: 10.1101/835447.
4. Barbosa, N. P. U. *et al.* (2016) '*Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River basin, Brazil', *Check List*, p. 1846. doi: 10.15560/12.1.1846.
5. Barbosa, N. P. U. *et al.* (2018) 'Prediction of future risk of invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) in Brazil with cellular automata', *Ecological Indicators*, pp. 30–39. doi: 10.1016/j.ecolind.2018.01.005.
6. Bellard, C., Cassey, P. and Blackburn, T. M. (2016) 'Alien species as a driver of recent extinctions', *Biology Letters*, 12(2), p. 20150623.
7. Boltovskoy, D. and Correa, N. (2015) 'Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America', *Hydrobiologia*, pp. 81–95. doi: 10.1007/s10750-014-1882-9.
8. Calazans, S. H. C. *et al.* (2013) 'Assessment of toxicity of dissolved and microencapsulated biocides for control of the Golden Mussel *Limnoperna fortunei*', *Marine environmental research*, 91, pp. 104–108.
9. Cangelosi, R. A. *et al.* (2015) 'Nonlinear stability analyses of Turing patterns for a mussel-algae model', *Journal of mathematical biology*, 70(6), pp. 1249–1294.
10. Carlson, R. E. (1977) *A Trophic State Index for Lakes*.
11. Darrigran, G. and Damborenea, C. (2011) 'Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America', *Zoological science*, 28(1), pp. 1–7.
12. Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014) 'Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346(6213). doi: 10.1126/science.1258096.
13. Ferreira, J. G. R. *et al.* (2020) 'Population structure of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on reservoirs from five Brazilian drainage basins', *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.05.28.122069.
14. Hammond, A. *et al.* (2016) 'A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*', *Nature biotechnology*, 34(1), pp. 78–83.
15. Hammond, A. *et al.* (2021) 'Gene-drive suppression of mosquito populations in large cages as a bridge between lab and field', *Nature communications*, 12(1), pp. 1–9.
16. Hermes-Silva, S. *et al.* (2021) '*Limnoperna fortunei* - Updating the geographic distribution in the Brazilian



- watersheds and mapping the regional occurrence in the Upper Uruguay River basin', *Biota Neotropica*, 21(3). doi: 10.1590/1676-0611-BN-2020-1175.
17. Hirshorn, S. R. and Jefferies, S. (2016) 'Final Report of the NASA Technology Readiness Assessment (TRA) Study Team'. Available at: [https://www.semanticscholar.org/paper/Final-Report-of-the-NASA-Technology-Readiness-\(TRA\)-Hirshorn-Jefferies/0856e1d07c529f74c8b6e651fb3f91680e80fb6e](https://www.semanticscholar.org/paper/Final-Report-of-the-NASA-Technology-Readiness-(TRA)-Hirshorn-Jefferies/0856e1d07c529f74c8b6e651fb3f91680e80fb6e) (Accessed: 14 September 2021).
  18. Johnson, C. (2012) *Numerical Solution of Partial Differential Equations by the Finite Element Method*. Courier Corporation.
  19. Kiruba-Sankar, R. *et al.* (2018) 'Invasive Species in Freshwater Ecosystems--Threats to Ecosystem Services', in *Biodiversity and Climate Change Adaptation in Tropical Islands*. Elsevier, pp. 257–296.
  20. Kohler, K. E. and Gill, S. M. (2006) 'Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology', *Computers & Geosciences*, pp. 1259–1269. doi: 10.1016/j.cageo.2005.11.009.
  21. Kopp, A. (2012) 'Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism', *Trends in genetics: TIG*, 28(4). doi: 10.1016/j.tig.2012.02.002.
  22. van de Koppel, J. *et al.* (2005) 'Scale-dependent feedback and regular spatial patterns in young mussel beds', *The American naturalist*, 165(3), pp. E66–77.
  23. Kusumoto, D. and Yuasa, S. (2019) 'The application of convolutional neural network to stem cell biology', *Inflammation and regeneration*, 39, p. 14.
  24. Kyrou, K. *et al.* (2018) 'A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes', *Nature biotechnology*, 36(11), pp. 1062–1066.
  25. LeVeque, R. J. (2007) *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations: Steady-State and Time-Dependent Problems*. SIAM.
  26. Markovic, M. *et al.* (2018) Cryopreservation of *Limnoperna fortunei* (golden mussel) sperm with polyethylene glycol. e27165v2. *PeerJ Preprints*. doi: 10.7287/peerj.preprints.27165v2.
  27. Mishra, S. and Mishra, D. R. (2012) 'Normalized difference chlorophyll index: A novel model for remote estimation of chlorophyll-a concentration in turbid productive waters', *Remote Sensing of Environment*, pp. 394–406. doi: 10.1016/j.rse.2011.10.016.
  28. Nakano, D. and Strayer, D. L. (2014) 'Biofouling animals in freshwater: biology, impacts, and ecosystem engineering', *Frontiers in Ecology and the Environment*, pp. 167–175. doi: 10.1890/130071.
  29. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade. [acessado em 14 Set 2021]. Disponível em: [http://www.institutohorus.org.br/download/marcos\\_legais/Resolucao\\_CONABIO%2007%20-%202018.pdf](http://www.institutohorus.org.br/download/marcos_legais/Resolucao_CONABIO%2007%20-%202018.pdf)
  30. Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA [acessado em 14 Set 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/centrais-de-contenido/2017-10-02-consulta-publica-mexilhao-dourado-2-pdf>
  31. Montresor, L.C. (2014). 'Implicações Ecotoxicológicas do Controle Químico de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). Universidade Federal de Minas Gerais.
  32. Page, B. P., Olmanson, L. G. and Mishra, D. R. (2019) 'A harmonized image processing workflow using Sentinel-2/MSI and Landsat-8/OLI for mapping water clarity in optically variable lake systems', *Remote Sensing of Environment*, p. 111284. doi: 10.1016/j.rse.2019.111284.
  33. Pires, Erica & Laerte Ferreira Jr. (2015). Mapeamento da temperatura de superfície a partir de imagens termais dos satélites Landsat 7 e Landsat 8. In: *Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. INPE. João Pessoa.
  34. Rebelo, M. F. *et al.* (no date) 'A sustainable synthetic biology approach for the control of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*)'. doi: 10.7287/peerj.preprints.27164v1.
  35. Tang, B. *et al.* (2019) 'Recent Advances of Deep Learning in Bioinformatics and Computational Biology', *Frontiers in genetics*, 10, p. 214.
  36. Tang, F. and Aldridge, D. C. (2019) 'Microcapsulated biocides for the targeted control of invasive bivalves', *Scientific reports*, 9(1), p. 18787.
  37. Teem, J. L. *et al.* (2020) 'Genetic Biocontrol for Invasive Species', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 0. doi: 10.3389/fbioe.2020.00452.
  38. Uliano-Silva, M. *et al.* (2013) 'Invasive species as a threat to biodiversity: The golden mussel *Limnoperna fortunei* approaching the Amazon River basin', pp. 135–148.
  39. Uliano-Silva, M. *et al.* (2018) 'A hybrid-hierarchical genome assembly strategy to sequence the invasive golden mussel, *Limnoperna fortunei*', *GigaScience*, 7(2). doi: 10.1093/gigascience/gix128.

## DADOS BIOGRÁFICOS



Bacharel em Ciências Biológicas - Genética - (2006) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), atua em projetos de pesquisa relacionados ao mexilhão-dourado desde 2007, integrando a equipe responsável pelo sequenciamento do genoma desta espécie. Mestre (2010) e Doutora (2014) em Ciências Biológicas - Biofísica - também pela UFRJ, realizou parte de seu doutorado na Università degli Studi del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro (UNIPMN), na Itália, em um grupo de pesquisa referência em biologia molecular de bivalves. Atualmente, é pesquisadora e CTO na Bio Bureau Biotecnologia e atua em projetos de Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação na área de biotecnologia ambiental.

## (2) HUMBERTO FREITAS DE MEDEIROS FORTUNATO

Doutor em Oceanografia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ com “período sanduíche” em Aix-Marseille Université (2019); Mestre em Ecologia e Evolução pela UERJ (2015); e Graduado em Biologia Marinha, pelas Faculdades Integradas Maria Thereza - FAMATh (2012). É especialista em ecologia e oceanografia, tendo experiência com ecossistemas aquáticos e animais bentônicos, como o mexilhão dourado. Atualmente é consultor ambiental na hubz e realiza pós-doutorado no SAGE/UFRJ.

## (3) FÁBIO SENDIM MANOEL

Doutorando no programa de pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ. Bacharel (2007), Licenciado (2009) e Mestre (2018) em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, experiência no ensino da Biologia, com ênfase em educação ambiental. Trabalhou no AquaRio e ONG Brigada Mirim Ecológica da Ilha Grande, nos quais aplicou, de forma interdisciplinar, metodologias de Pesquisa Científica e Ensino para divulgação e conhecimento da Biologia. Possui experiência de gestão, ensino e responsabilidade técnica (CRBio) vinculada à atividade de Maricultura nas áreas de Meio Ambiente e Biodiversidade.

## (4) JOÃO GABRIEL RODINHO NUNES FERREIRA

Graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Biofísica  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)  
2012-2017 Graduação Sanduíche - Programa Ciência sem Fronteiras  
Washington University in Saint Louis - EUA  
2014-2015 Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ  
2017-2019 Doutorado em Ciências Biológicas: Biofísica  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ  
2020-Atual

## (5) RAQUEL MEDEIROS ANDRADE FIGUEIRA

Doutora em Ciências Biológicas - Zoologia (2015); Mestre em Ciências Biológicas - Zoologia (2010); e Graduada em Ciências Biológicas - Zoologia (2005) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. É especialista em taxonomia, anatomia e genética de moluscos. Atua como gerente de projetos na hubz.

## (6) YASMIN RODRIGUES DA CUNHA

Graduada em Ciências Biológicas, com ênfase em Genética, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, em 2021. Mestranda em Biofísica pela UFRJ. Atuando como Pesquisadora Júnior na área de Biologia Molecular, na Bio Bureau Biotecnologia Ltda., e como aluna de pós-graduação no Laboratório de Biologia Molecular Ambiental (BioMA), atuando com foco em abordagens biotecnológicas para o controle de espécies invasoras.

## (7) DANIELLE LUCIANA AURORA SOARES DO AMARAL

Bacharel em Ciências Biológicas (2012), mestra (2014) e doutora (2018) em Ciências Biológicas, com ênfase em Genética e Biotecnologia, pela UFJF. Especialista em biologia molecular. Experiência em produção de plantas transgênicas, avaliação da biocompatibilidade de nanomateriais e produção de nanobiocompósitos para o cultivo de células de mamíferos em sistema 3D. Atuou como Consultora Pesquisadora II na área de biologia molecular no ISI Biossintéticos (SENAI CETIQT), em projetos de biotecnologia ambiental aplicada em parceria com a Bio Bureau Biotecnologia e o Laboratório de Biologia Molecular Ambiental (UFRJ). Atualmente é pesquisadora colaboradora na Bio Bureau Biotecnologia, na área de biologia molecular.

## (8) LUANA FERREIRA AFONSO

Bacharel em Engenharia de Bioprocessos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ (2017) com período sanduíche na University of Hull, Reino Unido. É Mestre (2019) em Ciências Biológicas (Biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, com dissertação relacionada à transcriptômica para prospecção de genes do desenvolvimento sexual do mexilhão-dourado. Tem experiência nas áreas de bioinformática e genômica. Currículo lattes disponível em <http://lattes.cnpq.br/5655643107845229>



(9) MURILO GUIMARAES RODRIGUES

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Católica de Santos (2002), mestrado em Biologia Animal pela Universidade Estadual Paulista (2007) e doutorado em Ecologia pela Universidade Estadual de Campinas (2013). Atuou como pesquisador em nível de pós-doutorado no Instituto de Pesquisas da Amazônia, no Swiss Ornithological Institute e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atualmente é pesquisador na empresa BioBureau Biotecnologia, responsável por conduzir análises de dados ecológicos. Tem interesse em fatores que influenciam a persistência de populações animais, com foco em modelagem estatística.

(10) MAURO DE FREITAS REBELO

Formado em Biologia Marinha pela Universidade Federal do Rio de Janeiro em 1994 com doutorado em Biofísica também pela UFRJ em 2001. Professor Associado do Instituto de Biofísica da UFRJ desde 2004 onde lidera o Laboratório de Biologia Molecular Ambiental - BioMA