

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”  
Instituto de Biociências de Botucatu  
Departamento de Parasitologia

Análise microbiológica da flora intestinal do mosquito *Aedes aegypti* através do sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq

**Jaqueline Jarusevicius**

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Monografia apresentada ao  
Instituto de Biociências de  
Botucatu – UNESP, para  
obtenção de título de Bacharel  
em Ciências Biomédicas

BOTUCATU  
2013

Jaqueline Jarusevicius

Análise microbiológica da flora intestinal do mosquito *Aedes aegypti* através do sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biomédicas

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Jarusevicius, Jaqueline.

Análise microbiológica da flora intestinal do mosquito *Aedes Aegypti* através do sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq / Jaqueline

Jarusevicius. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Capes: 21300003

1. *Aedes aegypti* - Controle. 2. Microbiota. 3. Intestinos. 4. Sequência de nucleotídeos. 5. Bactérias. 6. Sistemas de controle biológico.

Palavras-chave: Gene 16S rRNA; Microbiota; Miseg Illumina; Sequenciamento.

*Dedicatória*

A Juozas Jarusevicius Neto

*“As melhores coisas do mundo não se pode ver nem tocar... elas devem ser sentidas  
com o coração”*

*(Charlie Chaplin)*

*Agradecimentos*

Ao Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto, pelas orientações e ensinamentos.

À Mr. Carine Spenassatto, pelo suporte e companheirismo.

Ao grupo do laboratório Genotyping, pelo auxílio nos experimentos.

## Resumo

JARUSEVICIUS, J. Análise microbiológica da flora intestinal do mosquito *Aedes aegypti* através do sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq. 2013. Monografia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

Dengue é uma arbovirose que afeta cerca de 100 milhões de pessoas anualmente, em mais de 100 países situados nas regiões tropicais e subtropicais. Foi considerada a doença viral que mais cresceu no último ano, repercutindo em impactos sociais e econômicos nas regiões endêmicas devido às altas taxas de morbidade e mortalidade desencadeadas pela infecção. O principal vetor da dengue é o mosquito *Aedes aegypti*, presente em toda a faixa tropical e subtropical. Por apresentar hematofagia antropofílica, rápido desenvolvimento e características comportamentais específicas, é um excelente transmissor do vírus dengue. Medidas de controle da disseminação da dengue são restritas à eliminação do mosquito vetor, e um tratamento específico ainda não foi desenvolvido, bem como a criação de uma vacina que previna simultaneamente a infecção pelos quatro sorotipos do arbovírus. Uma característica que determina a disseminação de doenças é a alta competência vetorial de seus mosquitos transmissores, que tem sido associada à composição da microbiota intestinal do inseto. As bactérias presente no intestino do mosquito exercem funções relacionadas a sua nutrição, desenvolvimento e reprodução, e são também um importante fator na eliminação de patógenos, por interferirem diretamente na atividade viral, ou indiretamente a partir da ativação das vias antivirais pelos micro-organismos. Dessa forma, este trabalho visa estudar a diversidade microbiana intestinal do mosquito *Aedes aegypti* em diferentes estágios de vida, através de sequenciamento de última geração com a plataforma MiSeq Illumina.

Palavras-chave: Microbiota, gene 16S rRNA, sequenciamento, MiSeq Illumina.

### Lista de Ilustrações

Figura 1 – Reação de PCR padronizada, comparando diferentes métodos de extração.....	23
Figura 2 – Reação de PCR em triplicata das amostras de intestinos de mosquitos com 1 dia de emergência.....	24
Figura 3 – Produtos de PCR do gene 16S rRNA de intestinos de mosquitos com 2 dias pós-emergência, em triplicata – Pool1 (Imagem: ladder editado).....	27
Figura 4 – Produtos de PCR do gene 16S rRNA de intestinos de mosquitos com 2 dias pós-emergência, em triplicata – Pool2.....	28

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1 – Diversidade bacteriana apresentada em Filos, de amostras de mosquitos com 1 dia de emergência, extraídos de três diferentes formas..... 26
- Gráfico 2 – Diversidade bacteriana apresentada em Classes, de amostras de mosquitos com 1 dia de emergência, extraídos de três diferentes formas..... 26
- Gráfico 3 – Diversidade bacteriana apresentada em Filos, com comparação da microbiota intestinal de mosquitos de 1 e 2 dias pós-emergência..... 29
- Gráfico 4 – Diversidade bacteriana apresentada em Classes, com comparação da microbiota intestinal de mosquitos de 1 e 2 dias pós-emergência.....29
- Gráfico 5 – Bactérias divididas por gênero que aparecem nas 5 amostras.....30
- Gráfico 6 – Bactérias presentes nas amostras com 2 dias de emergência que não apareceram nas amostras de 1 dia de emergência.....30



**Lista de tabelas**

Tabela 1 - Sequencia dos iniciadores <i>antisense</i> de cada amostra.....	18
Tabela 2 - Quantificação da amostras em NanoDrop.....	22
Tabela 3 - Valores da quantificação por Real-Time das amostras de intestinos de mosquitos com 1 dia de emersão.....	25
Tabela 4 - Quantidade de <i>reads</i> geradas por amostra.....	25
Tabela 5 - Valores da quantificação por Real-Time das amostras de intestinos de mosquitos com 2 dias de emersão.....	28
Tabela 6 - Quantidade de <i>reads</i> geradas por amostra de microbiota de 2 dias.....	28

## Sumário

Resumo.....	5
Lista de Figuras.....	6
Lista de Gráficos.....	7
Lista de Tabelas.....	8
1.Introdução.....	11
2.Objetivos.....	16
3.Material e Métodos.....	17
3.1.Obtenção das amostras.....	17
3.1.1.Coleta dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e criação em laboratório.....	17
3.1.2.Dissecção do intestino médio dos mosquitos.....	17
3.1.3.Extração de DNA metagenômico.....	17
3.2.Estudo da diversidade microbiana intestinal.....	18
3.2.1.Amplificação do gene 16S rRNA.....	18
3.2.2.Purificação do DNA.....	20
3.2.3.Quantificação do produto de PCR purificado.....	20
3.2.4.Preparo do cartucho de sequenciamento <i>Illumina</i> .....	20
3.2.5.Sequenciamento <i>Illumina</i> .....	21
3.2.6.Processamento de dados.....	21
3.2.7.Taxonomia.....	21
3.2.8.Avaliação da diversidade bacteriana.....	22
4.Resultado e Discussão.....	23
4. 1. Padronização de extração de DNA e de reação de PCR.....	23
4. 1. 1. Avaliação dos diferentes métodos de extração das amostras.....	23
4. 1. 2. Padronização da reação de PCR para o gene 16S rRNA.....	23
4. 2. Estudo da diversidade microbiana intestinal de mosquitos recém-emergidos.....	25
4. 2. 1. Reação de PCR em triplicata.....	25
4. 2. 2. Quantificação das amostras por Real-Time.....	26
4. 2. 3. Sequenciamento <i>Illumina</i> da microbiota intestinal de mosquitos com 1 dia de emersão.....	26
4. 2. 3. 1. Quantidade de reads.....	26

	10
4. 2. 3. 2. Diversidade bacteriana.....	26
4. 3. Estudos da diversidade microbiana intestinal de mosquitos com 2 dias de emersão.....	28
4. 3. 1. Reação de PCR em triplicata.....	28
4. 3. 2. Quantificação das amostras por Real-Time. ....	29
4. 3. 3. Sequenciamento Illumina da microbiota intestinal de mosquitos com 2 dias de emersão.....	29
4. 3. 3. 1. Quantidade de reads.....	29
4. 3. 3. 2. Diversidade bacteriana.....	30
5.Conclusão.....	33
6.Bibliografia.....	34

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças tropicais negligenciadas fazem parte dos maiores problemas em saúde pública no mundo. Causadas por agentes infecciosos ou parasitários, que em muitos casos necessitam de um vetor para transmissão, afetam normalmente regiões cuja população possui baixa renda, como países da África, Ásia e América, repercutindo diretamente em problemas sociais e econômicos pelas altas taxas de morbidade e mortalidade (Souza, 2010).

Em recente relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), é registrado o sucesso no combate a doenças tropicais, embora os casos de dengue apareçam progredindo, sendo considerada a doença viral que mais cresceu no último ano. As principais causas do aumento de casos de dengue são decorrentes das recentes mudanças climáticas e dos grandes movimentos populacionais (WHO, 2013).

Dengue é uma arbovirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*), sendo o *Ae. aegypti* a principal espécie transmissora devido a sua associação com o ambiente urbano. Pela classificação taxonômica, este mosquito é um díptero pertencente à subordem Nematóceras, família Culicidae, subfamília Culicinae e subgênero Stegomyia. Sua morfologia é facilmente determinada por ser um mosquito escuro com anelações prateadas no abdome e patas, e por marcações no tórax que formam um desenho com aspecto de “lira” (Neves, 2009). É originário da África subsaariana e se difundiu por toda região tropical e subtropical pela capacidade de adaptação a estes ambientes que foram modificados pelo homem, fato que justifica a concentração da doença nestes territórios (Dye, 1992).

O desenvolvimento do *Ae. aegypti* compreende quatro estádios: ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto. A ovoposição pode ocorrer em até 10 criadouros diferentes, com uma variação de 1 a 50 ovos por criadouro. Estes criadouros são recipientes domiciliares e peridomiciliares, como vasilhas, caixas d’água e pneus. Os ovos são postos isoladamente, em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável, e podem resistir a secas por mais de um ano, o que facilita a sobrevivência e dispersão e dificulta o controle do mosquito (Figueiredo & Fonseca, 1966). O crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro. O desenvolvimento deste ciclo geralmente ocorre em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 e

15 dias, o que contribui para o rápido aumento da densidade populacional da espécie (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A alimentação do mosquito adulto é baseada em néctar de frutas, mas quando em período gestacional as fêmeas se alimentam de sangue para desenvolvimento dos ovos. Essa hematofagia ocorre em períodos diurnos e é preferencialmente antropofílica. Características como voos rápidos, escapes durante o repasto sanguíneo a qualquer movimento do hospedeiro e a alternância entre hospedeiros favoráveis à sobrevivência do mosquito e conferem uma melhor eficiência na disseminação de vírus quando o mosquito está infectado (Neves, 2009).

O vírus dengue é o agente etiológico da dengue. É classificado como um arbovírus pertencente a família Flaviviridae e gênero Flavivirus, e seu genoma é estruturado por RNA de fita simples com comprimento de 40-50 nm. Possui quatro sorotipos distintos – DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 – com competência para se multiplicarem nos mosquitos vetores e serem transmitidos aos hospedeiros vertebrados através de sua picada (WHO, 1997). Além do ser humano, alguns primatas também apresentam algumas manifestações clínicas após a infecção, embora a intensidade e duração não sejam tão notórias quanto no homem (Gubler, 1998).

Segundo a OMS cerca de 100 milhões de pessoas são infectadas por dengue anualmente, em mais de 100 países, sendo que 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de infecção, ainda que estes números sejam apontados como ser cerca de três vezes maior do que é notificado à OMS (Baht et al., 2013) Dengue é uma doença infecciosa transmitida pela picada do mosquito *Aedes* que, quando infectado, inocula um dos quatro sorotipos do arbovírus junto com sua saliva durante o repasto sanguíneo (Figueiredo & Fonseca, 1966). A manifestação da doença ocorre na forma de febres agudas (40°C) acompanhadas de cefaleia, dores atrás dos olhos, musculares e nas juntas, náuseas, vômitos, inchaço de glândulas e vermelhidões no corpo, que duram de 2 a 7 dias, após um período de incubação do vírus no indivíduo de 4 a 10 dias. Outra forma de manifestação da infecção do vírus DENV, a dengue severa, apresenta sintomas mais pronunciados, e pode ser letal nos estágios críticos de 24 a 48h após o aparecimento dos sintomas, que debilitam o organismo pelo extravasamento de plasma, acúmulo de fluido, complicações respiratórias, sangramento severo e enfraquecimento de órgãos (WHO, 2012).

O contato do vírus com o organismo do mosquito *Aedes* durante o repasto sanguíneo tem como primeiro alvo de infecção o intestino médio, pela interação que este tem com o sangue ingerido pelo mosquito. Nos primeiros 1-2 dias pós-infecção (dpi) as partículas virais infectam o epitélio do intestino médio, onde iniciam sua replicação. Cerca de 7 dpi é atingido o pico máximo de vírus no intestino. Em seguida, o vírus rompe a barreira intestinal e, ao atingir a hemolinfa, se dissemina pelo corpo do vetor, infectando todos seus órgãos. Em casos extremos, as glândulas salivares podem ser infectadas com 3 dpi. No entanto, na maioria das vezes, a concentração máxima de vírus nestes órgãos se dá entre 12 e 18 dpi, período este em que o mosquito pode infectar outros indivíduos susceptíveis (Salazar *et al*, 2007).

A infecção do tecido epitelial do intestino médio ocorre pela internalização do vírus pelas células através de endocitose mediada por clatrina (Cherry & Perrimon, 2004). O baixo pH do endossomo induz a fusão do envelope viral com a membrana celular, permitindo o desencapsulamento do nucleocapsídeo e a liberação do RNA viral no citoplasma. A molécula de RNA é então traduzida em uma poliproteína, uma única molécula que ao ser clivada origina proteínas exclusivas para a multiplicação dos vírus, que são proteínas não estruturais (NS), que atuarão na replicação do RNA viral, e proteínas responsáveis pela montagem dos vírus, as proteínas E (envelope), C (capsídeo) e N (nucleocapsídeo). Após a atuação conjunta dessas proteínas são formados vírus abeis a infectar outras células, repetindo o processo de replicação (Rodenhuis-Zybert *et al*, 2010).

A entrada de um corpo estranho no epitélio do intestino médio de artrópodes gera uma resposta imunológica, na tentativa de limitar a infecciosidade de patógenos (Xi *et al*, 2008). Assim, ao reconhecer o vírus DENV vias de sinalização são ativadas, entre elas as vias Toll e Jak-STAT, que estão relacionadas à atividade antiviral, bem como o mecanismo efetor de RNAi (Xu & Cherry, 2013), resultando na eliminação dos patógenos.

A presença de micro-organismos no intestino do mosquito também é um importante fator na eliminação de patógenos, por interferirem diretamente na atividade viral, ou indiretamente a partir da ativação das vias antivirais pelos micro-organismos. Evolutivamente, seres eucariontes e procariontes mantiveram estreita aproximação, sendo hoje encontradas relações de simbiose entre estes organismos nas mais variadas espécies. Em insetos, existe uma ampla variedade de colônias bacterianas (Dillon &

Dillon, 2004), que são responsáveis por auxiliar em estágios nutritivos, de desenvolvimento e reprodução (Minard *et al*, 2013). Estudos mostram que algumas bactérias, como *Assaia sp* e *Enterococcus sp*, são transmitidas da mãe para as próximas linhagens (transmissão vertical) (Crotti *et al*, 2009), mas a associação delas com o inseto está relacionada principalmente aos ambientes aquáticos, onde o mosquito se alimenta, durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento (Lindh *et al*, 2008). A rica variação de bactérias no inseto adulto também é relacionada com a condição de nutrição do mosquito, sendo maior o número de bactérias no intestino de mosquitos alimentados com açúcar e sangue, do que naqueles não alimentados (Gusmão *et al*, 2010). Os fatores que determinam quais micro-organismos específicos fazem parte da microbiota estão relacionados ao sexo, órgão parasitado, estágio de desenvolvimento e os ambientes de interação do mosquito (Minard *et al*, 2013).

Além da importância fisiológica da microbiota, novos estudos a têm relacionado como um importante modulador na infecção de patógenos. Observa-se um controle da capacidade vetorial pela microbiota através do tratamento do intestino do mosquito com antibióticos, que indicam que a ausência de microorganismos permite o aumento de oocistos de *Plasmodium spp.* e do vírus dengue tipo 2 em *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, respectivamente (Dong *et al*, 2009; Xi *et al*, 2008).

Em relação a composição da microbiota, ocorre uma dinâmica da diversidade microbiana durante as infecções. Em *Anopheles*, foi verificado que uma maior quantidade de Enterobacteriaceae no intestino do mosquito melhora significativamente o desenvolvimento do parasita no interior do vetor (Boissière *et al*, 2012). A família Enterobacteriaceae também é aumentada em *Ae. aegypti* na infecção com o vírus chikungunya (CHIKV), enquanto a presença de outros microorganismos endossimbiontes como *Wolbachia* e *Blattabacterium* é diminuída (Zouache *et al*, 2012).

No sistema imune, a microbiota é apresentada por Weiss *et al*, 2011, como um agente na maturação e funcionalidade da resposta imunológica. Em moscas Tse Tse há uma dependência da bactéria *Wigglesworthia* durante o estágio larval, que reflete na capacidade do inseto adulto superar possíveis infecções. A presença de microorganismos no intestino dos mosquitos também é associada à ativação das vias imunes, que são mantidas em níveis basais, a fim de que haja um controle da proliferação das bactérias entéricas. No entanto, essa resposta imunológica pode interferir indiretamente

na suscetibilidade do mosquito à infecção de patógenos. Isso pode ser evidenciado pela ativação da via Toll pela microbiota de *Ae. aegypti* (Xi *et al*, 2008), ou, mais especificamente, pela presença do fungo *Beauveria bassiana* no intestino do mosquito *Ae. Aegypti*, que tem uma significativa diminuição da replicação do vírus DENV, devido à produção de moléculas antivirais induzidas pelas vias Toll e Jack-Stat (Dong *et al*, 2012).

A interferência direta das bactérias nos patógenos é outra alternativa apresentada para se explicar as alterações na competência vetorial dos insetos. Competições pelo ambiente intestinal compartilhado com outras bactérias e parasitas, e a produção de moléculas com potencial antiparasitário durante o ciclo normal de desenvolvimento das bactérias, podem ser os fatores que modulam diretamente a infectividade de patógenos. Experimentos *in vitro* mostram a redução da infectividade do vírus *La Crosse* (família Bunyaviridae) ao incubá-lo com bactérias extraídas de *Ae. Albopictus* (Joyce *et al*, 2011). Em *Anopheles*, o desenvolvimento de *Plasmodium sp.* é inibido pela produção de espécies reativas de oxigênio pela bactéria *Enterobacter*. O mecanismo de inibição seria o impedimento da entrada do vírus nas células por fatores secretados pelas bactérias, impedindo a ligação do vírus com os receptores (PRRs) do epitélio intestinal (Cirimotich *et al*, 2011).

A partir das evidências mencionadas, compreende-se que a microbiota intestinal de mosquitos tem um papel determinante no estabelecimento na infecção do parasita em seu hospedeiro. O entendimento aprimorado de como ocorre este mecanismo de interferência e a identificação dos microorganismos que atuam especificamente nesta condição são ferramentas essenciais para o desenvolvimento de novas técnicas no controle da disseminação de doenças como a dengue. Desta forma, o presente estudo visa a caracterização da microbiota intestinal de diferentes populações de *Aedes aegypti* através de sequenciamento de nova geração, com perspectivas de comparação com as mesmas populações infectadas pelo vírus DENV.



**2. OBJETIVOS**

- Padronização de extração e de reação de PCR para estudo do gene 16S rRNA.
- Identificação da microbiota intestinal de mosquitos da cidade de Botucatu-SP.
- Comparação da microbiota intestinal de mosquitos em estágios iniciais da fase adulta.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3. 1. *Obtenção das amostras*

3. 1. 1. Coleta dos mosquitos *Ae. aegypti* e criação em laboratório. Palhetas contendo ovos foram coletadas em parceria com a Secretaria de Saúde de Botucatu e mantidas em condições controladas de temperatura (27°C), umidade (80%) e com fotoperíodo de 12 h, no insetário do Departamento de Parasitologia Unesp-Botucatu até a emergência dos mosquitos. Para que não houvesse interferência das bactérias do ambiente na microbiota intestinal do mosquito, durante o desenvolvimento do inseto, os recipientes e gaiolas que entraram em contato com os ovos, larvas, pupas e adultos foram previamente tratados com água sanitária e álcool, e água destilada foi utilizada para eclosão dos ovos, sendo trocada todos os dias até o estágio adulto. Os adultos passaram por uma triagem para identificação individual da espécie *Ae. aegypti*. Após 1 e 2 dias de emergência, parte das fêmeas foram separadas para dissecação de intestinos. No primeiro dia de emergência trinta fêmeas foram separadas para testar a melhor eficiência do kit de extração com o material homogeneizado de três diferentes formas (intestinos incubados, homogeneizados com bead de vidro 0,5mm e macerados com pistilo), enquanto que no segundo dia de emergência vinte fêmeas da mesma colônia foram separadas para formação de dois pools homogeneizados da forma mais eficiente, observada no teste com os mosquitos de um dia de emergência.

3. 1. 2. Dissecação do intestino médio dos mosquitos. Antes da dissecação, todo o material utilizado ficou por ~20 min em U.V., e as fêmeas de *Ae. aegypti* tiveram suas superfícies esterilizadas através da imersão individual em etanol a 70% (v/v) seguida de cinco enxagues em tampão fosfato-salino-estéril (PBS) 1x, pois, dessa forma, o material isolado dos intestinos não sofre interferência da microbiota superficial externa do mosquito. A dissecação foi realizada com o auxílio de um protocolo padrão (Coleman *et al*, 2007), através de um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss). Cada intestino dissecado foi mantido em tampão ATL, do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen), até a formação de pool com 10 intestinos para serem imediatamente extraídos após as dissecações.

3. 1. 3. Extração de DNA metagenômico. O kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) foi

escolhido para a extração do DNA metagenômico intestinal de *Ae. aegypti*. Três formas de homogeneização dos intestinos foram testadas para analisar em qual delas conseguimos obter maior quantidade de DNA. Para tanto, foram utilizados trinta mosquito com um dia de eclosão divididos em três pools, cada um contendo 10 intestinos dissecados. No primeiro grupo os intestinos foram apenas incubados (sem homogeneização), no segundo os intestinos foram processados em um homogeneizador magnético Bullet Blender BBX24 (Next Advance) com bead de vidro de 0,5mm, e no terceiro os intestinos foram macerados com auxílio de um pistilo. Estes três grupos foram extraídos em ATL, tampão do kit de extração. Além deles, foram realizados mais dois teste, com intestinos homogeneizados com bead de vidro (0,5 mm) e com intestinos macerados, em tampão PBS. O tampão PBS não foi testado com os intestinos inteiros, pois não haveria o rompimento da parede celular intestinal. Por fim, os intestinos dissecados de mosquitos com dois dias de emersão foram macerados em tampão ALT e extraídos em duplicata de 10 intestinos.

A extração foi realizada conforme as instruções do fabricante, e ao termino do procedimento foi realizada a quantificação das amostras no aparelho Nanodrop.

### **3. 2. Estudo da Diversidade Microbiana Intestinal**

3. 2. 1. Amplificação do gene 16S rRNA. As amostras foram submetidas à reação de PCR para a amplificação do gene 16S rRNA. A reação foi preparada em triplicata, e com reagentes separados, para que a quantidade dos mesmos pudesse ser modificada durante a padronização. Assim, para 3,0 µl de DNA molde, foram utilizados Tampão PCR 10x *Taq Platinum* (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), fornecido pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 2,5 mM (GE Healthcare), 1 U de P *Platinum® Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), 1 µl de cada *primer reverse* e *foward* específicos à 10 pmol, resultando num volume final de 25 µl.

Na sequencia do *primer reverse* para o sequenciamento *Illumina* é encontrada uma sequencia adaptadora complementar de pareamento 3' com a sequencia contidas na plataforma, sequencias estabilizadoras, a sequencia específica para pareamento com o gene 16S rRNA, e uma sequencia de DNA código de barra (index) que varia de um *primer* para outro. Por se tratar de um sequenciamento multiplex, em que todas as amostras serão agrupadas, foi utilizado um *primer reverse* diferente para cada amostra

poder ser diferenciada durante a leitura das sequencias. O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos foi realizado de acordo com Caporaso, 2012. O iniciador *sense* (*primer forward*) foi o mesmo utilizado para todas as amostras, com a sequencia estabelecida 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3'. A variação dos iniciadores *antisense* (*primer reverse*) é apresentada na tabela abaixo:

Tabela 1: Sequencia dos iniciadores <i>antisense</i> de cada amostra				
Amostras	Adaptador	Index	Estabilizadores	Específica 16S rRNA
1	3' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AATTGTGTCGGA	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT <sup>5'</sup>
2	3' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGTCGAACGAGG	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT <sup>5'</sup>
3	3' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GAATACCAAGTC	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT <sup>5'</sup>
4	3' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGCATACACTGG	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT <sup>5'</sup>
5	3' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CCAATACGCCTG	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT <sup>5'</sup>

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada no termociclador DNA Engine – Peltier Thermal Cycler (Bio Rad). Os ciclos de amplificação foram os mesmos para todas as amostras, e programados da seguinte forma:

95°C – 5 min	
95°C – 45 s *	} 35 ciclos
52°C – 45 s **	
72°C – 1 min ***	
72°C – 7 min	
4°C-----	

\*Desnaturação; \*\*Anelamento; \*\*\*Extensão

A longa extensão dos *primers* utilizados, em conjunto com uma região selecionada por eles de aproximadamente 350 pb, resulta na formação de grandes amplicons. Assim, foi necessária a realização de ensaios de padronização da reação de PCR, alterando as concentrações dos reagentes, e as temperaturas e os períodos de ciclagem.

Quatro microlitros do produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, corado com (ver). Os fragmentos amplificados foram comparados com o

DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen). O restante dos produtos de PCR foi utilizado para o sequenciamento.

3. 2. 2. Purificação do DNA. Antes das amplificações serem sequenciadas é necessário retirar todo composto que não seja DNA das amostras. Para tanto, a purificação foi realizada com o uso de bead magnética (AMPureXPgenecourt) e um suporte magnético (Ambion RNA Life Technologies). A bead magnética é um composto formado por uma região que se liga ao DNA e outra que é atraída por magnetismo. É necessário o uso de 1,8x a quantidade final das triplicatas de cada amostra juntas. Ao adicionar a bead magnética todo o DNA do meio é ligado a ela, e quando esta reação é colocada no suporte magnético o conjunto bead-DNA se agrupa na parede do recipiente formando um *pellet*. Todo o material que não está contido no *pellet* é descartado.

O final da purificação ocorre com o isolamento do DNA, separando este da bead magnética através da adição de solução TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

#### 3. 2. 3. Quantificação do produto de PCR purificado.

Para a quantificação do DNA no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®), 6 padrões foram aplicados em triplicatas no suporte 96 *well plate*, para a formação de curvas de referencia, que delimitam um espaço no gráfico que compreende os valores esperados da quantificação.

Os produtos amplificados e purificados foram diluídos em série em solução Tris-HCl (10 mM) e Tween 20 (0,05%) para chegar a uma concentração final de DNA 1:10<sup>4</sup>. Para cada amostra foi feita uma diluição em triplicata.

Nos poços do suporte 96 *well plate*, as amostras diluídas em triplicatas foram aplicadas, num volume final de 20 µl, contendo 4,0 µl do material diluído e 16 µl de mix de fluorescência. Por fim, para comparação, foi adicionado um controle negativo, contendo apenas o mix com fluorescência.

3. 2. 4. Preparo do cartucho de sequenciamento Illumina. A concentração de DNA de uma amostra para outra é variável. Para o sequenciamento transcorrer corretamente é necessário que todas as amostras estejam sob a mesma concentração, pois assim o DNA hibridiza corretamente às sondas do sequenciador, e os clusters de leitura conseguem identificar precisamente as bases nucleotídicas das amostras. Assim, os resultados

apresentados pelo equipamento de quantificação foram calculados para que diluindo as amostras em água, todas elas ficassem na concentração de 2,0 nM.

Foram agrupados num pool 5,0 µl de cada amostras (2,0 nM) e de um controle positivo (amostra que já havia funcionado em corridas anteriores). Após homogeneização da mistura, 5,0 µl foram misturados com solução NaOH (0,2N) recém preparada e uma solução tampão Hyb (MiseqReagentNanoKit), responsável pela denaturação do DNA, formando uma biblioteca de DNA de 10 pM.

No cartucho, foram adicionados 3 *primers* (*Foward*, *IndexSequence* e *Reverse*) e a biblioteca de DNA, em compartimentos diferentes.

3. 2. 5. Sequenciamento Illumina. Antes de iniciar o sequenciamento unidirecional no aparelho MiSeq Personal Sequencer (*Illumina*) do Departamento de Genética/IBB/Botucatu, foi anexada uma planilha (SampleSheet) com a identificação do lote do cartucho, das amostras e os *primers reverse* utilizados. Dessa forma, o programa IlluminaExperiment Manager é orientado a associar cada *read* identificada com sua amostra correspondente. Em seguida o cartucho montado anteriormente foi introduzido no aparelho para ser iniciada a corrida de sequenciamento, sendo as sequencias geradas disponibilizadas publicamente no Genebank.

3. 2. 6. Processamento de dados. Os dados obtidos do sequenciamento foram processados com base no protocolo desenvolvido por (Boissière *et al*, 2012) e utilizando o programa *CLC bio workbench*. Os fragmentos de leitura (tags) foram extraídos apenas se estes possuírem as sequências dos iniciadores e dos indexes. Um processamento de desrepliação foi então aplicado para a remoção de tags com nucleotídeos não identificados (N). As tags que passarem pelo teste de qualidade inicial foram elencadas decrescentemente de acordo com sua ocorrência e agrupadas em clusters com o fator de diferença  $k = 3$ , de acordo com (Stoeck *et al*, 2009), o que resultou na determinação das sequências únicas.

3. 2. 7. Taxonomia. A atribuição taxonômica de todas as tags únicas foi processada através de um método de alinhamento global, utilizando-se as sequências ribossomais de referência do banco de dados SILVA. Uma tag é associada a um determinado táxon se sua similaridade com a sequência de referência for de ao menos 80%, sendo

desconsideradas todas as que não atingiram este patamar de identidade. Nos casos em que uma tag apresenta similaridade superior a 80% com mais de uma sequência de referência, foi considerada apenas aquela de maior valor. Finalmente as tags foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTO) de acordo com sua taxonomia consenso.

3. 2. 8. Avaliação da diversidade bacteriana. Foram construídos gráficos para a melhor visualização da diferença da microbiota intestinal em cada amostra. As espécies obtidas no item anterior foram agrupadas de acordo com o gênero, classe e filo a que pertencem, sendo considerados os grupos que apresentaram o mínimo de 10 reads.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4. 1. Padronização de extração de DNA e de reação de PCR

#### 4. 1. 1. Avaliação dos diferentes métodos de extração das amostras.

Para o estudo da diversidade microbiana intestinal do mosquito *Ae. aegypti* a forma de extração de DNA mais eficiente é aquela em que há uma maior obtenção de DNA bacteriano. Foram então testadas três diferentes formas de homogeneização dos intestinos antes da extração de DNA com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) comparando também os tampões ATL e PBS. No primeiro teste os intestinos foram incubados em tampão ATL (A), sem serem homogeneizados (intestinos inteiros), conforme as instruções do fabricante; no segundo teste os intestinos foram homogeneizados com beads de vidro (0,5 mm) em tampão ATL (B); e no terceiro teste os intestinos foram macerados com auxílio de um pistilo em tampão ATL (C); no quarto teste os intestinos foram homogeneizados com beads de vidro (0,5 mm) em tampão PBS (D); e no quinto teste os intestinos foram macerados com auxílio de um pistilo em tampão PBS (E).

A quantificação das amostras extraídas é apresentada na tabela a baixo, que mostra o teste com intestinos homogeneizados por maceração (C) como o que obteve maior concentração de DNA:

Amostra	Concentração (ng/μl)
A	80,3
B	64,1
C	92,5
D	46,2
E	76,8

#### 4. 1. 2. Padronização da reação de PCR para o gene 16S rRNA.

Os primeiros testes para a amplificação do gene 16S rRNA das amostras não obtiveram muito sucesso. Por ser um isolamento de DNA bacteriano as reações ficam muito suscetíveis a contaminação. Além disso, pelo fato dos iniciadores conterem sequencias



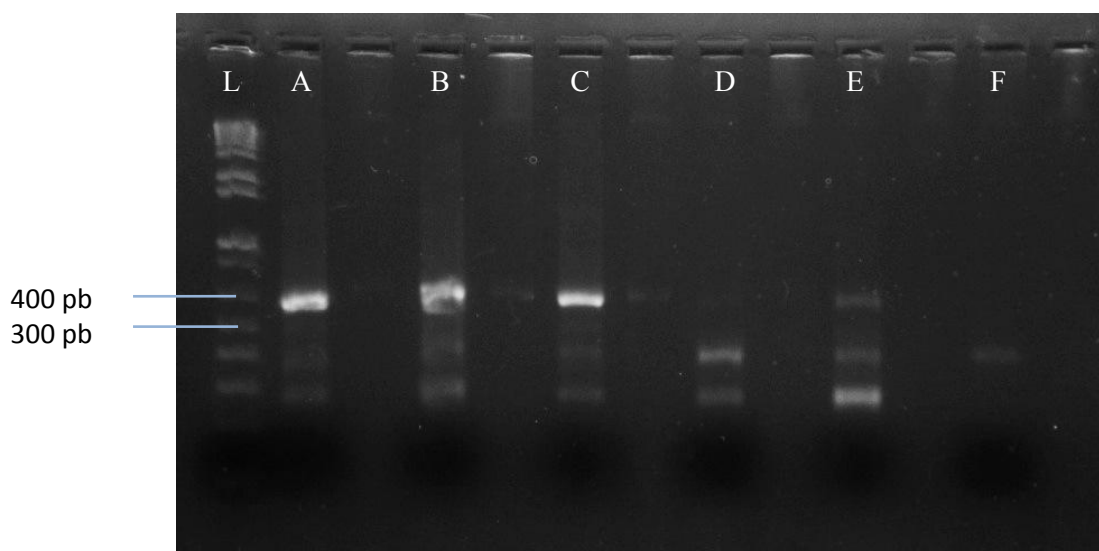
muito longas, a temperatura de anelamento indicada é de 60°C, o que aumenta as chances de amplificações inespecíficas.

Após testes com variação de temperatura de anelamento, alteração da quantidade dos reagentes e modificações da concentração da amostra na reação de PCR, o resultado final (Figura 1) mostra o aparecimento de bandas de aproximadamente 400 pb para as amostras homogeneizadas em ATL (A, B e C), sem variação aparente da intensidade de uma amostra para a outra. Uma banda menor foi amplificada, correspondendo em tamanho e intensidade à amplificação do controle negativo, sendo, portanto, contaminação.

O tampão PBS não foi considerado eficiente para a extração de DNA. O material da amostra D foi muito pouco amplificado, com a banda de contaminação mais forte. A amostra E apresenta uma banda mais forte em comparação à amostra D, mas bem mais fraca do que as amostras amplificadas com ATL. Dessa forma, foi considerado que a melhor forma de extração de DNA é a partir do uso do tampão ATL ao invés de PBS.

A comparação das amostras homogeneizadas ATL mostra que em C a banda aparece mais bem definida. Da mesma forma, em PBS, a banda esperada do gene 16S rRNA aparece apenas em E. Assim, foi admitido para este estudo que a melhor forma de homogeneização dos intestinos foi a maceração.

Figura 1: Reação de PCR padronizada, comparando diferentes métodos de extração.



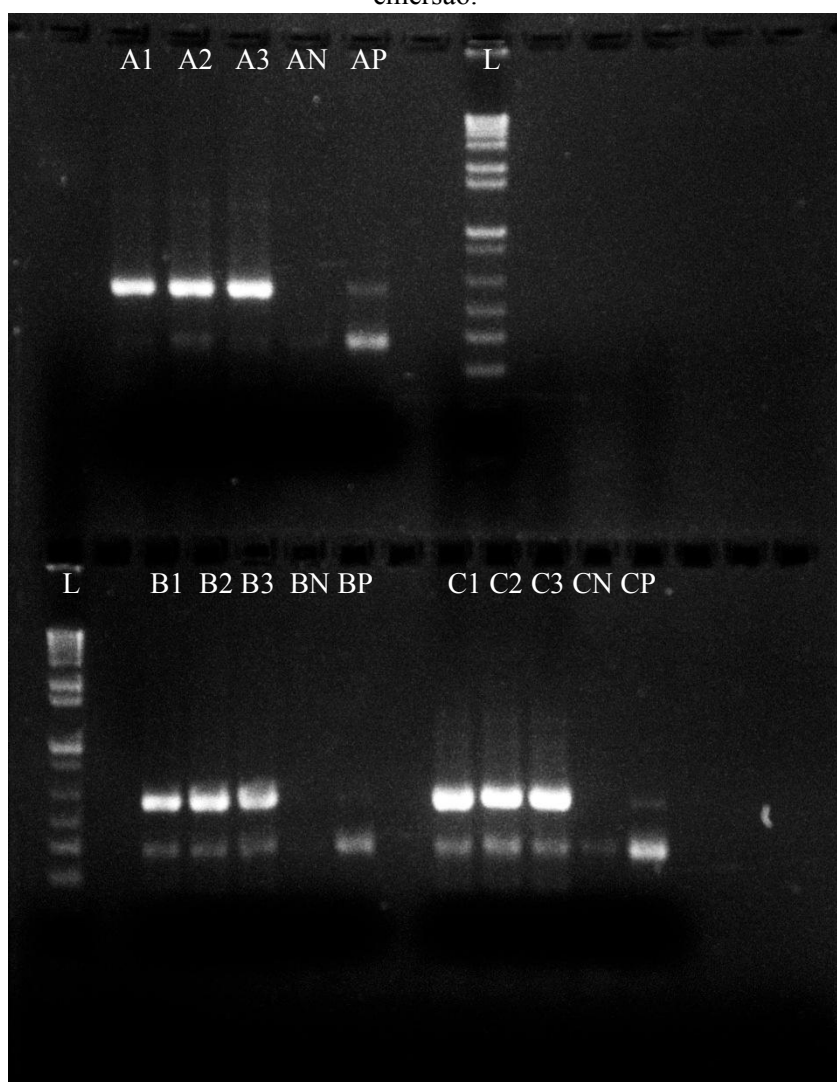
L: ladder; A: intestinos inteiros em ATL; B: intestinos homogeneizados com bead de vidro (0,5 mm) em ATL; C: intestinos macerados em ATL; D: intestinos homogeneizados com bead de vidro (0,5 mm) em PBS; E: intestinos macerados em PBS; F: controle negativo.

## 4. 2. Estudo da diversidade microbiana intestinal de mosquitos recém-emergidos.

### 4. 2. 1. Reação de PCR em triplicata.

Após a padronização de extração e da reação de PCR, foi realizada a reação de PCR das amostras homogeneizadas em ATL (A, B e C) em triplicata para o sequenciamento. As bandas em triplicata aparecem fortes e não houve contaminação. O resultado pode ser observado na figura seguinte:

Figura 2: Reação de PCR em triplicata das amostras de intestinos de mosquitos com 1 dia de emersão.



L-ladder; A1, A2 e A3-triplicata de 10 intestinos inteiros extraídos em ATL (A); AN-controle negativo da triplicata (A1, A2 e A3); AP-controle positivo da triplicata (A1, A2 e A3); B1, B2 e B3-triplicata de 10 intestinos homogeneizados com bead de vidro (0,5mm) em ATL (B); BN-controle negativo da triplicata (B1, B2 e B3); BP-controle positivo da triplicata (B1, B2 e B3); C1, C2 e C3-triplicata de 10 intestinos macerados em ATL (C); CN-controle negativo da triplicata (C1, C2 e C3); CP-controle positivo da triplicata (C1, C2 e C3).

#### 4. 2. 2. Quantificação das amostras por Real-Time.

Os valores da quantificação foram muito próximos entre as três amostras.

Tabela 3: Valores da quantificação por Real-Time das amostras de intestinos de mosquitos com 1 dia de emersão	
Amostra	Quantificação
A	9,766
B	9,736
C	9,777

#### 4. 2. 3. Sequenciamento Illumina da microbiota intestinal de mosquitos com 1 dia de emersão.

##### *4. 2. 3. 1. Quantidade de reads*

A quantidade total de reads geradas pelo sequenciamento é apresentada na tabela seguinte:

Tabela 4: Quantidade de reads geradas por amostra	
Amostra	Reads
A	1577
B	2166
C	1568

A maior quantidade de reads aparece na amostra com os intestinos homogeneizados com bead de vidro (0,5 mm) (B). O resultado esperado para maior quantidade de reads era com a amostra de intestinos macerados (C), já que esta amostra apresentou um destaque em relação as outras na extração de DNA, na reação de PCR e na quantificação por RT-PCR . Este resultado mostra não há necessariamente uma relação entre a quantidade de reads geradas com a concentração do DNA isolado.

##### *4. 2. 3. 2. Diversidade bacteriana*

Nos gráficos a seguir foram agrupadas bactérias por filo, classe e gênero para melhor visualização da informação:

Gráfico 1: Diversidade bacteriana apresentada em Filos, de amostras de mosquitos com 1 dia de emersão, extraídos de três diferentes formas.

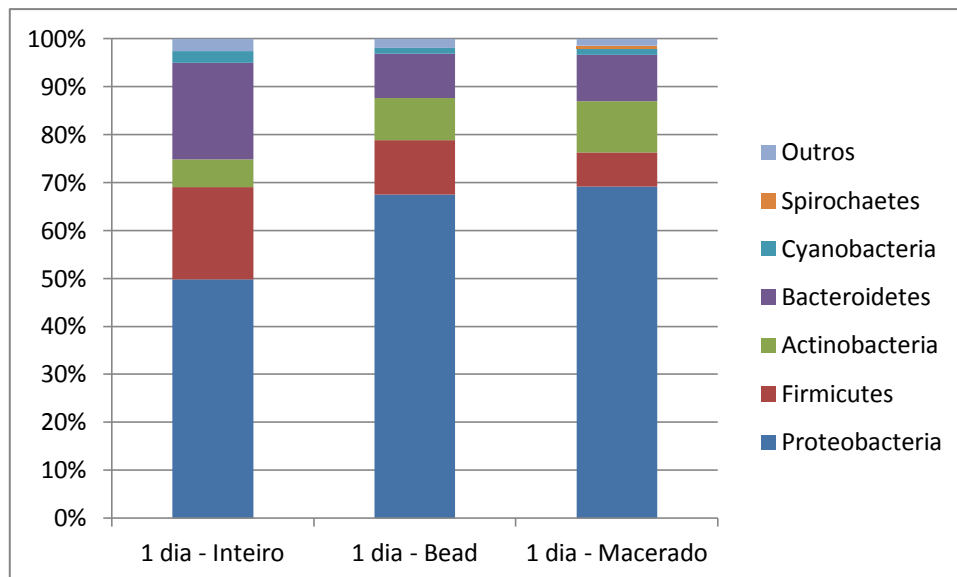
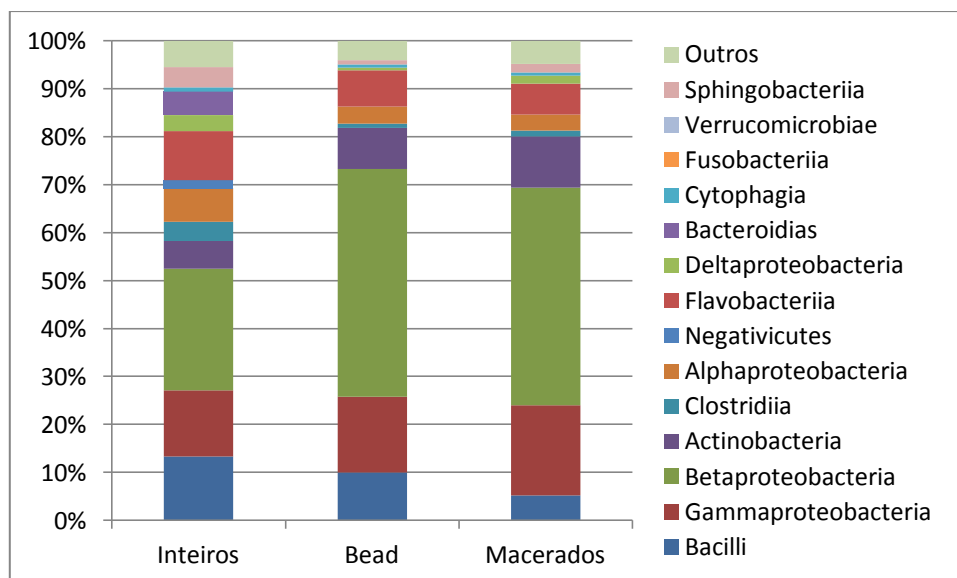


Gráfico 2: Diversidade bacteriana apresentada em Classes, de amostras de mosquitos com 1 dia de emersão, extraídos de três diferentes formas.



Com base nos gráficos, foi observado que nas três formas de homogeneização dos intestinos bactérias aparecem em uma proporção semelhante entre as amostras. No entanto, a amostra homogeneizada com bead de vidro (0,5 mm) apresentou maior quantidade de *reads*, embora a amostra macerada tenha conseguido obter um filo a mais de bactérias (Spirochaetes).

Quando comparadas por Filos, as amostras apresentam maior prevalência de Proteobacterias. Em relação às classes, Betaproteobacterias são as mais presentes nas amostras, seguidas por Gammaproteobacterias, Actinobacterias e Bacilli.

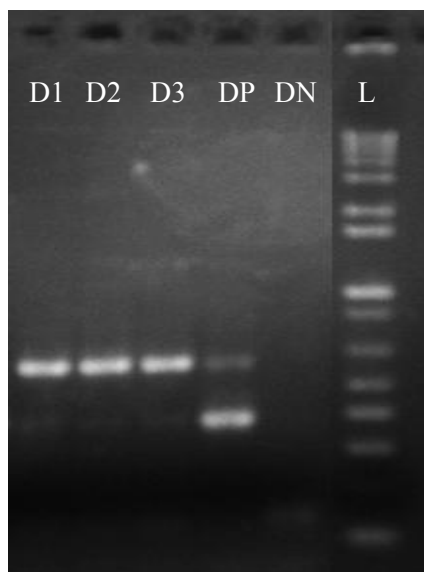
#### **4. 3. Estudos da diversidade microbiana intestinal de mosquitos com 2 dias de emergência.**

Com base nos resultados obtidos dos testes anteriores, o estudo da diversidade microbiana intestinal de mosquitos com 2 dias de emergência foi realizado com intestinos homogeneizados em ATL por maceração. Além disso, o experimento foi feito em duplicata para a maior captação das bactérias.

##### 4. 3. 1. Reação de PCR em triplicata.

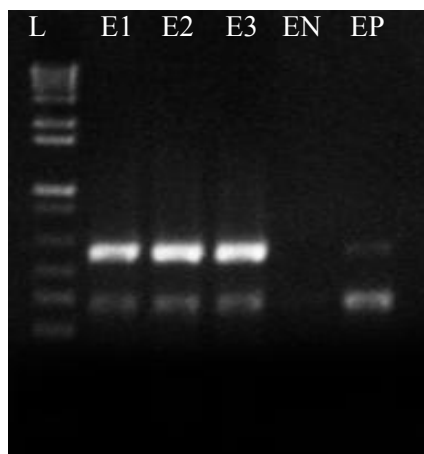
São apresentadas nas figuras seguinte as triplicatas de amplificação para sequenciamento de 2 pools de intestinos de mosquitos com 2 dias após emergência.

Figura 3: Produtos de PCR do gene 16S rRNA de intestinos de mosquitos com 2 dias pós-emergência, em triplicata – Pool1 (Imagem: ladder editado)



L: ladder; D1, D2 e D3-triplicata de 10 mosquitos de 2 dias extraídos em ATL por maceração (pool1); DP-controle positivo da triplicata (D1, D2 e D3); DN-controle negativo da triplicata (D1, D2 e D3).

Figura 4: Produtos de PCR do gene 16S rRNA de intestinos de mosquitos com 2 dias pós-emersão, em triplicata – Pool2



L: ladder; E1, E2 e E3-triplicata de 10 mosquitos de 2 dias extraídos em ATL por maceração (pool2); EN- controle negativo da triplicata (E1, E2 e E3); EP-controle positivo da triplicata (E1, E2 e E3).

#### 4. 3. 2. Quantificação das amostras por Real-Time.

Os valores da quantificação em *Real-Time* das amostras de mosquitos com 2 dias de emersão são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 5: Valores da quantificação por Real-Time das amostras de intestinos de mosquitos com 2 dias de emersão	
Amostra	Quantificação
D	11, 572
E	9,973

#### 4. 3. 3. Sequenciamento Illumina da microbiota intestinal de mosquitos com 2 dias de emersão.

##### 4. 3. 3. 1. Quantidade de reads

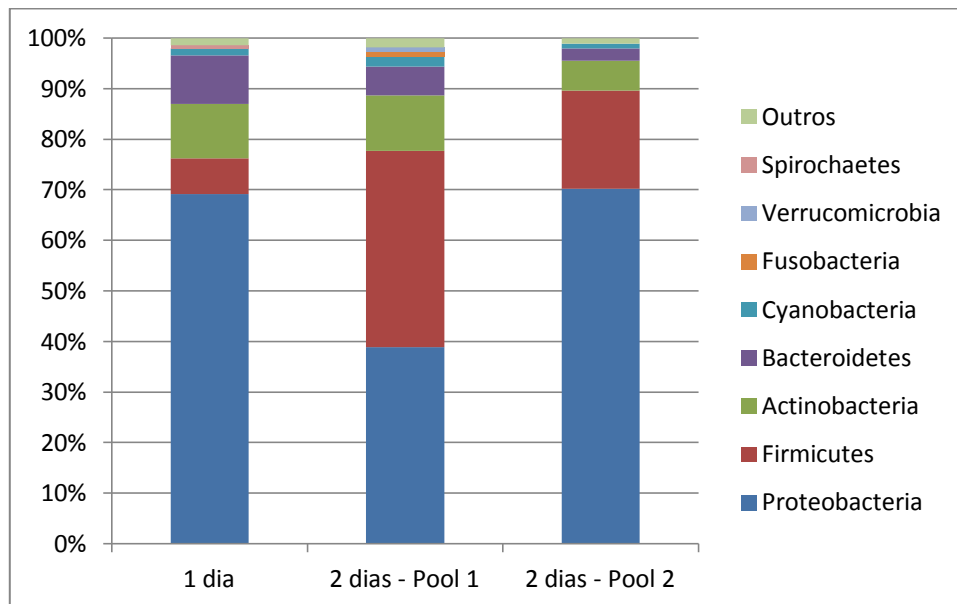
A quantidade total de reads geradas pelo sequenciamento é apresentada na tabela seguinte:

Tabela 6: Quantidade de <i>reads</i> geradas por amostra de microbiota de 2 dias	
Amostra	Reads
D	1723
E	3756

#### 4.3.3.2. Diversidade bacteriana

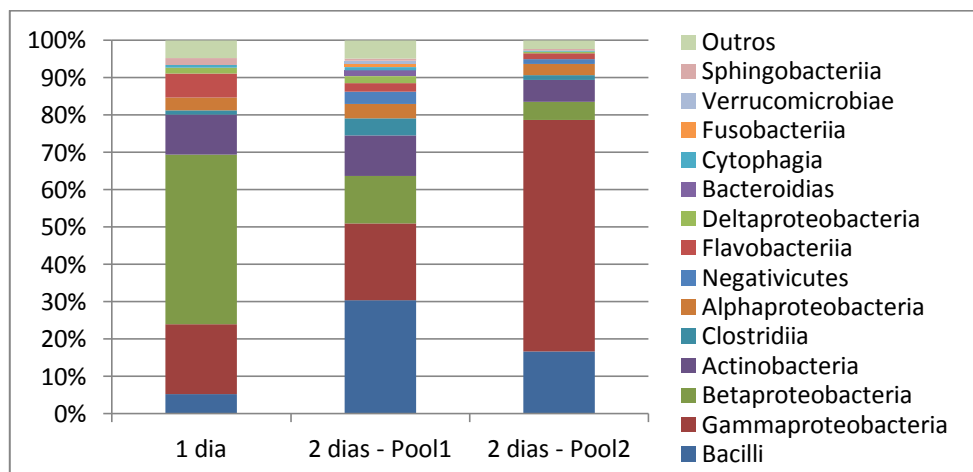
Foi observado que após 2 dias de emergência ainda existe uma predominância de Proteobacterias no intestino médio dos mosquitos. No entanto, é notável um aumento no número de bacterias de Filo Firmicutes.

Gráfico 3: Diversidade bacteriana apresentada em Filos, com comparação da microbiota intestinal de mosquitos de 1 e 2 dias pós-emersão.



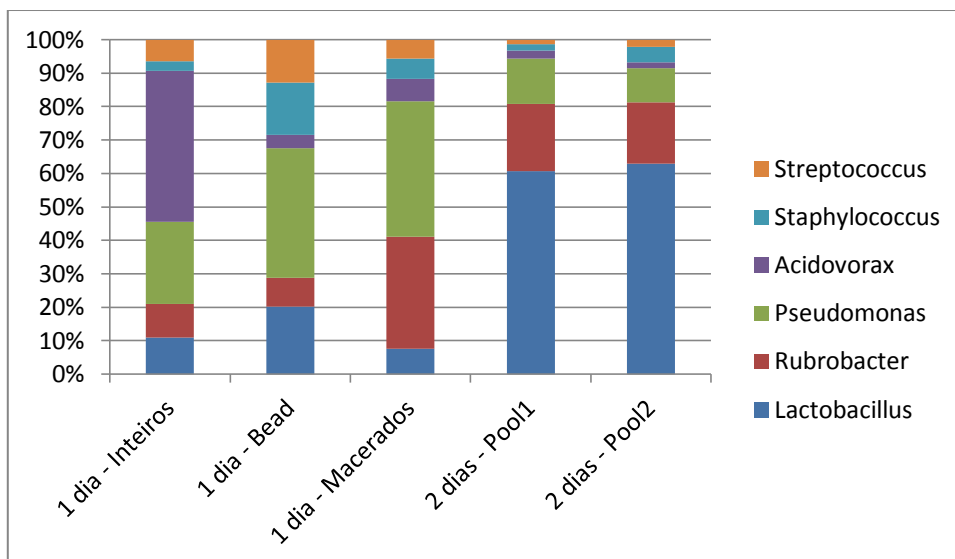
Em relação às Classes, houve um grande aumento de bacterias Gammaproteobacteria, ao mesmo tempo em a quantidade de Betaproteobacteria diminui drasticamente.

Gráfico 4: Diversidade bacteriana apresentada em Classes, com comparação da microbiota intestinal de mosquitos de 1 e 2 dias pós-emersão.



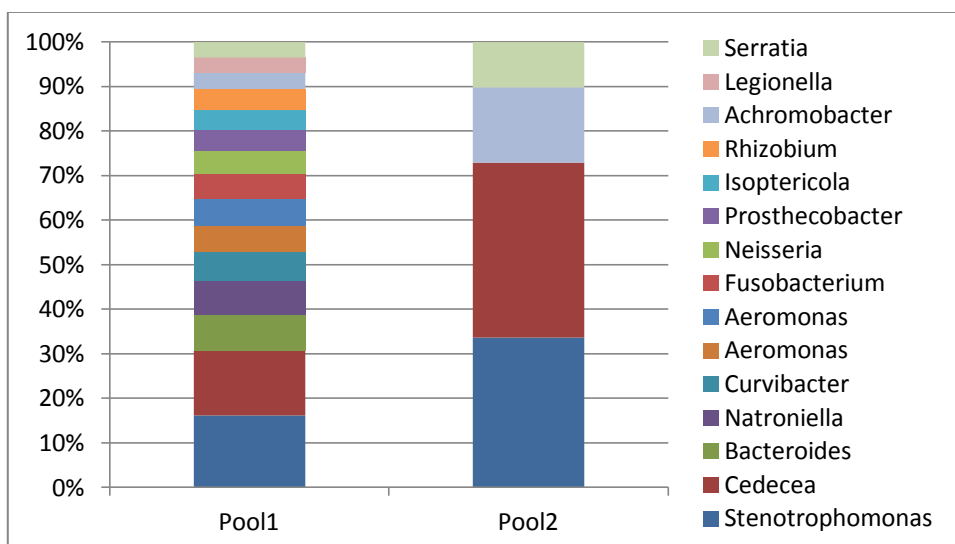
Entre todos os gêneros que apareceram nas amostras, apenas seis deles aparecem em todas elas. No gráfico 5 são apresentados os gêneros presentes nas cinco amostras e a quantidade correspondente de cada um. Foi observado que bactérias do gênero *Lactobacillus* têm um aumento notável entre o primeiro e segundo dias pós-emersão, enquanto que há diminuição do gênero *Pseudomonas*.

Gráfico 5: Bactérias divididas por gênero que aparecem nas 5 amostras



Por fim, 15 gêneros de bactérias foram encontrados a mais nas amostras de microbiota intestinal de 2 dias, e são apresentados no gráfico a seguir:

Gráfico 6: Bactérias presentes nas amostras com 2 dias de emersão que não apareceram nas amostras de 1 dia de emersão.





Até o momento, estudos que comparam a diversidade microbiana durante os estágios da vida de mosquitos só foram realizadas em *Anopheles sp.* Neste trabalho, foi observada uma grande variação de bactérias, sendo a predominância aqui encontrada similar a de mosquitos *Anopheles*. Em estudo da diversidade microbiana intestinal durante os estágios de vida do mosquito *Anopheles*, nos primeiros dias de fase adulta é observada a predominância dos Filos Proteobacteria, Actinobacterias e Firmicutes, com um progressivo aumento de Bacteroidetes (Wang *et al*, 2011). Essas informações se assemelham aos dados aqui encontrados, que mostram a prevalência de Proteobacteria, Actinobacterias e Firmicutes no primeiro dia pós-emersão dos mosquitos, mas diferem durante o envelhecimento do mosquito, em que não foi observado o aumento de Bacteroidetes, mas sim de Firmicutes. Isso mostra que embora haja um alto nível de semelhança entre a microbiota de mosquitos *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* a dinâmica dessas bactérias não é a mesma.

A influência que a microbiota intestinal exerce na capacidade vetorial dos mosquitos têm sido o grande foco das pesquisas em paratransgenese como solução para doenças transmitidas por vetores. Em *Anopheles*, a presença de Enterobacterias é relacionada a maior taxa de infecção do inseto por *Plasmodium sp.* (Boissiere *et al*, 2012), ao passo que a microbiota natural do mosquito já foi associada a modulação da atividade anti-plasmodium (Dong *et al*, 2009). Os mosquitos estudados neste trabalho são de Botucatu-SP, e foram mantidos em laboratório, em condições estéreis. Mesmo assim, há uma grande diferença de gêneros de bactérias quando comparadas às encontradas por (Gusmão *et al*, 2010) em amostras Rockfeller, em que os principais gêneros identificados foram *Serratia*, *Klebsiella*, *Asaia*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Kluyvera* and *Pantoea*. Esta informações confirmam que a composição bacteriana encontrada varia de um mosquito para outro por influência de diversos fatores, entre eles a localidade dos mosquitos. Dessa forma, o desenvolvimento de mais estudos comparando a microbiota de mosquitos de regiões onde a situação de Dengue é ou não epidêmica é de interesse para o esclarecimento da dinâmica bacteriana interferindo na capacidade vetorial do mosquito.

## 5. CONCLUSÃO

Como apresentado no trabalho, existe uma predominância de Proteobacterias nos estagio iniciais da fase adulta do mosquito *Aedes aegypti*, assim como em Anopheles, embora não se possa dizer que a dinâmica da composição da microbiota intestinal dos dois organismos ocorra da mesma forma. Assim, mais estudos com *Ae. aegypti* são necessários para elucidar como a microbiota intestinal do mosquito pode influenciar a transmissão de vírus causadores de Dengue.

## 6. BIBLIOGRAFIA

BAHTT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.

BOISSIÈRE, A. *et al.* Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. **Plos Pathog.**, v. 8, p. 1-12, 2012.

CAPORASO, J. *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

CHERRY, S.; PERRIMON, N. Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. **Nat. Immunol.**, n. 1, v. 5, p. 81-87, 2004.

CIRIMOTICH, C. M. *et al.* Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. **Cell Host Microbe**, v. 10, p. 307-310, 2012.

COLEMAN, J. *et al.* Dissection of Midgut and Salivary Glands from *Ae. aegypti* Mosquitoes. **J. Vis. Exp.** v. 5, 2007.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 225p, 1994.

CROTTI, E. *et al.* *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. **Environ Microbiol.**, v. 11, p. 3252-3264, 2009.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 71-92, 2004

DONG, Y. *et al.* The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate Toll and JAK-STAT pathway controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol. Biol.**, v. 42, p. 126-132, 2012.

DONG, Y. *et al.* Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **Plos Pathog.**, v. 5, p. 1-10, 2009.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **An. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 1-19, 1992.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCACIA, R. (Orgs.) **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1966. p.345-358.

GUBLER, D.J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.3, p.442-450, 1998.

GUSMÃO, D. S., *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta Tropica.**, v. 115, p. 275-281, 2010.

- JOYCE, J. D. *et al.* Interactions between La Crosse Virus and Bacteria Isolated from the Digestive Tract of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). **J Med Entomol.**, v. 48, p. 389-394, 2011.
- LINDH, J. M. *et al.* Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. **Acta Tropica.**, v. 107, p. 242-250, 2008
- MINARD, G. *et al.* Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. **Parasit Vectors.**, v. 146, p. 1-12, 2013.
- NEVES, D. P. Culicidae. In: \_\_. **Parasitologia Dinâmica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2009. cap. 52, p. 485-486.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A. *et al.* Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 67, p. 2773-2786, 2010
- SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol.** v.30, p.7-9, 2007.
- SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 56, 2010.
- STOECK, T. *et al.* Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. **BMC Biol.**, v. 7, 2009.
- WANG, Y. *et al.* Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **Plos One**, v. 6, p.1-9, 2011.
- WEISS, B. L. *et al.* Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. **Plos Biol.**, v. 9, p. 1-12, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record**. n.8, p. 65-72, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases**. França, p. 138, 2013.
- XI, Z. *et al.* The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. **Plos Pathog.**, v. 4, p. 1-12, 2008.
- XU, J.; CHERRY, S. Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. **Dev. Comp. Immunol.**
- ZOUACHE, K. *et al.* *Chikungunya* virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. **Mol Ecol.**, v. 21, p. 2297-2309, 2012.