



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
Campus de Botucatu



**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL
DE POPULAÇÕES NATURAIS DO MOSQUITO *AEDES
AEGYPTI***

Jaqueline Jarusevicius

BOTUCATU – SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL
DE POPULAÇÕES NATURAIS DO MOSQUITO *Aedes*
*Aegypti***

Candidato: Jaqueline Jarusevicius

Orientador: Profº Dr. Jayme Augusto de Sousa-Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós- Graduação
em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Jarusevicius, Jaqueline.

Avaliação da diversidade microbiana intestinal de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* / Jaqueline Jarusevicius. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Jayme Augusto de Souza-Neto
Capes: 20100000

1. *Aedes aegypti*. 2. Microbiota. 3. Doenças - transmissão.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Microbiota intestinal; Transmissão vertical.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de bolsa e financiamento do projeto.

Ao **Profº Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto**, da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP Botucatu, pela orientação, compreensão, direcionamentos e confiança depositada.

Aos membros do **Laboratório de Genômica Funcional e Microbiologia de Vetores (Vectomics)**, pelo companheirismo e apoio.

À **Secretaria de Saúde de Botucatu**, pela parceria na realização de coletas.

Ao **Profº Dr. Kamil Erguler**, do The Cypre Institute, pelo auxílio nas análises de bioinformática.

Ao **Profº George K. Christophides**, da Imperial College London, pelas observações feitas.

À **Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biotecnologia de Botucatu**, onde este trabalho foi desenvolvido.

Avaliação da Diversidade Microbiana Intestinal de Populações Naturais do Mosquito *Aedes Aegypti*

Resumo

Aedes aegypti (*Ae. aegypti*) é o principal vetor de dengue e é também responsável por transmitir outras arboviroses de importância em saúde pública, como as febres zika e chikungunya. Devido a falhas no controle da transmissão destas arboviroses, que tem como base a eliminação do mosquito vetor, o Brasil é um país endêmico para a dengue e a cada ano nos deparamos com epidemias cada vez mais graves. Ao se alimentar de sangue humano infectado o primeiro local de interação do vírus com o organismo do mosquito é o intestino. Além das respostas imunológicas antivirais para conter a infecção, neste ambiente também está presente a microbiota intestinal do mosquito, um importante modulador na infecção de patógenos. Compreender como a microbiota intestinal de mosquitos é definida e se modifica em uma determinada população é de grande interesse uma vez que isso pode elucidar a relação entre mosquitos e seus organismos simbiotes, e consequentemente auxiliar em processos de paratransgênese. A principal forma de aquisição das bactérias intestinais é através do contato com o ambiente, mas outros mecanismos como transmissão transtadial e vertical também devem influenciar no estabelecimento da microbiota intestinal. Neste estudo, nós analisamos a composição da microbiota intestinal de mosquitos *Ae. aegypti* de uma população de campo, coletados na cidade de Botucatu, SP, através do sequenciamento em larga escala da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA, e acompanhamos como esta composição é alterada durante colonização em insetário. Nossos resultados revelaram uma transição da composição da microbiota intestinal, principalmente pela diminuição progressiva da diversidade de bactérias como efeito da colonização. Os gêneros mais abundantes encontrados, como *Pantoea*, *Burkholderia* e *Enterobacter*, permaneceram em proporções similares ao longo destas gerações. Estes dados sugerem que existe transmissão de bactérias entre as gerações e que o ambiente intestinal possui mecanismos para manter a composição original de sua microbiota.

Palavras-chave: Microbiota intestinal; *Aedes aegypti*; transmissão vertical.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	5
1.1. <i>Aedes aegypti</i> e a necessidade de controle da transmissão de arboviroses.....	5
1.2. Interação vírus-vetor.....	8
1.3. Microbiota intestinal de <i>Ae. aegypti</i> e competência vetorial.....	11
1.4. Composição da microbiota intestinal.....	14
2. Objetivos.....	17
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Coleta de larvas de campo e obtenção de sucessivas gerações.....	17
3.2. Dissecção dos intestinos de <i>Ae. aegypti</i> adulto.....	19
3.3. Preparo das bibliotecas.....	19
3.4. Purificação de DNA.....	20
3.5. Quantificação do produto de PCR purificado.....	21
3.6. Preparo do cartucho de sequenciamento Illumina.....	21
3.7. Sequenciamento Illumina e Processamento das sequencias.....	21
3.8. Análises estatísticas.....	22
4. Resultados.....	23
4.1. Diversidade da microbiota intestinal de uma população de campo de <i>Aedes aegypti</i> e suas sucessivas gerações.....	23
4.2. Efeito da colonização na diversidade bacteriana.....	28
4.3. Oscilações na abundância de bactérias.....	31
4.4. Microbioma compartilhado.....	33
5. Discussão.....	35
A – Material Suplementar.....	39
B – Referências Bibliográficas.....	48

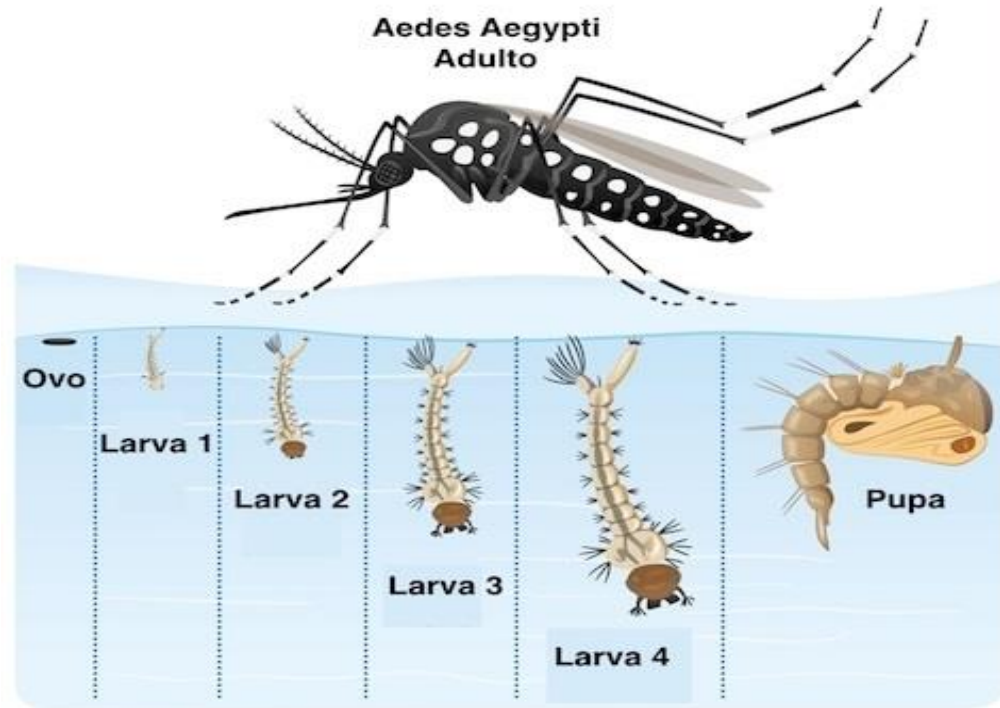
1. Introdução

1.1. *Aedes aegypti* e a necessidade de controle da transmissão de arboviroses

Aedes aegypti (*Ae. aegypti*) é o principal agente vetor na disseminação de dengue e é também responsável por transmitir outras arboviroses (doenças virais transmitidas por artrópodes) de importância em saúde pública, como as febres amarela, zika e chikungunya. É um inseto pertencente à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Linnaeus, 1762). Sua ancestralidade indica que foi originado da África subsaariana e sua introdução no continente americano ocorreu através de ovos depositados em containers de água em navios que faziam o trajeto África-Europa-América no período de colonização (POWEL e TABACHNICK, 2013). A capacidade de adaptação a ambientes modificados pelo homem e o clima marcado por chuvas e altas temperaturas facilitaram a dispersão deste mosquito por todas as regiões tropicais e subtropicais (DYE, 1992), e devido às alterações climáticas e ambientais hoje já se tem registros da presença desta espécie em territórios em que era até então ausente, como nos Estados Unidos da América e em alguns países da Europa (SCHAFFNER et al., 2013; FREDERICKS et al., 2014).

O desenvolvimento do *Ae. aegypti* compreende quatro estádios: ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 1). A ovoposição pode ocorrer em até 10 criadouros diferentes, com uma variação de 1 a 50 ovos por criadouro e a escolha do substrato de ovoposição é influenciada por alguns fatores como pouca claridade, umidade e presença de larvas (REY e O'CONNELL, 2014). Os criadouros são recipientes domiciliares e peridomiciliares, como vasilhas, caixas d'água e pneus. Os ovos são postos isoladamente no 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 inseto (FIGUEIREDO e FONSECA, 1966). O crescimento e o desenvolvimento das larvas para o estágio de pupa variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/> (acessado em 13/06/18)

Para a complementação do ciclo de vida do *Ae. aegypti* as fêmeas fecundadas se alimentam de sangue, pois as proteínas sanguíneas são necessárias na maturação dos ovos e para o fitness reprodutivo do mosquito (TAKKEN e VERHULST, 2013). A hematofagia antropofílica é um fator essencial para a disseminação das doenças causadas pelo mosquito, pois é neste momento que ocorre o contato entre vírus e vetor. Voos rápidos, escapes durante o repasto sanguíneo a qualquer movimento do hospedeiro e a alternância entre hospedeiros são características favoráveis à sobrevivência do mosquito e que conferem uma melhor eficiência na disseminação de patógenos pelo mosquito está infectado (NEVES, 2009).

Dengue é uma doença infecciosa transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) e causada pelo vírus dengue (DENV). É classificada como uma doença tropical negligenciada e possui grande importância no cenário global por expor cerca de 3,9 bilhões de pessoas ao risco de infecção (BRADY et al., 2012). Mais de 100 países são endêmicos para dengue com registros de 390 milhões de casos que ocorrem no

mundo, dos quais apenas 96 milhões apresentam manifestações clínicas da infecção (BHATT et al., 2013).

O controle da transmissão de dengue tem como base a eliminação do mosquito vetor envolvendo principalmente o uso de larvicidas, como temefós, e inseticidas organofosforados, como malationa e fenitrotona, e inseticidas piretróides (KANTOR, 2016). No entanto esta prática acaba selecionando mosquitos resistentes a estes inseticidas, o que torna necessário outras estratégias de controle vetorial. Um exemplo de controle alternativo é o controle biológico pelo uso da bactéria *Wolbachia*, uma bactéria intracelular que tem capacidade de bloquear a transmissão de dengue. Nesta técnica a bactéria é microinjetada em embriões de *Ae. aegypti*, e uma vez estabelecida é transferida para a próxima linhagem, sendo que as fêmeas que não apresentem esta bactéria se tornam incapazes de gerar ovos viáveis, por conta de um fenômeno conhecido como incompatibilidade citoplasmática (ORMAETXE et al., 2011). O controle genético também é outra opção para se evitar a transmissão de arboviroses. Por este método são criados mosquitos geneticamente modificados que diminuem a circulação de mosquitos através, por exemplo, de esterilização de machos ou desenvolvendo mosquitos refratários ao parasita (ALPHEY et al., 2013).

Recentemente foi criada a primeira vacina tetravalente de dengue (*yellow fever - 17D-dengue vírus – CYD-TDV; Dengvaxia®*, Sanofi Pasteur), que embora liberada apenas em poucos países e com custos elevados, é um fator com grande potencial para contribuir no controle da disseminação de dengue. Sua eficiência, no entanto, difere quanto aos quatro sorotipos do vírus dengue e varia em relação à idade e ao histórico de infecções anteriores do indivíduo a ser vacinado (PITISUTTITHUM e BOUCKENOOGHE, 2016). No Brasil, ela foi liberada em 28 de dezembro de 2015, mas ainda não é fornecida pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), e em 2017, a Anvisa divulgou um comunicado recomendando que indivíduos soronegativos para dengue não sejam imunizados com a Dengvaxia até que mais estudos sobre sua eficiência sejam realizados (ANVISA, 2017).

Devido à falta de políticas públicas e educacionais e a forte adaptação do vetor a ambientes urbanos, os casos de arboviroses são cada vez mais frequentes o que torna Brasil um país endêmico para a dengue, e com frequentes epidemias de outras arboviroses. Em 2014 o Brasil passou por uma intensa epidemia de dengue, e houve o aparecimento dos primeiros casos autóctones de febre chikungunya (SVS, 2014). Somado a este quadro, em 2015, além de cerca de 1,5 milhões de casos notificados de dengue e 17,5 mil de febre chikungunya, o vírus zika (ZIKV) também foi introduzido no país (SVS, 2015). As semelhanças entre dengue e

febre zika são grandes, mas esta última ganhou destaque na saúde pública devido a evidências de sua atuação no sistema nervoso (CALVET et al., 2016). De acordo com a análise das cepas de vírus isolados do Brasil foi possível verificar que ZIKV é capaz de ultrapassar a placenta e causar microcefalia ao infectar a células progenitoras do córtex e induzir a morte celular por apoptose e autofagia, debilitando o neurodesenvolvimento do embrião de camundongos (CUGOLA et al., 2016).

Através de análises dos genomas de vírus zika coletados durante o surto de 2015 foi verificada que a incidência do vírus no país ocorreu através das ilhas do Pacífico onde foram relatadas epidemias entre 2013-2014 (FARIA et al., 2016; MUSSO et al., 2014), e desde o aparecimento do primeiro caso confirmado no país de Março de 2015 (ZANLUCA et al., 2015) os países da América Latina e Central foram sucessivamente confirmando os primeiros casos da doença em seus territórios (PAHO, 2016). Em um período menor que um ano o vírus zika foi disseminado por todo um continente, de forma mais agressiva do que antes relatado sobre a dispersão de dengue e chikungunya.

No período de monitoramento de febre amarela 2016-2017 foi registrada a dispersão do vírus pela costa leste brasileira, onde já não era registrado há décadas, confirmando 777 casos da doença com 261 óbitos (Ministério da Saúde, 2017). Segundo o boletim epidemiológico mais recente, o ano de 2018 já contabiliza no Brasil 42329 casos confirmados de dengue, 19371 de febre chikungunya e 1084 de febre pelo vírus zika (SVS, 2018), além de estar em um período de surto de febre amarela, com 1266 casos confirmados e 415 óbitos registrados, desde Julho de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

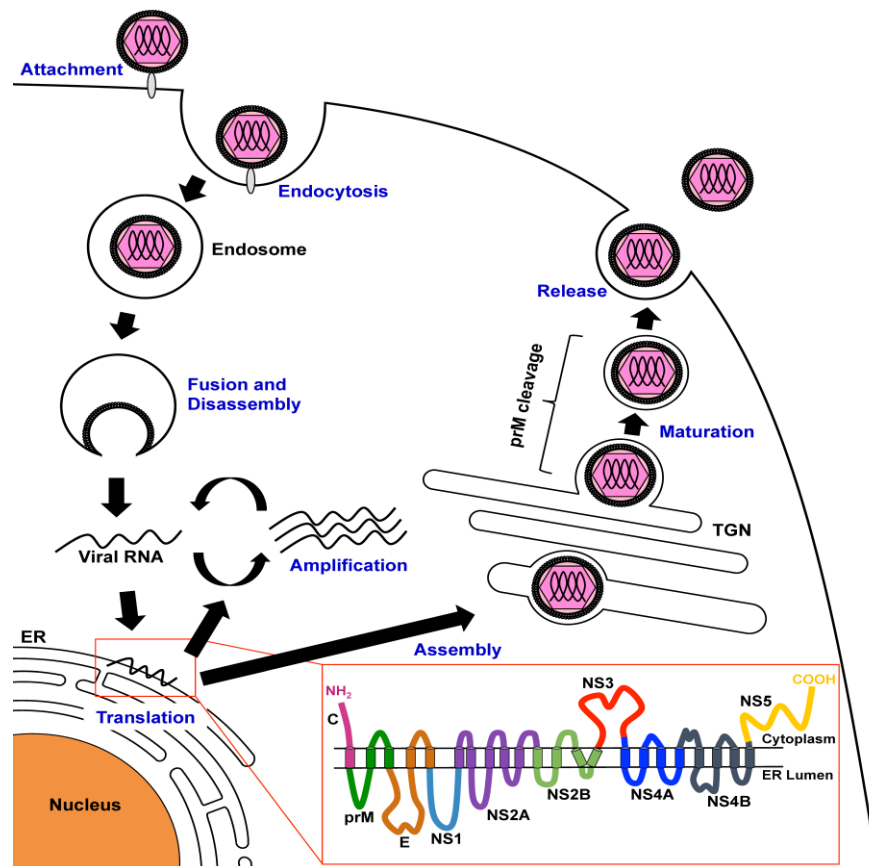
As consequências do aparecimento frequente destas arboviroses no país refletem em aspectos econômicos, devido aos gastos envolvidos no controle da transmissão e no atendimento a pacientes infectados (MARTELLI et al., 2015), sociais, ao causar altas taxas de morbidade e mortalidade na população (GUBLER, 2002), e ambientais, pelo efeito dos químicos utilizados no controle vetorial (DAVID et al., 2013). Todas estas evidências enfatizam a necessidade da criação de novas medidas para conter a dispersão destas doenças.

1.2. Interação vírus-vetor

As arboviroses anteriormente mencionadas são causadas por vírus da família Flaviviridae e gênero Flavivirus (dengue – DENV; zika – ZIKV; febre amarela - YFV), a

exceção de chikungunya (CHIKV), da família *Togaviridae*, embora ambas as famílias possuam um genoma composto de RNA fita simples positiva. Quando *Ae. aegypti* se alimenta de sangue humano infectado com estes vírus o primeiro local de interação do patógeno com o organismo do mosquito é o intestino. As partículas virais infectam o epitélio do intestino médio, pelo mecanismo de endocitose mediada por clatrina, e iniciam sua replicação (CHERRY & PERRIMON, 2004). O baixo pH do endossomo formado 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 as proteínas estruturais E (envelope), C (capsídeo) e N (nucleocapsídeo), responsáveis pela montagem dos vírus, e as proteínas não estruturais (NS), que atuam na replicação do RNA viral. O material genético é então replicado e encapsulado em uma estrutura viral, competente para romper a célula em que se encontra e infectar outras, repetindo o processo de replicação (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010) (Figura 2).

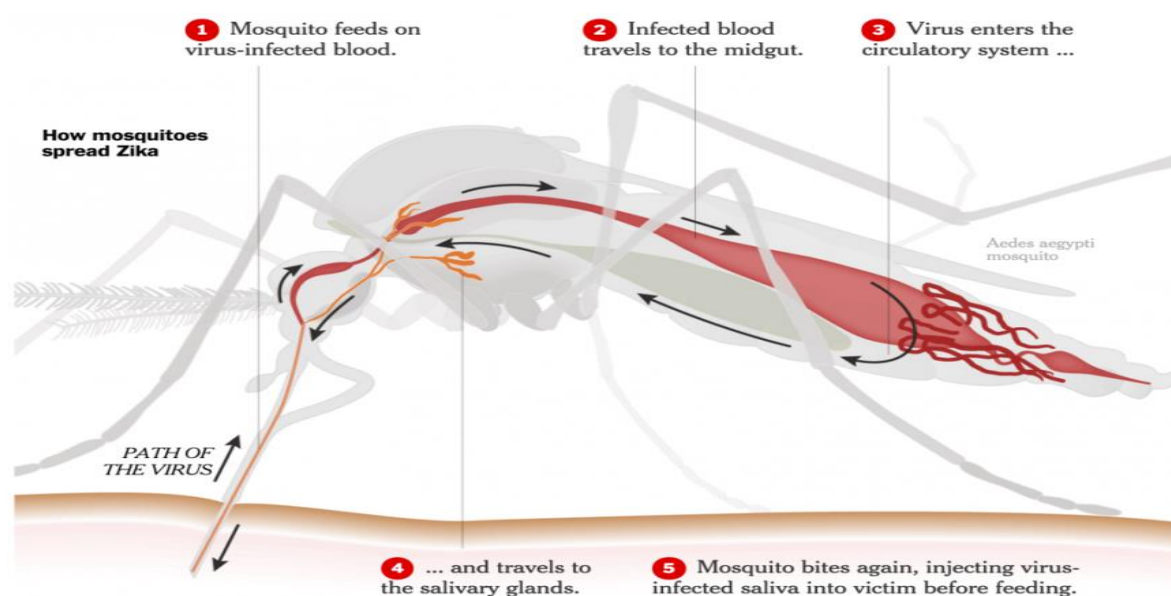
Figura 2. Ciclo de vida de Flavivirus



Fonte: KATO e HISHIKI, 2016.

Após a alimentação com sangue infectado o primeiro local de interação do vírus com o vetor é o intestino, onde ocorre a infecção das células epiteliais. Em cerca de 7 dias pós-infecção (dpi) é atingido o pico máximo de vírus no intestino. O vírus atinge a hemolinfa (sistema de circulação de insetos) e se espalha para outros órgãos do vetor. Ao infectar as glândulas salivares os vírus já podem ser transmitidos para outros indivíduos a cada picada do inseto (Figura 4). Em alguns casos, as glândulas salivares podem ser infectadas com 3 dpi, embora normalmente a concentração máxima nestes órgãos ocorra de 12 a 18 dpi (SALAZAR et al., 2007). Uma vez infectado, o mosquito pode transmitir vírus pelo resto da vida (CHENG et al., 2016).

Figura 3. Disseminação de ZIKV no organismo de *Ae. aegypti*.



Fonte: <https://impakter.com/zika-virus-highlights-flaws-in-public-health-approaches-in-the-americas-part-1/> (acessado em 13/06/18)

A transmissão do DENV pelo mosquito vetor está diretamente relacionada à competência vetorial, que é definida como a permissividade do vetor à infecção, replicação e transmissão de um determinado patógeno (BENNETT et al., 2002). A competência vetorial é determinada por diversos fatores genéticos e ambientais, portanto, diferentes populações de mosquitos normalmente apresentam diferentes níveis de competência vetorial. Os fatores ambientais que influenciam a competência vetorial estão relacionados aos determinantes do período extrínseco de incubação (*extrinsic incubation period* - EIP) do vírus no mosquito, como temperatura, nutrição larval e dose de vírus infectivo (BLACK et al., 2002). Entre os

fatores genéticos destacam-se as barreiras fisiológicas do inseto que remetem a cada região no organismo do inseto com capacidade de conter a infecção viral. Elas são classificadas em barreira de infecção do intestino (*midgut infection barrier* - MIB), barreira de escape do intestino (*midgut escape barrier* – MEB) e barreira de transmissão (*transmission barrier* – TB) (BLACK et al., 2002), e atuam em conjunto com a imunidade do mosquito, também determinada por fatores genéticos. Os níveis basais da imunidade do inseto, por exemplo, influenciam diretamente em sua competência vetorial, uma vez que ao analisar a expressão gênica de cepas de mosquitos refratárias ao vírus dengue é observada uma maior quantidade de transcritos relacionados à imunidade do que em cepas com altas taxas de infecção (SIM et al., 2013).

Através de silenciamento de reguladores das vias imunes é possível verificar que Toll e JAK-STAT são as principais vias de atividade anti-DENV (XI; RAMIREZ e DIMOPOULOS, 2008; SOUZA-NETO et al., 2009). No entanto, ainda são poucos os estudos que esclarecem como atuam os mecanismos destas vias em respostas ao vírus e quais os principais efetores que resultam na diminuição da susceptibilidade de *Ae. aegypti* ao DENV. Além da imunidade, a microbiota intestinal também exerce um papel nesta dinâmica de infecção, representando mais um fator a ser estudado para se compreender como se estabelecem as respostas à presença de arbovírus e como a competência vetorial pode ser modificada.

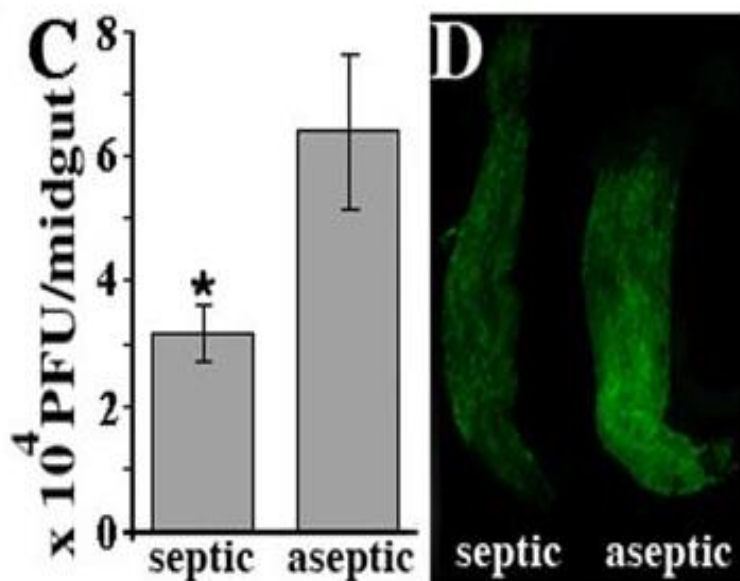
1.3. Microbiota intestinal de *Ae. aegypti* e competência vetorial

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 grande diversidade de colônias bacterianas (DILLON E DILLON, 2004) que são responsáveis por auxiliar na nutrição, desenvolvimento e reprodução, além de oferecer proteção contra patógenos, modular respostas imunes e a comunicação com outros insetos (MINARD et al., 2013; COON et al., 2014; ENGEL & MORAN, 2013).

A função de proteção contra patógenos vem sendo cada vez mais estudada por ser um fator diretamente relacionado à competência vetorial de alguns insetos (HEDGE et al., 2015). O fornecimento de antibiótico na alimentação de mosquitos adultos para eliminar sua

microbiota intestinal resulta no aumento de parasitas neste ambiente, como o aumento de oocistos de *Plasmodium spp.* e de DENV2 em *Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti*, respectivamente, ao serem alimentados com sangue infectado (DONG et al., 2009; (XI; RAMIREZ e DIMOPOULOS, 2008) (Figura 3). Estes estudos mostram que ao reduzir a diversidade de bactérias intestinais os mosquitos se tornam mais suscetíveis a infecções. No entanto, algumas bactérias específicas já têm sido correlacionadas com um efeito direto na competência vetorial. É o caso, de *Enterobacter sp. (Esp_Z)* em *Anopheles gambiae* e de *Chromobacterium (Csp_P)* em *Ae. argypti*, que reduzem significativamente a suscetibilidade às infecções de *Plasmodium falciparum (P. falciparum)* e DENV, respectivamente (CIRIMOTICH et al., 2011; RAMIREZ et al., 2014). O aumento da suscetibilidade também é observado sendo resultado da presença de bactérias específicas, como a bactéria *Serratia odorífera* que bloqueia *proibitina* e leva ao aumento de DENV2 em *Ae. aegypti* (APTE et al., 2010).

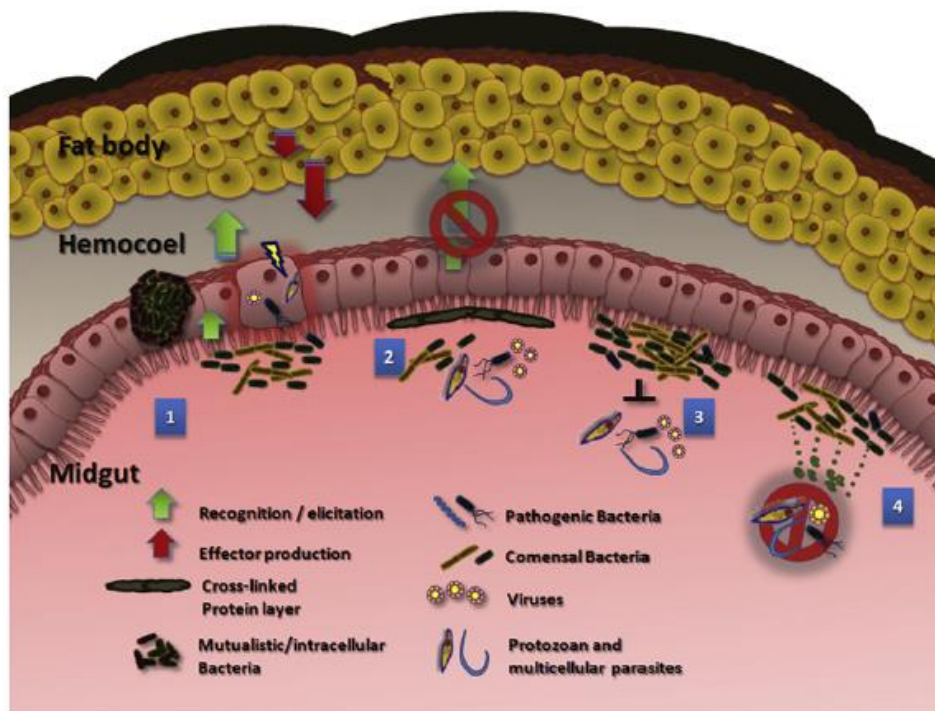
Figura 4. Taxa de infecção modulada pela presença da microbiota intestinal. C – Resultado da infecção de mosquitos *Ae. aegypti* com vírus DENV-2, mostrando a maior taxa de infecção em mosquitos tratados com antibiótico (*aseptic*). D – Intestinos com microbiota normal (*septic*) e tratados com antibiótico, infetados com DENV-2, demonstrado por imunofluorescência invertida mais partículas viral em mosquitos tratados com antibiótico.



Fonte: XI; RAMIREZ e DIMOPOULOS, 2008.

Um dos mecanismos que fazem a microbiota intestinal influenciar a competência vetorial é a ação direta de bactérias contra o patógeno. Competições pelo ambiente intestinal compartilhado com outras bactérias e parasitas, a produção de moléculas com potencial antiparasitário durante o ciclo normal de desenvolvimento das bactérias e a barreira física formada pela alta quantidade de bactérias, são os fatores atribuídos à modulação direta da infectividade dos patógenos (Cirimotich et al., 2011, Ramirez 2014) (Figura 5).

Figura 5. Interferências diretas e indiretas da microbiota intestinal na competência vetorial de mosquitos. 1 – Microbiota intestinal estimula a atividade imune antibacteriana, que também responde contra patógenos; 2 – Barreira física de proteínas que impede resposta imune exacerbada contra a microbiota; 3 – Barreira física de bactérias que reduz o contato do parasita com o epitélio intestinal; 4 – Moléculas secretadas pela microbiota intestinal que agem diretamente no patógeno.



Fonte: CIRIMOTICH et al., 2011.

O outro mecanismo pelo qual a microbiota intestinal pode alterar a suscetibilidade do mosquito à infecção de patógenos é indireto, devido à ativação de respostas imunes do vetor, que são mantidas em níveis basais, para o controle da proliferação das bactérias entéricas (RAMIREZ et al., 2012) (Figura 5). A via Toll, por exemplo, é ativada pela

microbiota de *Ae. aegypti*, e, como mencionado anteriormente, esta via está associada com a resposta anti-dengue (XI; RAMIREZ e DIMOPOULOS, 2008). Dados gerados através de microarranjos de DNA revelaram uma sobreposição na ativação de genes do sistema imune inato de *An. gambiae* submetidos a uma infecção bacteriana sistêmica ou infecção oral com *Plasmodium*. Alguns destes genes codificam moléculas efetoras que protegem o mosquito especificamente contra bactérias, ao passo que outros apresentam dupla função: antibacteriana e anti-*Plasmodium* (DONG et al., 2009).

Assim, existe um compartilhamento entre as repostas imunes inatas induzidas por bactérias e parasitas em vetores de doenças. Elucidar quais são estes compostos produzidos em respostas cruzadas de bactérias e parasitas será um grande avanço na aplicação de paratransgenese. Esta técnica consiste em modificar geneticamente um organismo simbiote, para que este produza fatores antiparasitários ou antivirais, e então reintroduzi-lo no organismo hospedeiro a fim de diminuir sua competência vetorial (CHAVSHIN et al., 2014). No entanto, um dos principais requisitos na paratransgênese é a identificação de bactérias bem estabelecidas no organismo a ser modificado e que possam ser transmitidas para as gerações seguintes (WILKE e MARRELLI, 2015).

1.4. Composição da microbiota intestinal

A microbiota tem importância desde a fase larval de desenvolvimento de mosquitos. Larvas desenvolvidas por um rígido protocolo de esterilização (axênicas – sem microbiota), por exemplo, não conseguem atingir os estágios seguintes de desenvolvimento (COON et al., 2014). Além disso, as situações a que as larvas são expostas podem refletir em consequências na vida do adulto (DE BLOCK et al., 2005; CREAN et al., 2011). Foi observado que a exposição larval a determinados tipos de bactérias pode reduzir a competência vetorial do inseto adulto, como a presença de bactérias do gênero *Enterobacter* na composição da microbiota intestinal de larvas de *Ae. aegypti* (DICKSON et al., 2017).

A composição da microbiota depende de alguns fatores, como o sexo do inseto, o local do organismo, estágio de desenvolvimento e os ambientes de interação do mosquito (MINARD et al., 2013). No intestino, é levado em consideração a condição físico-química dos seus diferentes compartimentos, os recursos disponíveis para aquisição de bactérias e a capacidade de transmissão de bactérias de uma geração para outra (ENGEL & MORAN 2013).

A diferença de maior destaque entre macho e fêmeas é a alimentação sanguínea, que por si só é um fator que altera a comunidade presente no intestino. Após a alimentação sanguínea, a microbiota intestinal do mosquito passa por mudanças acentuadas com a redução da diversidade e aumento da carga bacteriana (WANG et al., 2011; COON et al., 2014). Esta dinâmica ocorre por conta da síntese da matriz peritrófica (MP), que limita famílias bacterianas específicas no espaço ectoperitrófico, devido à afinidade destas bactérias com a MP ou com as células epiteliais do intestino. Nos dias seguintes da alimentação a MP vai sendo eliminada do inseto, levando junto a maior parte das bactérias, responsáveis pela diversidade no ambiente intestinal (RODGERS et al., 2017).

Assim como as bactérias influenciam a infecção de patógenos a presença destes no intestino também influencia na composição da microbiota local. O termo biomarcadores de infecção já está sendo utilizado para se referir às bactérias que tipicamente aparecem na presença de alguns patógenos, como as bactérias das famílias de Rhodobacteraceae e Desulfuromonadaceae que aparecem em infecções de ZIKV (VILLEGAS et al, 2018). Em *Ae. aegypti*, a família Enterobacteriaceae é destacada durante infecções de CHIKV por ser encontrada em maiores proporções, enquanto a presença de outros microorganismos endossimbiontes, como *Blattabacterium sp.*, é diminuída (ZOUACHE et al., 2012). As Enterobacteriaceae também são observadas em quantidades acentuadas em Anopheles parasitados por *P. falciparum* (BOISSIÈRE et al., 2012). A presença de DENV também causa uma notável redução no número total de bactérias do intestino do mosquito (RAMIREZ et al., 2012). Todavia, não se sabe, ainda, se o vírus é capaz de provocar apenas alterações na composição da microbiota intestinal, ou se, mais especificamente, na abundância relativa de bactérias anti-DENV.

Embora ainda não seja claro qual o impacto disto no desenvolvimento do inseto, a microbiota intestinal de *Ae. aegypti* é composta por uma grande variedade de bactérias (GUSMÃO, 2010; DAVID et al., 2016; ZOUACHE et al., 2010). Estudos têm sugerido que a simples presença ou ausência de bactérias é o fator determinante para o sucesso do desenvolvimento larval e para a produção de ovos, e não uma composição específica ou complexa do microbioma, pois mesmo bactérias que não são comumente encontradas em simbiose com o inseto, como *Escherichia coli* (*E. coli*), podem reestabelecer o desenvolvimento de larvas axênicas (COON et al, 2014; 2016a; 2016b).

Bactérias são adquiridas principalmente através dos ambientes aquáticos em que o mosquito se alimenta e desenvolve (LINDH et al., 2008), e em alguns casos são transmitidas

da mãe para as próximas linhagens (transmissão vertical), como as bactérias do gênero *Asaia* em mosquitos *Anopheles* (CROTTI et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos específicos de aquisição destes micro-organismos, fatores que selecionem bactérias específicas e se há a transmissão delas para as próximas gerações de mosquitos. A diversidade de bactérias encontradas nos intestinos é influenciada pelo contato direto que o inseto tem com o ambiente (BRIONES et al., 2008; OSEI-POKU et al., 2012; COON et al., 2014; 2016). Há uma aceitação geral de que as larvas nasçam desprovidas de qualquer colonização bacteriana em seus intestinos (COON et al., 2014), que é imediatamente colonizado pelas bactérias presentes no criadouro que estas larvas irão se desenvolver (MERRITT; DADD e WALKER, 1992; COON et al., 2014, COON et al., 2016). Similaridades encontradas no microbioma intestinal de larvas de diferentes espécies e desenvolvidas no mesmo criadouro, bem como diferenças entre larvas da mesma espécie, mas de diferentes criadouros (COON et al., 2016), são algumas das evidências que reforçam esta ideia.

No entanto, outros mecanismos mais aprimorados devem ocorrer para selecionar quais bactérias irão se estabelecer no organismo do inseto desempenhando importantes funções ao longo do ciclo de vida no inseto, caso contrário, a composição do microbioma intestinal de qualquer mosquito seria exclusivamente a mesma do ambiente em que se desenvolve. Alguns estudos reportam em mosquitos a transmissão de bactérias intestinais de forma transestadial (LINDH et al., 2008; BRIONES et al., 2008; DAMIANI et al., 2010; COON et al., 2014) e horizontal (FAVIA et al., 2007). No entanto, ainda são poucas as evidências destes fenômenos, bem com a explicação fisiológica de como eles ocorrem.

Dessa forma, compreender como a microbiota intestinal de mosquitos é compartilhada e se desenvolve/modifica em uma determinada população é de grande interesse uma vez que isso pode elucidar mais claramente a relação entre mosquitos e seus organismos simbiotes. Além disso, do ponto de vista epidemiológico é importante se ter este entendimento, pois mudanças no microbiota intestinal podem refletir na competência vetorial de uma população e consequente transmissão de patógenos.

Neste estudo, nós analisamos a composição da microbiota intestinal de mosquitos *Ae. aegypti* de uma população de campo, coletados na cidade de Botucatu, SP, através do sequenciamento em larga escala da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. Foram avaliadas diferenças individuais na microbiota intestinal dos mosquitos de campo (geração 0 - G0) e acompanhamos como esta composição foi alterada durante cinco gerações (G1-G5)

sendo desenvolvidas em insetário, onde se encontram condições ideais de desenvolvimento e menor exposição a bactérias pelo ambiente.

2. Objetivos

Avaliar as modificações da microbiota intestinal de uma população da cidade de Botucatu/SP durante a colonização em insetário.

Objetivos específicos:

Caracterizar a microbiota intestinal de uma população de campo de *Aedes aegypti*;

Avaliar diferenças intrapopulacionais em cada geração;

Acompanhar como o microbioma intestinal de campo é alterado a cada geração de insetário.

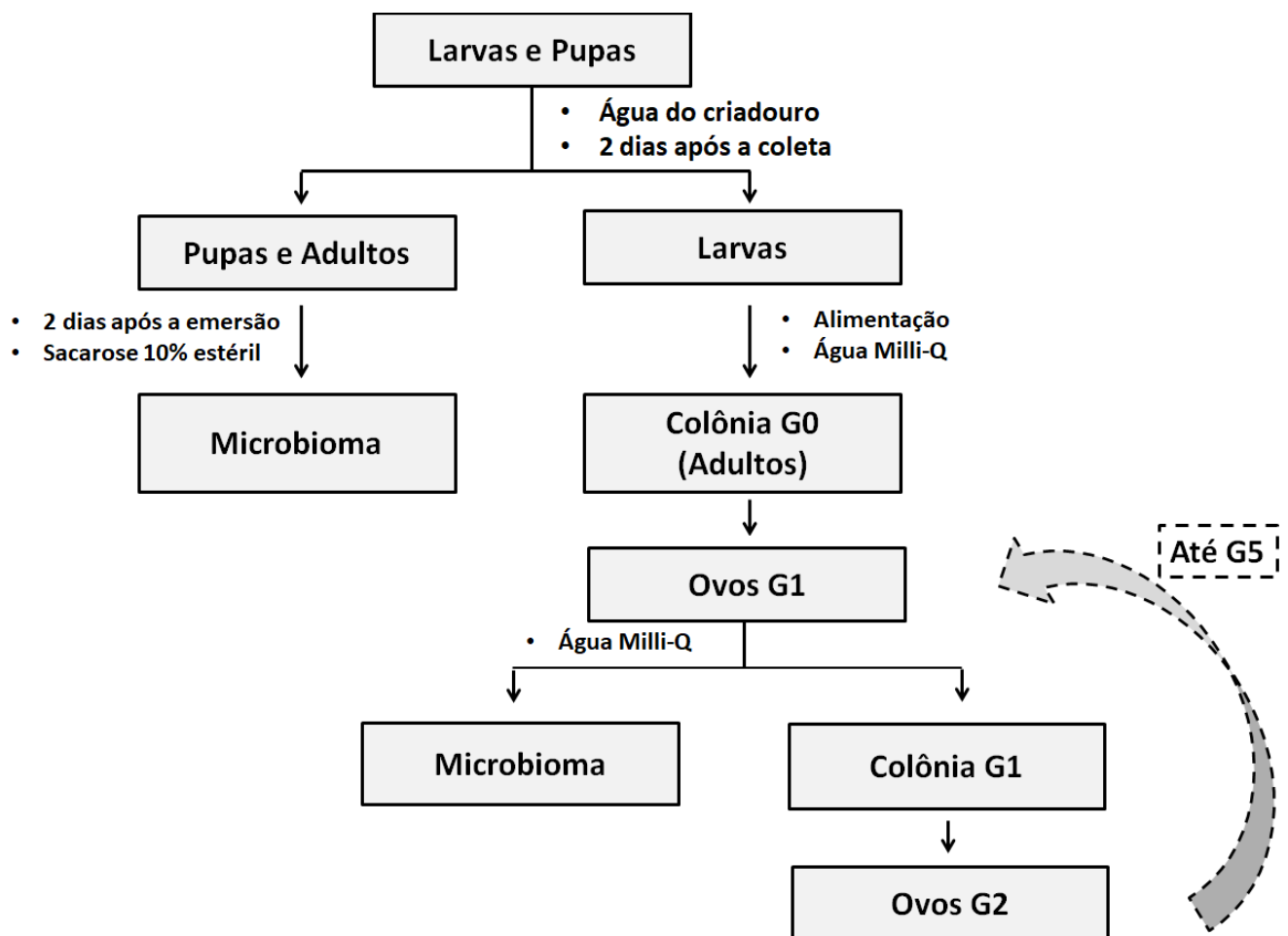
3. Materiais e Métodos

3.1. Coleta de larvas de campo e obtenção de sucessivas gerações.

Para a realização deste estudo em Janeiro de 2015 foram coletadas larvas de *Ae. aegypti* em uma residência na cidade de Botucatu-SP em parceria com a Secretaria de Saúde de Botucatu. Estas larvas foram transferidas para o insetário do Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC/UNESP) onde foram mantidas em condições adequadas para o desenvolvimento da espécie, em 27°C, 80% de humidade e ciclo dia e noite de 12h, e sob a mesma água do criadouro em que foram coletadas. Não foi oferecido nenhum tipo de alimentação às larvas. As pupas e adultos que se desenvolveram após os dois dias da coleta foram transferidos para gaiolas higienizadas com água sanitária e álcool 70%. As pupas foram mantidas na água do criadouro até o estágio adulto, em uma tentativa de mimetizar o desenvolvimento natural. Consideramos os adultos emergidos com sendo mosquitos de campo, pois ao emergir na água do criadouro eles têm a chance de entrar em contato com as bactérias do ambiente natural. Dessa forma, conseguimos ter o controle do tempo de vida do inseto e que estes mosquitos ainda não tivessem alimentação sanguínea, dois fatores que influenciam na composição da microbiota intestinal. Para estes adultos foi fornecida como

alimentação sacarose (10%) estéril, trocada a cada 24 horas até o momento do experimento. Esta primeira população foi nomeada ‘geração 0’ (G0). Decorrido dois dias da coleta, as larvas que não se desenvolveram em pupa ou adulto foram separadas para a montagem de colônia de *Ae. aegypti* para a obtenção de uma segunda geração, nomeada ‘geração 1’ (G1) (Figura 6). Para o desenvolvimento destas larvas, foi fornecida ração de peixe autoclavada como fonte de alimento e água Milli-Q para o nível de água ser mantido. Os adultos foram alimentados artificialmente com sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) para a ovoposição da geração G1. Destes ovos, uma parte foi utilizada no estudo da microbiota, e a outra parte na formação de colônia para a obtenção de ovos da geração F2. Este processo foi repetido até a geração 5 (G5).

Figura 6. Esquema resumido dos procedimentos realizados desde a coleta, criação de colônias e microbioma.



3.2. Dissecção dos intestinos de *Ae. aegypti* adulto

Após dois dias de emergência dos adultos, as fêmeas tiveram seus intestinos dissecados e armazenados individualmente. Antes da dissecção, todo o material utilizado foi autoclavado e ficou por ~20 min exposto a luz U.V. A superfície de cada fêmea de *Ae. aegypti* sofreu assepsia através da imersão individual em etanol a 70% (v/v), seguido de cinco enxágues com água Milli-Q para retirada etanol residual. As dissecções foram realizadas com o auxílio de um protocolo padrão (COLEMAN et al., 2007), através de um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss). Os intestinos dissecados foram mantidos individualmente em tampão ATL, do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen), que foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

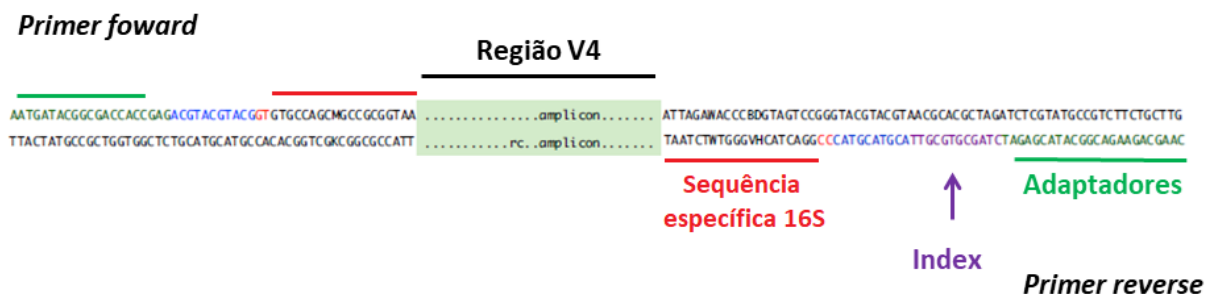
3.3. Preparo das bibliotecas

A técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) foi utilizada para a amplificação do gene 16S rRNA, utilizando-se pares de primers que compreendem a região hipervariável V4 (CAPORASO et al., 2012). As reações foram realizadas em triplicata técnica. Utilizamos 10 µl de DNA molde, uma quantidade acima do que normalmente é utilizado devido a baixa concentração de bactérias no material isolado (cada amostra corresponde a um intestino de mosquito). Foram utilizados os reagentes Tampão PCR 10x *Taq Platinum* (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), MgCl₂ 1,5 mM, 1 U de Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), dNTPs 2,5 mM (GE Healthcare), 1 µl de cada primer *forward* e *reverse* (10 pmol/µl), resultando num volume final de 25 µl.

Diferente do protocolo dos kits de preparo de biblioteca da Illumina, em que são necessárias duas PCR, uma para amplificação do fragmento de 16S rRNA e outra para a adição dos adaptadores, nesta metodologia de CAPORASO et al., 2012 os *primers forward* e *reverse* utilizados são sintetizados já contendo a sequência do adaptador, que são sequências complementares às sequências da *flow cell* (Illumina), a sequência específica, para se anelar às regiões conservadas do gene 16S rRNA, e uma sequência estabilizadora, entre o adaptador e a sequência específica. Além disso, por se tratar de um sequenciamento multiplex, em que as amostras são sequenciadas concomitantemente, cada *primer reverse* também contém um *index*, ou seja, uma sequência que será utilizada para diferenciar uma amostra de outra

durante o sequenciamento (Figura 7). Assim, cada amostra foi amplificada com um *primer reverse* diferente.

Figura 7. Estrutura dos primers foward e reverse para amplificação do gene 16S rDNA



Fonte: CAPORASO et al, 2011. (adaptado)

As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycle Nexus X2 (Eppendorf), iniciando em 94°C por 3 min, seguidas de 40 ciclos de 94°C por 45 s (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min e 30 s (extensão), finalizando em 72°C por 10 min. Os fragmentos de amplificados foram visualizados em transiluminador UV em géis de agarose a 2%, corados com HydraGreen (Actgene).

3.4. Purificação de DNA

As bibliotecas geradas foram purificadas com o sistema de partículas magnéticas, ou *beads* magnéticas (AMPure Agencourt) e um suporte magnético (Magnetic Stand - Life Technologies). A partícula magnética é formada por uma região que se liga ao DNA amplificado e outra que é atraída por magnetismo. Ao homogeneizar as partículas com o material amplificado, todo o DNA é ligado a elas. Em seguida, a placa contendo o homogeneizado é posicionada sobre o suporte magnético de modo que as partícula/ se agrupam na parede do recipiente formando um *pellet*. Nesta etapa, todo o sobrenadante é descartado, e duas lavagens com álcool 70% são realizadas. Para a dissociação do DNA das partículas magnéticas foi adicionado 40ul de água ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen) ao *pellet*.

3.5. Quantificação do produto de PCR purificado

As bibliotecas purificadas foram quantificadas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®). Foi necessária uma diluição em solução Tris-HCl (10 mM) e Tween 20 (0,05%) de concentração final de 1:10⁴ de cada amostra. Seis padrões foram utilizados para a confecção de curvas de referência, que delimitam os valores esperados da quantificação. Para cada amostra foi quantificada em triplicata. Foram utilizados 4,0 µl de cada amostra diluída e 16 µl de solução preparada com fluorescência, fornecida pelo kit de quantificação Library Quantification Kit - Illumina/Universal (KAPA Biosystems).

3.6. Preparo do cartucho de sequenciamento Illumina

Eventuais variações na concentração de DNA amplificado em cada amostra podem influenciar a qualidade da reação de sequenciamento e, conseqüentemente, o resultado final. Para que isso não ocorra, a concentração de todas as amostras foi ajustada para 2,0 nM. 5,0 µl de cada amostras ajustada (2,0 nM) foram adicionados em um *pool*. 5,0 µl deste *pool* com todas as amostras foram combinados com uma solução de NaOH 0,2 N recém preparada e tampão Hyb, obtido no kit MiSeq Reagent Nano v2 (300 ciclos), obtendo-se ao final um pool de bibliotecas à 10 pM. Este conteúdo foi adicionado ao cartucho (kit MiSeq Reagent Nano v2), e em compartimentos diferentes foram adicionados 3 *primers* (sentido, *index sequence* e anti-sentido) que correspondem às sequencias de adaptadores (CAPORASO et al., 2012).

3.7. Sequenciamento Illumina e Processamento das sequencias

O sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizado no equipamento de MiSeq Personal Sequencer (*Illumina*) do Departamento de Genética/IBB/Botucatu, pela workflow *Metagenomics*, com dois kits MiSeq Reagent v2 (300 ciclos) com capacidade para gerar 15 milhões de reads cada. Os dados foram pré-processados pelo software MiSeq Report, gerando arquivos no formato fastq e demultiplexados. Com o software CLC Microbial Genomics Module (Qiagen) foram realizadas as análises secundárias, seguindo as orientações

do manual do usuário. Para o pareamento de *reads* foram utilizados os parâmetros: *Mismatch cost*: 2; *Minimum score*: 8; *Gap cost*: 3; *Maximum unalignment and mismatches*: 0; seguido da fixação do comprimento de *reads*. Foi realizada uma filtragem de amostras para que todas tivessem o valor mínimo de 100 reads e porcentagem mínima de distância da mediana de 50%. A clusterização de OTU (*operational taxonomic unit*) foi feita com o banco de dados SILVA com similaridade de 97% entre as sequências. *Reads* com menos de 0,1% do total de *reads* clusterizadas com o banco de dados, em cada amostra, não foram consideradas para a análise. A apresentação gráfica dos dados foi ajustada pelo software Microsoft Excel.

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas de forma completa nos softwares CLC Microbial Genomics Module (Qiagen) e R (v.3.2.3), utilizando os parâmetros de alfa e beta-diversidade. A primeira é um parâmetro utilizado nas análises de microbioma para identificar se cada amostra do estudo é representativa para serem posteriormente comparadas, enquanto a segunda estima as diferenças de OTUs entre as amostras do estudo. Para o cálculo de α -diversidade foi realizada a construção de uma árvore filogenética com as 100 OTUs mais abundantes da análise usando o método *Maximum Likelihood* que se baseia no alinhamento múltiplo de sequências pelo software MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) pelo software CLC Microbial Genomics Module. Os valores de alfa-diversidade foram calculados pela medida de Shannon, com o pacote *phyloseq* (v. 1.14.0) de R (v.3.2.3). Uma segunda árvore filogenética foi construída com as 67 'OTU compartilhadas' das gerações, com os programas ClustalW e MEGA (v.7.0.26). β -diversidade é uma análise utilizada para comparar como as amostras se distanciam uma da outra em relação à composição da microbiota intestinal, pois esta análise estima as diferenças de OTUs entre as amostras do estudo. Para estimar estas diferenças realizamos uma análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a medida de Bray-Curtis, com o pacote *vegan* (v.2.4.1) de R (v.3.2.3). Para completar os dados de β -diversidade foi realizada a análise PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) no software CLC Microbial Genomics Module.

4. Resultados

4.1. Diversidade da microbiota intestinal de população de campo de *Aedes aegypti* e suas sucessivas gerações

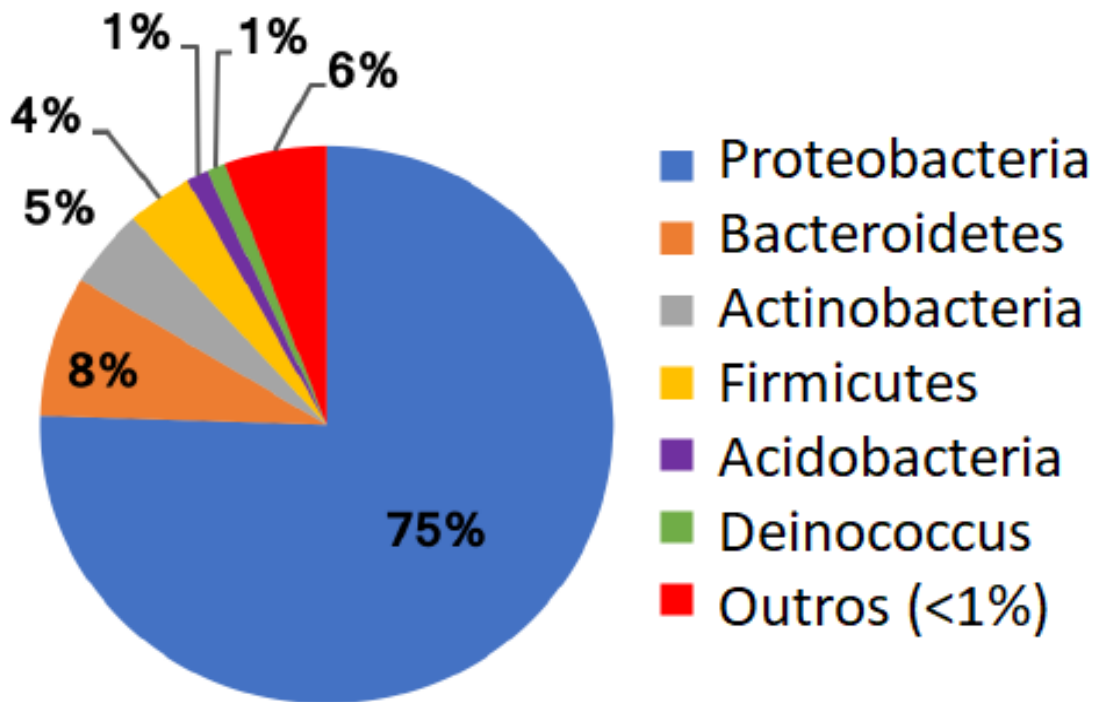
Após a coleta, geração de colônias no insetário e preparo para sequenciamento, obtivemos um total de 136 amostras individuais de intestino de *Ae. aegypti* (Quadro 1), que foram sequenciados em duas corridas, devido à disponibilidade de *primers* com indexes diferentes do laboratório (máximo de 96 amostras por corrida). Cada sequenciamento tem a capacidade de 15 milhões de *reads*, totalizando 30 milhões de *reads* nas nossas amostras. No entanto, após o processamento das sequências, que incluem a triagem de controle do sequenciador (*chastity filter*), remoção de sequências quiméricas, e filtragem das *reads* de baixa cobertura, neste estudo foram analisadas aproximadamente 6 milhões de *reads* (Quadro 1 e Quadro S1), cada uma sendo atribuída a uma OTU (*operational taxonomic unit*) de acordo com o grau de 97% similaridade das sequências com o banco de dados.

Quadro 1. Quantidade de amostras individuais de intestino de *Ae. aegypti* e quantidade de *reads* utilizadas para análise.

Geração	Intestinos	Reads
G0	15	373268
G1	22	1088789
G2	27	744267
G3	27	2324053
G4	24	902980
G5	21	571405
Total	136	6004762

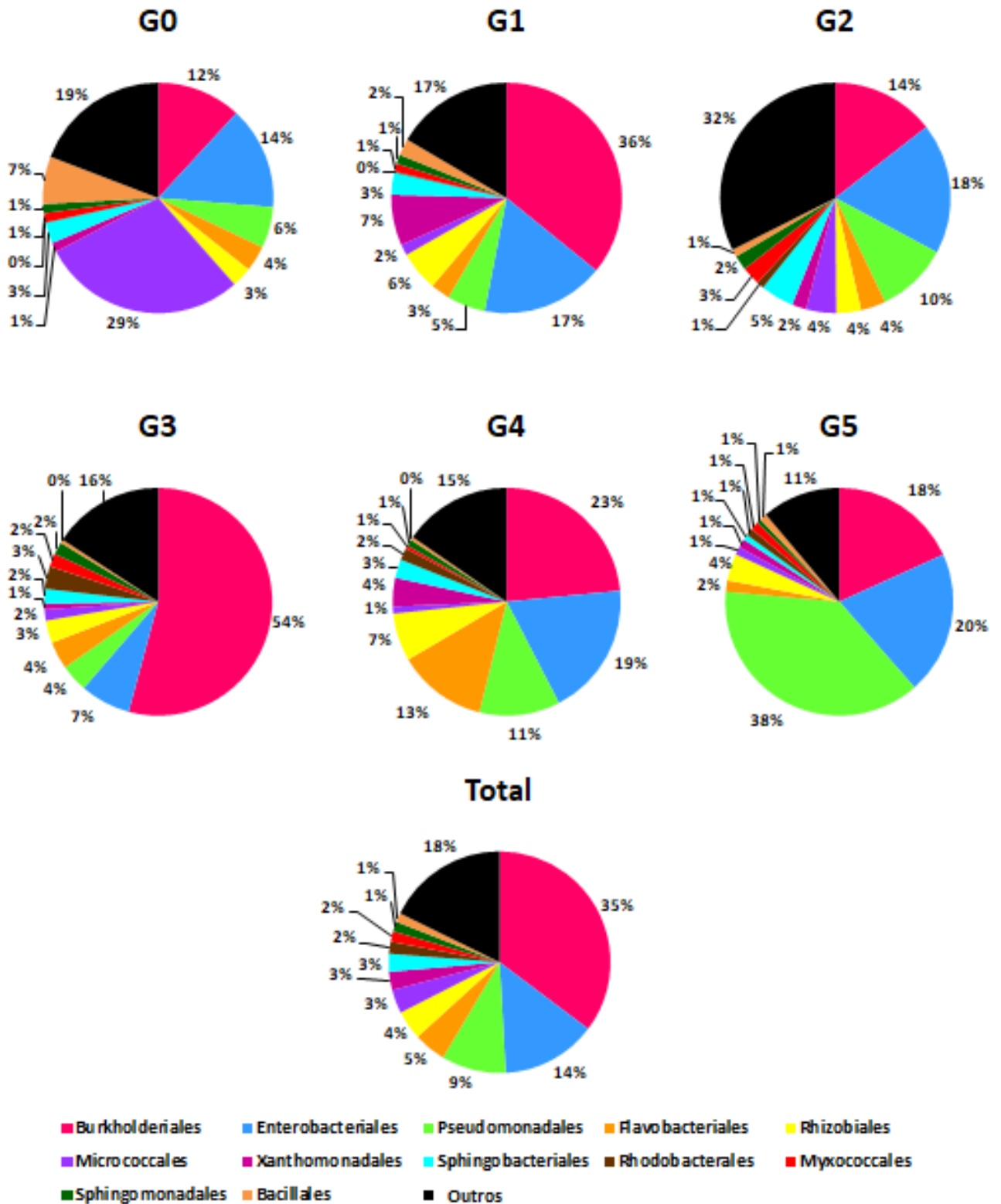
Foi observada uma alta diversidade de bactérias nos intestinos, em todos os níveis de classificação taxonômica. Nós identificamos um total de 1975 OTUs, pertencentes a 37 filos diferentes. Considerando a abundância combinada (soma de todas as *reads*) o filo mais abundante foi Proteobacteria (75%), seguido de Bacteroidetes (8%), Actinobacteria (5%) e Firmicutes (4%), que juntos somam 92% de todas as *reads* analisadas (Figura 8 e Quadro S1).

Figura 8. Perfil da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*. Proporção das bactérias mais abundantes nas amostras, apresentada na classificação taxonômica de filo.



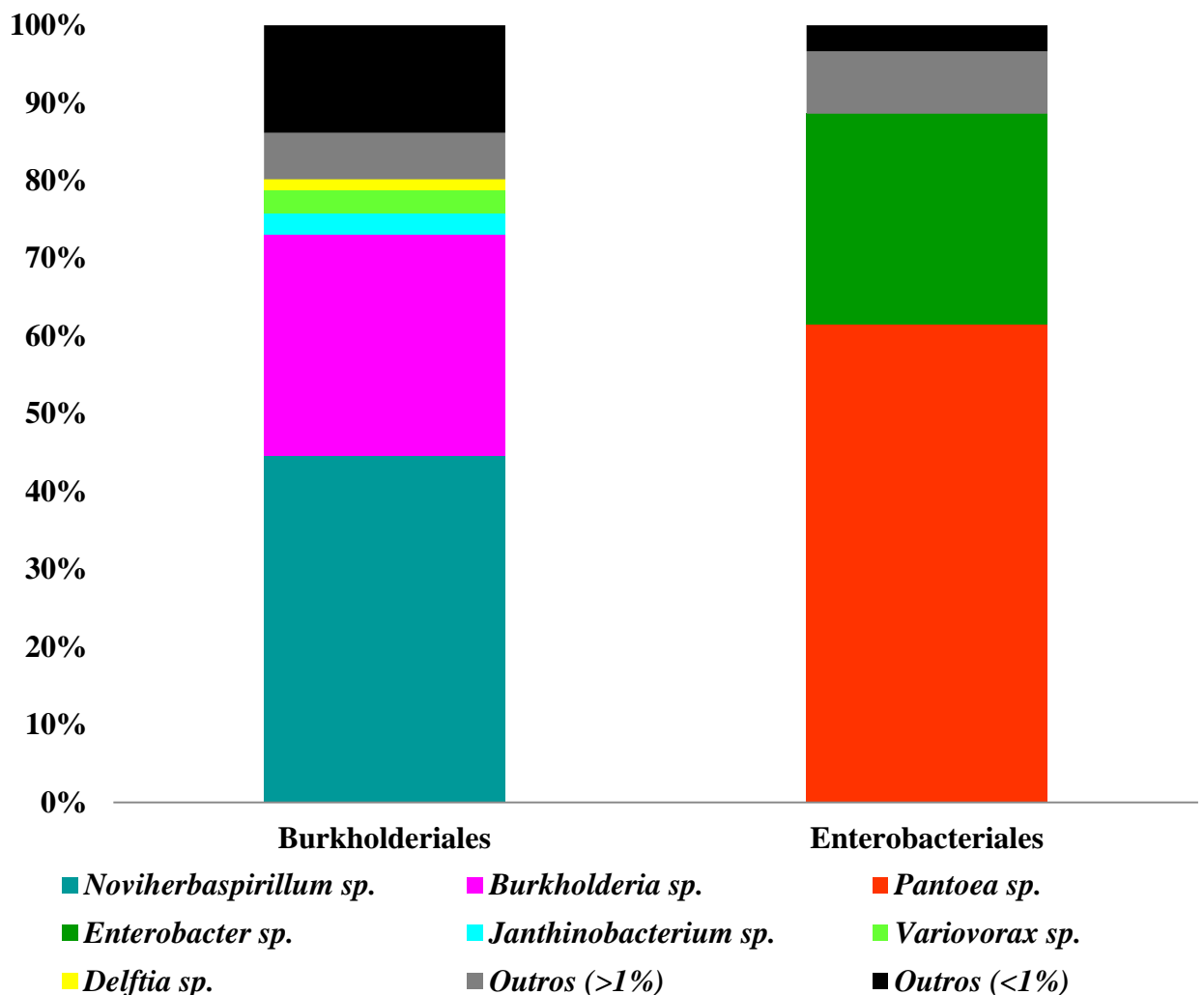
No nível de ordem, identificamos 179 classificações diferentes entre todas as amostras, sendo que apenas 16 delas representam 1% ou mais de todos os microbiomas (Figura S1 e Quadro S2). Juntas, essas 16 ordens representam uma média de aproximadamente 90% dos microbiomas aqui analisados, sendo a proporção de cada uma delas relativamente similar entre os indivíduos de uma mesma geração e, em menor grau, entre gerações. Em geral, houve uma predominância de Burkholderiales e Enterobacteriales, cobrindo cerca de 50% do microbioma intestinal do inseto (Figura 9 e Quadro S2).

Figura 9. Perfil da microbiota intestinal de *Ae. aegypti* de campo (G0) e as cinco gerações desenvolvidas em laboratório (G1-G5). Proporção das bactérias mais abundantes em cada geração e em todas as amostras, apresentada na classificação taxonômica de ordem.



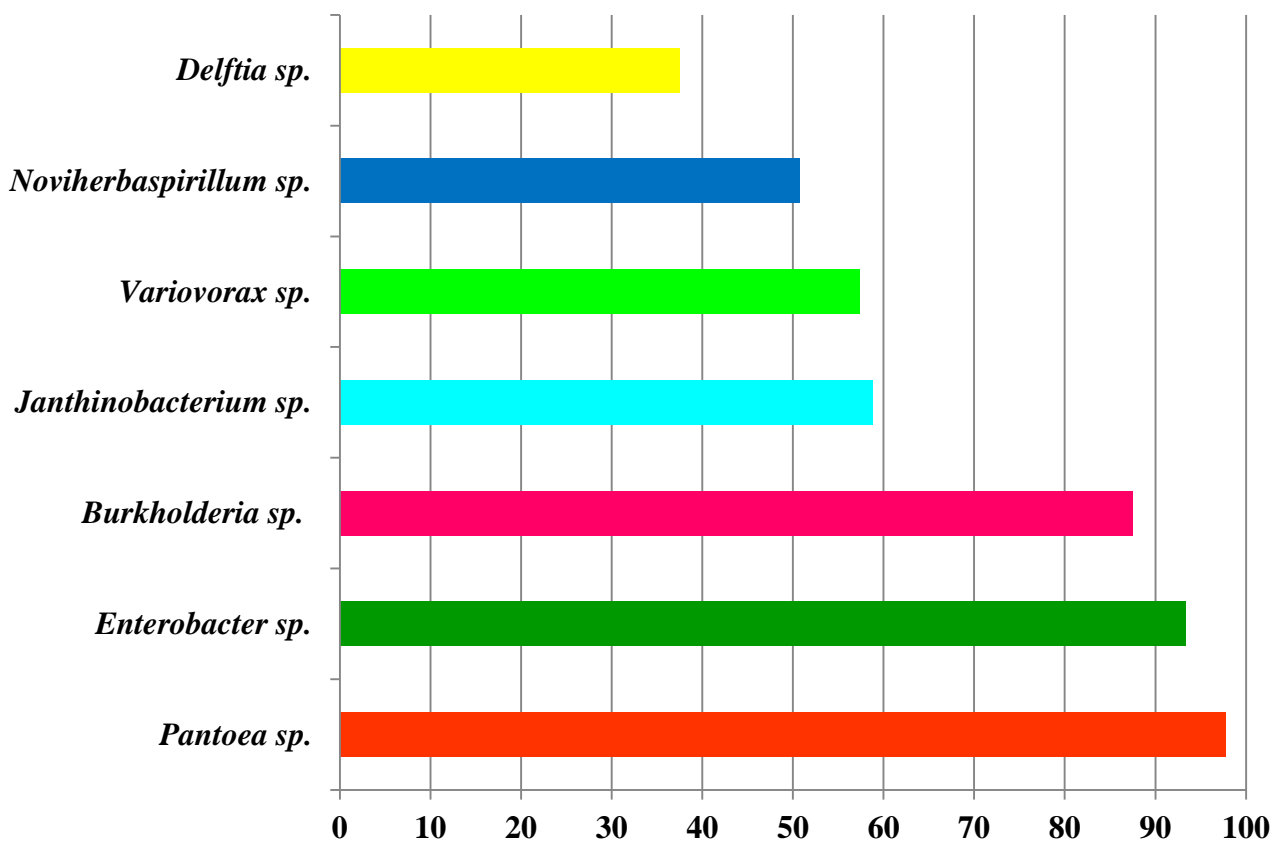
Nossos dados também revelaram que a abundância das ordens normalmente é resultado da abundância de algumas bactérias específicas, mesmo que cada ordem seja formada por um grande número de diferentes OTUs. Por exemplo, Burkholderiales foi composta por 158 OTUs, mas foram duas delas *Burkholderia sp.* (KC000258.1.1363) e *Noviherbaspirillum sp.* (GAJK01095101.106.1432) que tiveram a maior quantidade de *reads* designadas, resultando em 44% e 28% do total de *reads* desta ordem, respectivamente (Figura 10 e Quadro S3). Assim também ocorre com Enterobacteriales, formada por 39 OTUs, mas que teve uma abundância representada quase que exclusivamente por duas delas: AB845279.1.1381 (*Pantoea sp.*) and GQ867408.1.1451 (*Enterobacter sp.*), que correspondem a 61% e 27% do total de *reads* para esta ordem (Figura 10 e Quadro S4).

Figura 10. Domínio de OTUs específicas entre todas as de mesma classificação. Nas classificações de ordem apresentadas, Burkholderiales e Enterobacteriales, duas OTUs aparecem em maior proporção.



É importante salientar que de uma forma geral, as OTUs mais abundantes de Enterobacteriales foram mais prevalentes entre os mosquitos do que Burkholderiales. No total, AB845279.1.1381 (*Pantoea sp.*) e GQ867408.1.1451 (*Enterobacter sp.*) foram detectadas em 98% e 93% dos mosquitos, respectivamente, enquanto KC000258.1.1363 (*Burkholderia sp.*) e GAJK01095101.106.1432 (*Noviherbaspirillum sp.*) foram identificadas em 87% e 51% deles (Figura 11). Também é interessante observar que algumas OTUs encontradas em Burkholderiales aparecem mais frequentemente do que outras em proporções relativamente semelhantes. É o caso das OTUs JN030506.1.1298 (*Janthinobacterium sp.*), EF018778.1.1384 (*Variovorax sp.*) e EU706241.1.1234 (*Delftia sp.*), que aparecem respectivamente em 59%, 57% e 37,5% dos mosquitos (Figura 11), nas proporções 2,7%, 2,9% e 1,4% dos microbiomas (Figura 10 e Quadro S3). Estes padrões sugerem que estas frequências e distribuições não são aleatórias, e que estas bactérias podem estar desempenhando funções fisiológicas importantes no intestino do inseto.

Figura 11. Frequência de aparecimento das OTUs entre as amostras. Apenas três OTUs aparecem na totalidade das amostras.

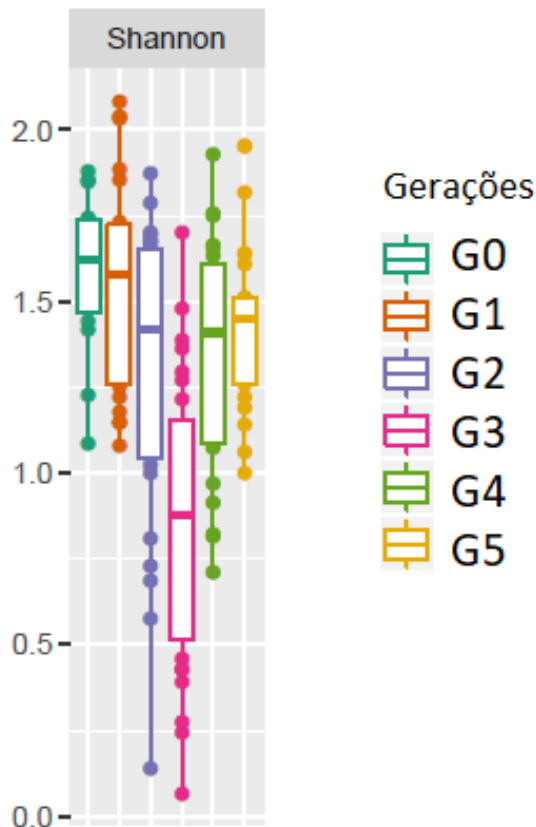


4.2. Efeito da colonização na diversidade bacteriana

Ao longo das gerações nós podemos observar um aumento de Proteobacteria, variando de 46% em G0 a 88% em G5 (Quadro S1). Os outros filos encontrados em grande abundância tiveram suas proporções diminuídas, como Bacteroidetes (7% a 3%), Firmicutes (8% a 2%) e, a diminuição mais expressiva, Actinobacteria (30% a 2%). A diminuição da diversidade foi exacerbada também pela dinâmica em G3. Alguma circunstância favoreceu a replicação de bactérias Burkholderiales. O domínio desta bactéria resultou na diminuição das outras, como Enterobacteriales e Pseudomonadales, provavelmente por competição (Figura 9).

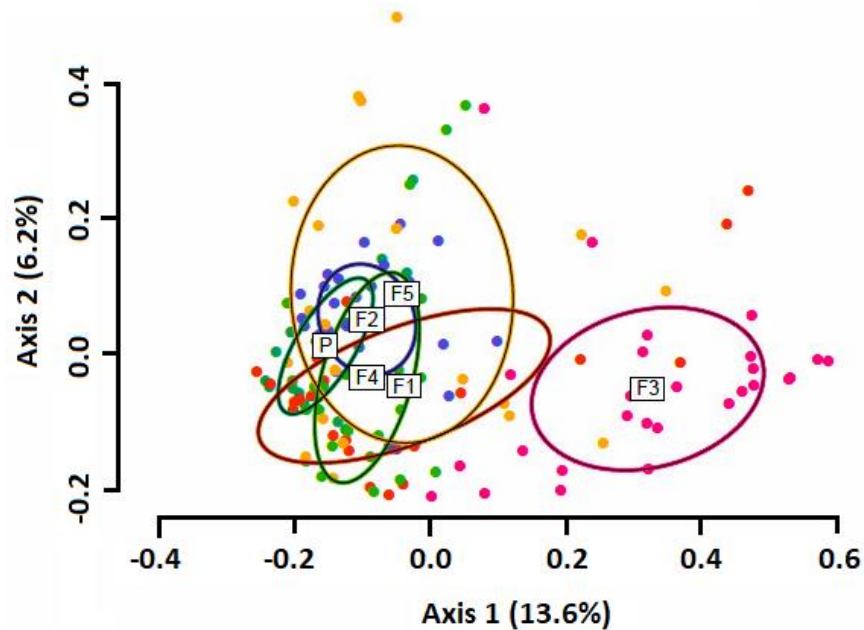
A diversidade de microbiomas é tipicamente descrita pela diversidade da própria amostra (alfa-diversidade) e em comparação com um grupo de diferentes amostras (beta-diversidade) (KUCZYNSKI et al., 2010). Alfa-diversidade é uma medida que leva em consideração a riqueza de bactérias (quantas OTUs) e a uniformidade em que elas aparecem (quantas *reads*) em uma amostra (MORGAN e HUTTENHOWER, 2012). Dessa forma, os valores de alfa-diversidade foram calculados para cada intestino de cada geração e estimados pela medida de Shannon (Figura 12). Ao comparar as amostras, é possível observar uma diminuição na riqueza de bactérias de uma geração para outra. Essa diferença na composição do microbioma intestinal após a colonização é provavelmente uma consequência da redução da exposição dos mosquitos a novas bactérias. É interessante observar que em G3 há uma queda brusca da diversidade, devido principalmente ao aumento da ordem Burkholderiales nesta geração (Quadro S2 e Figura S1). No entanto, na geração seguinte a diversidade retorna a nível semelhante ao de G2.

Figura 12. Alfa-diversidade. A diversidade individual das amostras foi estipulada pela medida de Shannon, e mostra o declínio progressivo da riqueza dos microbiomas ao longo das gerações.



Calculamos também a diversidade beta para a comparação das amostras por gerações, pois através desta análise é possível observar o quão semelhante as amostras são entre si, ou seja, se elas possuem as mesmas bactérias e em proporções parecidas (HAMADY, LOZUPONE, KNIGHT, 2010). Para tanto, realizamos uma análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na distância métrica de Bray-Curtis (Figura 13). O resultado mostra a clusterização das amostras, que não se distanciaram em grandes proporções, tal como os indivíduos de G3. O desvio desta geração remete novamente à mudança da composição do microbioma devido ao aumento da ordem Burkholderiales nestes indivíduos. Estes resultados, combinados com a observação da oscilação de bactérias entre as gerações (apresentada no próximo tópico - Figura 14) e o aumento de um tipo de bactéria ao mesmo tempo em que há diminuição de outro (Figura 9), contribuem com a ideia de que há uma intensa dinâmica entre as bactérias intestinais, mas que a tendência a manter uma homeostase, com o reestabelecimento da microbiota original, é ainda mais forte.

Figura 13. Beta-diversidade. Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada na distância métrica de Bray-Curtis, mostra o distanciamento das amostras de G3. P – G0; F1 – G1; F2 – G2; F3 – G3; F4 – G4; F5 – G5.



Para a complementação dos dados de beta diversidade foi realizada a análise de PERMANOVA (Quadro 2). Nesta análise é possível comparar dois grupos por vez, e, ao contrário do que foi observado no gráfico de PCoA, verificamos uma grande diferença significativa dos indivíduos entre cada geração. Os cálculos foram realizados com base na abundância das 100 OTUs com maior quantidade de *reads* de todas as amostras, assim, acreditamos que esta diferença ocorra devido à grande diversidade de bactérias presentes em cada intestino, pois muitas delas aparecem com uma abundância exacerbada em poucas amostras, enquanto que em outras amostras não chegam a aparecer (Quadro 3). A distância de Bray-Curtis se baseia na abundância de espécies, mas outras métricas de beta diversidade levam em consideração a aproximação filogenética entre as amostras, como a distância métrica Weighted UniFrac que faz essa análise de forma quantitativa, ou seja, é verificada a abundância das bactérias de filogenia próxima. Nos nossos resultados, essa análise mostra que todas as gerações comparadas com G3 possuem diferenças significativas. Assim, a diversidade de OTUs nas amostras é alta, ao ponto de nenhum grupo apresentar similaridade estatística pela análise de Bray-Curtis. No entanto, a análise Weighted UniFrac nos sugere que muitas destas bactérias

pertencem a um mesmo grupo de bactérias, e essa dinâmica foi alterada apenas em G3, pelo aumento da ordem Burkholderiales. As gerações G2 e G4 também apresentam uma diferença significativa da composição da microbiota, o que nos indica um processo de reestabelecimento da microbiota original, uma vez que G2 e G5 não possuem diferença significativa.

Quadro 2. Tabela com os resultados da análise PERMANOVA.

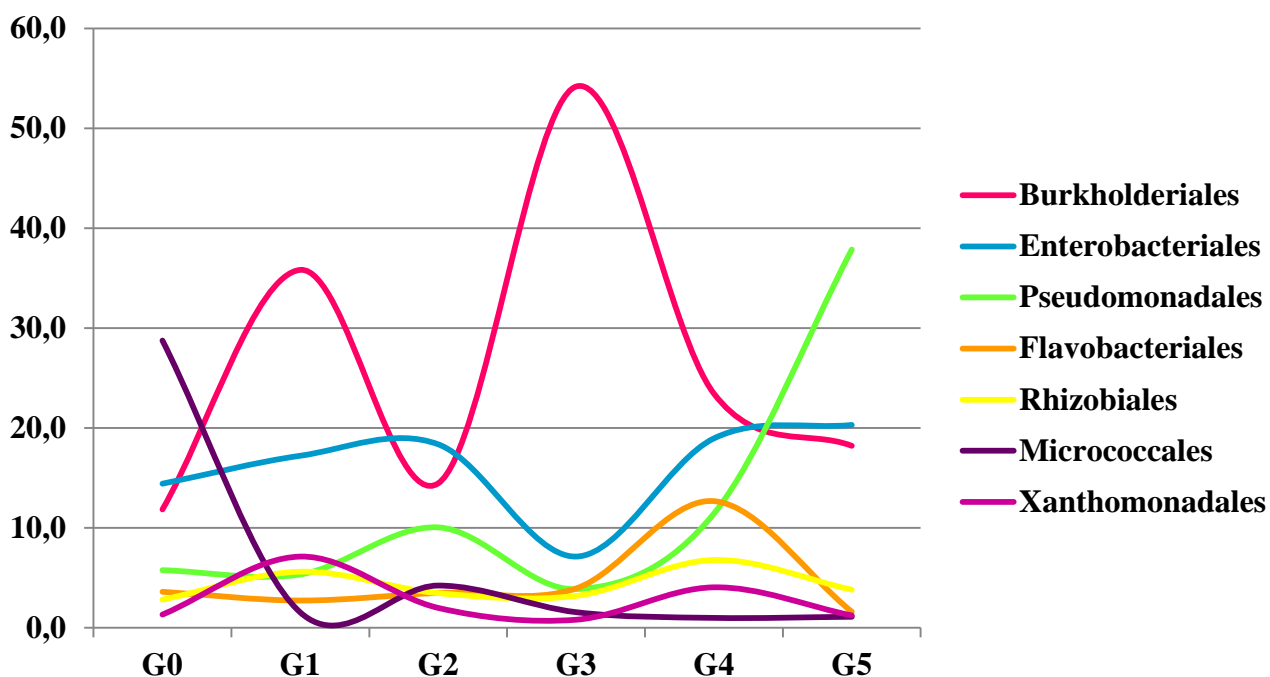
Grupo 1	Grupo 2	Bray- Curtis p-value*	Weighted UniFrac p-value*
G0	G1	0,0021	1
G0	G2	0,00015	1
G1	G2	0,0015	1
G0	G3	0,00015	0,00015
G1	G3	0,00015	0,0003
G2	G3	0,00015	0,00015
G0	G4	0,00015	1
G1	G4	0,00195	1
G2	G4	0,00015	0,1257
G3	G4	0,00015	0,0009
G0	G5	0,00015	1
G1	G5	0,00255	1
G2	G5	0,00015	1
G3	G5	0,00015	0,00015
G4	G5	0,00015	1

*Correção de Bonferroni

4.3. Oscilações na abundância de bactérias

É interessante observar que muitas bactérias apresentam uma abundância oscilatória ao longo das gerações, com a diminuição de suas porcentagens em uma geração e aumento na geração seguinte, e vice-versa (Figura 14 e Tabela S2). Nós acreditamos que tais mudanças na composição de bactérias possa ser um resultado da colonização, flutuações aleatórias devido ao número limitado do tamanho da população, ou mesmo uma competição entre as estas bactérias intestinais.

Figura 14. Padrão oscilatório das ordens mais abundantes entre as gerações. Apresentado com base na porcentagem de cada ordem nas respectivas gerações.



Nossas análises também revelaram grandes variações na proporção de algumas bactérias entre os intestinos de indivíduos de uma mesma geração. Estas diferenças são acompanhadas normalmente do aumento da abundância de bactérias específicas, que não foram detectadas em proporções similares em todos os mosquitos. Por exemplo, Micrococcales apareceu em altas proporções em apenas três mosquitos de campo (Figura S1, painel G0). A OTU responsável por este aumento expressivo foi identificada como *Arthrobacter sp.* (AY739695.1.1392), apresentando uma variação de 0,2%-79,6% nos indivíduos da geração G0 (Quadro 3). Algumas outras OTUs de Micrococcales também contribuíram para isso, mas não tão significativamente quanto *Arthrobacter sp.* Da mesma forma, essas variações também foram observadas nas ordens Corynebacteriales em G1: GQ007953.1.1342 (*Corynebacteriaceae spp.*), 33,3%; Rhodobacterales em G3: AB006899.1.1452 (*Paracoccus spp.*), 51,1%; Flavobacteriales em G3 e G4: KC734243.1.1310 (*Chryseobacterium*); 97,3% e 95,6%, respectivamente; e Pseudomonadales em G5: FJ976568.1.1388 (*Acinetobacter*); 94,3% (Quadro 3). Este é um aspecto importante a ser levado em consideração, particularmente em estudos de microbiomas que utilizam amostras em pool, pois é comum o aparecimento de algumas bactérias em grandes proporções em poucas amostras, mas dependendo da metodologia aplicada e do objetivo da pesquisa, a

conclusão final sobre a composição bacteriana de uma população pode acabar sendo distorcida.

Quadro 3. OTUs que se destacaram pela variação da abundância em alguns indivíduos.

Porcentagem das referidas OTUs nos intestinos em que estas OTUs aparecem em menor e maior proporção, em cada geração.

OTU ID	G0	G1	G2	G3	G4	G5
AY739695.1.1392 (<i>Arthrobacter</i>)	0,3-79,6	0	0	0	0	0
GQ007953.1.1342 (<i>Corynebacteriaceae</i>)	0,7-1,0	0-33,3	0,7-2,3	0	0-0,4	0
AB006899.1.1452 (<i>Paracoccus</i>)	0	0,2-3,9	0,4-8,2	0,1-51,1	0,6-4,8	0,1-7,1
KC734243.1.1310 (<i>Chryseobacterium</i>)	0,7-0,8	0,3-3,4	0,4-7,0	0,6-97,4	0,9-95,7	0,2-0,4
FJ976568.1.1388 (<i>Acinetobacter</i>)	0	0	0	0	0	0,3-94,3

4.4. Microbioma compartilhado

Apesar das mudanças na composição das gerações, nós pudemos identificar um grupo de 67 OTUs que parecem ser conservadas nos mosquitos em todas as gerações, a que nos referimos como 'microbioma compartilhado' (Figura 15 e Quadros S5). Juntos, o microbioma compartilhado resulta em aproximadamente 55% dos microbiomas. Muitas destas OTUs compartilhadas aparecem em menos de 50 mosquitos em cada geração (Figura 15). Isso nos mostra o quão improvável é identificar a mesma OTU em diferentes indivíduos, mesmo sendo da mesma geração ou gerados nas mesmas condições. No entanto, 3 destas OTUs compartilhadas aparecem em mais de 80% das amostras em cada geração. São elas: AB845279.1.1381 (*Pantoea sp.*), GQ867408.1.1451 (*Enterobacter sp.*) e KC000258.1.1363 (*Burkholderia sp.*).

5. Discussão

Neste estudo nós identificamos microbiomas intestinais individuais de mosquitos *Aedes aegypti*, de uma população de campo. A composição bacteriana encontrada foi altamente diversa e muito semelhante entre as amostras, apesar de algumas diferenças individuais. Proteobacteria foi o filo mais abundante identificado, seguido por proporções menores de Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Este perfil é frequentemente observado em outros estudos que caracterizam a microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, mesmo quando a origem destes mosquitos são de diferentes locais pelo mundo, como Índia (YADAV et al., 2015), Tailândia (DADA et al., 2014), Estados Unidos da América (COON et al., 2016) e Brasil (DAVID et al., 2016). Considerando a taxonomia de ordem, Burkholderiales e Enterobacteriales foram as bactérias dominantes, e o interessante é que a abundância destas ordens não ocorreu pela formação de um grande grupo de bactérias desta mesma classificação, mais por algumas poucas OTUs específicas, como *Burkholderia sp.* (KC000258.1.1363), *Noviherbaspirillum sp.* (GAJK01095101.106.1432), *Pantoea sp.* (AB845279.1.1381) and *Enterobacter sp.* (GQ867408.1.1451).

O ambiente intestinal do mosquito se mostrou como sendo muito conservativo, selecionando bactérias específicas ao longo das gerações e eliminando aquelas que provavelmente não estão envolvidas no desenvolvimento do inseto. Durante o processo de colonização, nós verificamos uma diminuição na diversidade da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, que foi preenchida pelas bactérias inicialmente (G0) mais abundantes. É comum não considerar significativa esta diversidade uma vez que a maioria das OTUs apresentam poucas *reads* (COON et al., 2014). No entanto, a presença destas bactérias é detectada, e a baixa proporção em que aparecem pode significar que elas são bactérias passageiras, adquiridas pelo contato com o ambiente, mas que são eliminadas se não desempenham uma função efetiva no organismo do mosquito. Isto é o que nós acreditamos ocorrer com as bactérias do filo Actinobacteria, que diminui imediatamente de G0 para G1, principalmente pela diminuição de *Arthrobacter sp.* (AY739695.1.1392), uma bactéria gram-positiva encontrada no solo (MONGODIN et al., 2006). O caso desta OTU nós chama a atenção para metodologias que utilizam amostras em pool, pois ela aparece em apenas 3 dos 15 intestinos de campo mas por apresentar altas proporções nessas amostras o resultado final poderia mostrar esta bactéria como a mais abundante da população.

Em G3 nós observamos um interessante exemplo da força para ser mantida a composição da microbiota original. Por alguma condição durante o desenvolvimento dos mosquitos, *Noviherbaspirillum sp.* (GAJK01095101.106.1432) teve suas proporções aumentadas nos indivíduos de G3, o que causou o afastamento da composição do microbioma desta geração das outras. No entanto, na geração seguinte (G4) esta OTU tem suas proporções diminuídas nas amostras, retornando a um nível semelhante às primeiras gerações, junto com um aumento da diversidade. O fato de a composição da microbiota intestinal não ser alterada drasticamente durante a colonização, mantendo as bactérias mais abundantes ao longo das gerações em proporções semelhantes, é uma importante informação a ser levada em consideração em estudos que investigam de forma mais aprofundada como o microbioma intestinal interfere na competência vetorial, uma vez que um dos grandes problemas para se realizar este tipo de pesquisa pode ser a dificuldade em se adquirir uma quantidade representativa de amostras de campo.

Nós identificamos 67 OTUs compartilhadas, o que significa que em todas as gerações há pelo menos uma amostra com alguma destas 67 OTUs. Se as amostras fossem analisadas em pool seria provável chegar à conclusão errônea de que estas OTUs correspondem a um *core* microbiano muito específico de *Ae. aegypti*. No entanto, em nenhuma amostra individual foram encontradas todas as estas 67 OTUs. Apenas 3 OTUs aparecem em mais de 60% das amostras em todas as gerações, e elas são as mesmas identificadas como as mais abundantes. O gênero a que elas correspondem (*Pantoea*, *Enterobacter* and *Burkholderia*) são frequentemente encontrados na microbiota intestinal de mosquitos do gênero *Aedes* (GUSMÃO et al., 2010; ZOUACHE et al., 2010, CHARAN et al., 2013; MORO et al., 2013), mesmo em colônias de laboratório (TERENIUS, 2012; COON et al., 2016), de campo e em outras espécies de mosquitos, como *Anopheles* e *Culex* (RAHARIMALA et al., 2015; CHAVSHIN et al., 2014; BOISSIERE et al., 2012; WANG et al., 2011; MUTURI et al., 2017), o que fortalece a ideia de que estas bactérias são essenciais durante o ciclo de vida de mosquitos, podendo se tornar potenciais candidatos em técnicas de paratransgênese.

Uma das grandes questões em estudo de microbiomas é compreender como as bactérias intestinais são adquiridas. A ideia geral é a de que o contato com o ambiente é o principal fator que determina a composição da microbiota intestinal dos adultos (WANG et al., 2011; MUTURI et al., 2017). Recentemente foi realizado um estudo com seis colônias de *Ae. aegypti* de diferentes locais do mundo que foram eclodidas ao mesmo tempo sob as

mesmas condições de desenvolvimento, mostrando uma similaridade muito alta da microbiota entre os indivíduos de todas as colônias e sugerindo que o ambiente tem mais influência na composição da microbiota do que a genética dos insetos (DICKSON et al., 2018). Certamente, o contato com o ambiente é uma forma muito importante de aquisição da microbiota, mas se baseando nos nossos resultados de que as bactérias mais abundantes são mantidas ao longo das gerações, e devido às semelhanças da composição bacteriana com mosquitos de diferentes locais, nos acreditamos que a combinação de genes relacionado à imunidade (STATHOPOULOS et al., 2014; MINARD et al., 2015) e mecanismos fisiológicos são ainda mais determinantes no estabelecimento das comunidades bacterianas intestinais. No entanto, talvez seja a presença de diferentes bactérias, adquiridas pelo contato dos insetos com o meio, que confirmam características variáveis, como a alteração da competência vetorial, ou seja, a genética e mecanismo fisiológicos exercem uma força para manter as bactérias simbiotes, mas ocasionalmente uma ruptura deste equilíbrio resulta em mudanças de características.

A transmissão transestadial é uma forma de selecionar bactérias do estágio larval que irão colonizar o intestino do mosquito na forma adulta (WANG et al., 2011; CHAVSHIN et al., 2014; DADA et al., 2014). Os mecanismos ainda não são completamente conhecidos, mas há a hipótese de que o mecônio pode atuar da mesma forma como a matriz peritrófica após a alimentação sanguínea. Durante a fase de pupa é formada uma estrutura chamada matriz peritrófica meconial que circunda todo o intestino larval (ROMOSER e ROTHMAN, 1973). Nos primeiros dias de emergência o mecônio é eliminado do intestino do adulto, e alguns estudos sugerem que as bactérias presentes no intestino larval são eliminadas por este processo (MOLL et al, 2001; MONCAYO et al, 2005) por um mecanismo semelhante ao envolvido na síntese da matriz peritrófica (PM). Aqui, os mosquitos foram analisados com 2 dias pós emergência, quando o mecônio já eliminado do intestino, e encontramos mesmo assim uma grande diversidade de bactérias, sugerindo que há o envolvimento de mecanismos fisiológicos na transferência do estágio larval para adulto. Transmissão vertical é outro mecanismo que pode contribuir no estabelecimento da composição da microbiota intestinal de mosquitos. Em besouros foi identificada uma espécie de *Burkholderia sp.* envolvida neste fenômeno. Esta bactéria, encontrada no aparelho reprodutivo do inseto, consegue entrar nos ovos, sendo encontrada nos estágios de desenvolvimento seguintes (FLOREZ, 2017). O caminho do intestino até os ovários não está claro, mas um experimento com larvas de *Galleria mellonella* mostram que *E. coli* pode migrar do lúmen intestinal para a hemocélula

(interior do inseto onde circula a hemolinfa), e então é encontrada em ovários e ovos (FREITAK et al., 2014). Embora esta bactéria não seja um simbionte de *Ae. aegypti*, este mecanismo pode ser mais frequente, sendo muitas bactérias herdadas desta forma.

Em conclusão, mosquitos *Ae. aegypti* de diferentes criadouros ou regiões podem carregar uma grande variedade de bactérias em seus intestinos devido o contato com o ambiente que os cerca, mas em todos estes mosquitos nós encontramos muitas semelhanças. Embora as bactérias possam não pertençam ao mesmo gênero ou espécie, elas apresentam uma taxonomia próxima, sugerindo que bactérias específicas têm funções importantes no organismo do mosquito, e a variação observada entre amostras acaba sendo passageira. Aqui nós mostramos que o microbioma intestinal de uma população de campo de *Ae. aegypti* tem sua diversidade diminuída ao começar a ser desenvolvida em insetário, e as bactérias inicialmente mais abundantes aumentam suas proporções ao longo das gerações. Um fato importante é que estas alterações são progressivas, então estudos envolvendo o microbioma de populações de campo podem ser favorecidos, uma vez que com a colonização em insetário é possível se obter um número maior de amostras e a microbiota intestinal pode ser mantida de forma ainda muito similar à que seria encontrada no campo, gerando resultados estatisticamente mais significantes.

A

Materials Suplementares

Quadro S1. Abundância combinada das bactérias e suas respectivas proporções em cada geração. Apresentação no nível taxonômico de filo.

Filos	G0		G1		G2		G3		G4		G5		Todos	
	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%
Proteobacteria	172287	46,2	854453	78,5	489478	65,8	1854647	79,8	656321	72,7	503081	88,0	4530267	75,4
Bacteroidetes	27270	7,3	72054	6,6	72171	9,7	157649	6,8	143967	15,9	16001	2,8	489112	8,1
Actinobacteria	114019	30,5	31859	2,9	49034	6,6	47751	2,1	20856	2,3	10951	1,9	274470	4,6
Firmicutes	31006	8,3	44838	4,1	31068	4,2	69222	3,0	37519	4,2	10627	1,9	224280	3,7
Acidobacteria	4417	1,2	14194	1,3	11464	1,5	36788	1,6	3766	0,4	2457	0,4	73086	1,2
Deinococcus-Thermus	590	0,2	1258	0,1	385	0,1	62377	2,7	237	0,0	0	0,0	64847	1,1
Planctomycetes	3785	1,0	7945	0,7	11025	1,5	12768	0,5	13327	1,5	3957	0,7	52807	0,9
SM2F11	3375	0,9	7284	0,7	20603	2,8	11637	0,5	4641	0,5	2159	0,4	49699	0,8
Verrucomicrobia	2984	0,8	14261	1,3	9674	1,3	7141	0,3	3935	0,4	7593	1,3	45588	0,8
Chlamydiae	20	0,0	152	0,0	1511	0,2	25456	1,1	58	0,0	62	0,0	27259	0,5
WCHB1-60	1181	0,3	2634	0,2	8476	1,1	7715	0,3	638	0,1	2524	0,4	23168	0,4
Candidate division OD1	1987	0,5	4890	0,4	5702	0,8	4787	0,2	3113	0,3	2566	0,4	23045	0,4
BD1-5	1993	0,5	2987	0,3	8264	1,1	4712	0,2	1609	0,2	794	0,1	20359	0,3
Cyanobacteria	1246	0,3	7805	0,7	4824	0,6	701	0,0	1576	0,2	942	0,2	17094	0,3
Chloroflexi	1608	0,4	4772	0,4	3913	0,5	1336	0,1	888	0,1	2440	0,4	14957	0,2
Candidate division SR1	1653	0,4	5034	0,5	1642	0,2	1175	0,1	738	0,1	621	0,1	10863	0,2
Nitrospirae	138	0,0	526	0,0	5473	0,7	1645	0,1	707	0,1	416	0,1	8905	0,1
Elusimicrobia	654	0,2	1683	0,2	843	0,1	4157	0,2	636	0,1	0	0,0	7973	0,1
Fusobacteria	0	0,0	1916	0,2	802	0,1	936	0,0	0	0,0	3520	0,6	7174	0,1
Synergistetes	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5822	0,6	0	0,0	5822	0,1
Candidate division TM7	251	0,1	2489	0,2	287	0,0	1091	0,0	1398	0,2	83	0,0	5599	0,1
Fibrobacteres	276	0,1	1513	0,1	1678	0,2	1022	0,0	257	0,0	96	0,0	4842	0,1
Armatimonadetes	0	0,0	751	0,1	1405	0,2	2409	0,1	0	0,0	0	0,0	4565	0,1
Spirochaetae	746	0,2	0	0,0	2626	0,4	66	0,0	161	0,0	0	0,0	3599	0,1
Outros	1782	0,5	3491	0,3	1919	0,3	6865	0,3	810	0,1	515	0,1	15382	0,3
Total	373268	100	1088789	100	744267	100	2324053	100	902980	100	571405	100	6004762	100

Quadro S2. Abundância combinada das bactérias e suas respectivas proporções em cada geração. Apresentação no nível taxonômico de ordem.

Ordem	G0		G1		G2		G3		G4		G5		Todos	
	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%	AC	%
Burkholderiales	44261	11,9	390164	35,8	107679	14,5	1259348	54,2	211748	23,4	104129	18,2	2117329	35,3
Enterobacteriales	53873	14,4	187578	17,2	136751	18,4	165917	7,1	171277	19,0	116061	20,3	831457	13,8
Pseudomonadales	21565	5,8	58268	5,4	74877	10,1	90007	3,9	103312	11,4	216408	37,9	564437	9,4
Flavobacteriales	13473	3,6	29792	2,7	26059	3,5	91685	3,9	114542	12,7	9215	1,6	284766	4,7
Rhizobiales	10556	2,8	61212	5,6	25847	3,5	74322	3,2	61315	6,8	21822	3,8	255074	4,2
Micrococcales	107356	28,8	16783	1,5	31513	4,2	36469	1,6	9023	1,0	6350	1,1	207494	3,5
Xanthomonadales	4960	1,3	77697	7,1	14872	2,0	18959	0,8	36659	4,1	7091	1,2	160238	2,7
Sphingobacteriales	10923	2,9	33659	3,1	34855	4,7	48764	2,1	23913	2,6	4465	0,8	156579	2,6
Rhodobacterales	248	0,1	1559	0,1	7544	1,0	74248	3,2	15276	1,7	6058	1,1	104933	1,7
Myxococcales	4841	1,3	12392	1,1	19532	2,6	43768	1,9	4248	0,5	6859	1,2	91640	1,5
Sphingomonadales	4772	1,3	13990	1,3	15368	2,1	41060	1,8	8491	0,9	3456	0,6	87137	1,5
Bacillales	24834	6,7	25516	2,3	7931	1,1	11661	0,5	4203	0,5	5777	1,0	79922	1,3
Clostridiales	3696	1,0	10117	0,9	14229	1,9	23954	1,0	14180	1,6	3790	0,7	69966	1,2
Neisseriales	6745	1,8	17264	1,6	20037	2,7	16069	0,7	5163	0,6	4039	0,7	69317	1,2
Lactobacillales	2031	0,5	9090	0,8	7894	1,1	24088	1,0	18867	2,1	1016	0,2	62986	1,0
Deinococcales	0	0,0	0	0,0	0	0,0	62320	2,7	0	0,0	0	0,0	62320	1,0
uncultured bacterium (SM2F11)	3375	0,9	7284	0,7	20603	2,8	11637	0,5	4641	0,5	2159	0,4	49699	0,8
Planctomycetales	3464	0,9	7504	0,7	10524	1,4	12032	0,5	11834	1,3	3918	0,7	49276	0,8
Subgroup 6 (Acidobacteria)	3037	0,8	10741	1,0	2953	0,4	19907	0,9	2908	0,3	1567	0,3	41113	0,7
Legionellales	5968	1,6	3690	0,3	14369	1,9	10715	0,5	1434	0,2	540	0,1	36716	0,6
Bdellovibrionales	1526	0,4	3399	0,3	7127	1,0	10956	0,5	12402	1,4	1112	0,2	36522	0,6
Rhodospirillales	418	0,1	2824	0,3	11190	1,5	10105	0,4	7310	0,8	2602	0,5	34449	0,6
Cytophagales	1973	0,5	6285	0,6	8526	1,1	11454	0,5	3876	0,4	102	0,0	32216	0,5
Corynebacteriales	3432	0,9	7108	0,7	6933	0,9	4803	0,2	6741	0,7	2810	0,5	31827	0,5
Verrucomicrobiales	1968	0,5	9662	0,9	5547	0,7	6957	0,3	605	0,1	3995	0,7	28734	0,5
Outros	33973	9,1	85211	7,8	111507	15,0	142848	6,1	49012	5,4	36064	6,3	458615	7,6
Total	373268	100	1088789	100	744267	100	2324053	100	902980	100	571405	100	6004762	100

Quadro S3. Abundância combinada total e suas proporções das 158 OTUs identificadas na ordem Burkholderiales.

OTU	Reads	%	OTU	Reads	%
GAJK01095101.106.1432	945091	44,6	JN869209.1.1529	616	0,0
KC000258.1.1363	601830	28,4	HQ385607.1.1378	554	0,0
EF018778.1.1384	62283	2,9	JX105682.1.1391	554	0,0
JN030506.1.1298	57868	2,7	AY662047.1.1526	542	0,0
AJ295350.1.1354	53847	2,5	FJ946555.1.1290	522	0,0
KF188943.1.1289	49292	2,3	EF554882.1.1455	506	0,0
EU706241.1.1234	30461	1,4	EU771583.1.1395	504	0,0
HE855909.1.1498	23521	1,1	JF922518.1.1493	503	0,0
AY250100.1.1457	18914	0,9	FN667261.1.1462	497	0,0
AY865607.1.1415	18628	0,9	HQ860533.1.1449	441	0,0
CU926220.1.1354	15164	0,7	FJ825549.1.1400	419	0,0
EU432170.1.1461	12353	0,6	HM481367.1.1457	400	0,0
EF555457.1.1469	11941	0,6	KF010745.1.1485	395	0,0
AB531408.1.1491	11384	0,5	FJ893771.1.1352	390	0,0
KF189035.1.1289	10521	0,5	FN563004.1.1426	384	0,0
JQ010850.1.1428	10439	0,5	KF188816.1.1250	375	0,0
EU790198.1.1235	9895	0,5	HM773494.1.1492	359	0,0
AB199569.1.1459	8437	0,4	AUOE02000013.7590.8819	349	0,0
HQ900361.1.1225	8206	0,4	JN868812.1.1526	324	0,0
FJ592517.1.1370	8035	0,4	HQ728216.1.1500	319	0,0
AJ421916.1.1408	6955	0,3	DQ497771.1.1403	290	0,0
JO171658.113.1331	6428	0,3	AJ575701.1.1473	285	0,0
JN379416.1.1496	6364	0,3	FJ946520.1.1290	275	0,0
AY683043.1.1366	5951	0,3	FJ946532.1.1290	269	0,0
JF135692.1.1356	5571	0,3	EU978820.1.1491	261	0,0
JF139691.1.1350	4917	0,2	KC189635.1.1488	255	0,0
KC424772.1.1493	4769	0,2	AB599922.1.1411	251	0,0
JQ867286.1.1402	4518	0,2	JF697399.1.1494	246	0,0
EU704796.1.1279	4403	0,2	JN869013.1.1524	240	0,0
JN217068.1.1494	3912	0,2	GQ379590.1.1240	230	0,0
HM480182.1.1485	3840	0,2	GQ079259.1.1354	225	0,0
EU636006.1.1407	3790	0,2	FJ849112.1.1451	220	0,0
HM341157.1.1356	3470	0,2	AY491563.1.1527	217	0,0
EF018476.1.1391	3380	0,2	EU801679.1.1492	212	0,0
EU802204.1.1416	3372	0,2	GQ140335.1.1422	205	0,0
KF771437.1.1507	2845	0,1	GQ007172.1.1352	193	0,0
HM481339.1.1460	2370	0,1	EU160498.1.1349	191	0,0
JX223693.1.1490	2363	0,1	HQ327264.1.1513	185	0,0
JQ278840.1.1492	2322	0,1	FQ659380.1.1350	181	0,0
AY379977.1.1431	2249	0,1	EF471692.1.1489	167	0,0
JN868782.1.1527	2199	0,1	KC002458.1.1389	166	0,0
FJ802287.1.1223	2086	0,1	KF385135.1.1392	165	0,0

OTU	Reads	%	OTU	Reads	%
JQ977543.1.1446	2045	0,1	CU922693.1.1343	164	0,0
FM200992.1.1338	1952	0,1	HM438647.1.1489	149	0,0
AY212572.1.1248	1950	0,1	JQ612522.1.1394	147	0,0
JX515499.1.1498	1925	0,1	GQ417789.1.1461	136	0,0
HQ121144.1.1504	1778	0,1	DQ824754.1.1391	134	0,0
EU704794.1.1277	1681	0,1	HM557329.1.1373	127	0,0
JX223276.1.1471	1659	0,1	GU208252.1.1440	124	0,0
EU538064.1.1396	1535	0,1	GABH01008814.1.1286	121	0,0
HE583162.1.1377	1512	0,1	FM204983.1.1452	119	0,0
CU925315.1.1355	1512	0,1	HQ178934.1.1456	115	0,0
DQ346467.1.1516	1450	0,1	KF010658.1.1492	114	0,0
JQ456217.1.1331	1381	0,1	AY958821.1.1462	113	0,0
FJ592528.1.1391	1263	0,1	AF076645.1.1451	108	0,0
EU800885.1.1470	1217	0,1	GQ379616.1.1236	106	0,0
FJ849072.1.1455	1209	0,1	KF385053.1.1517	105	0,0
EU790196.1.1206	1177	0,1	JN626864.1.1356	102	0,0
EF648100.1.1506	1152	0,1	JX222374.1.1497	97	0,0
FJ658524.1.1357	1110	0,1	AB696425.1.1468	94	0,0
AF078757.1.1437	1084	0,1	EU234173.1.1514	93	0,0
KC620901.1.1525	1067	0,1	AY622272.1.1455	92	0,0
JQ818823.1.1265	1061	0,1	EU801359.1.1495	89	0,0
JQ977317.1.1451	992	0,0	FJ946613.1.1290	88	0,0
JX223161.1.1283	991	0,0	GQ231336.1.1330	82	0,0
GU166159.1.1356	959	0,0	FN827311.1.1451	72	0,0
X95839.1.1523	959	0,0	FN667468.1.1462	68	0,0
KF698724.1.1398	906	0,0	JN869122.1.1525	63	0,0
HQ860588.1.1449	891	0,0	EU488023.1.1501	54	0,0
AF468322.1.1429	861	0,0	GQ181054.1.1441	52	0,0
EU799944.1.1268	788	0,0	HQ767162.1.1441	52	0,0
EU907888.1.1394	699	0,0	KC620930.1.1530	45	0,0
GU247463.1.1238	693	0,0	JF917188.1.1444	38	0,0
HM037993.1.1457	692	0,0	FJ854699.1.1223	36	0,0
JX223188.1.1364	684	0,0	DQ017931.1.1495	36	0,0
AY682678.1.1378	681	0,0	CP002663.3877248.3878693	31	0,0
AB680711.1.1458	650	0,0	FJ434213.1.1266	30	0,0
GU208407.1.1430	630	0,0	EU801851.1.1495	28	0,0
KF464379.1.1285	626	0,0	Total	2117329	100
FR846925.1.1351	617	0,0			

Quadro S4. Abundância combinada total e suas proporções das 39 OTUs identificadas na ordem Enterobacteriales.

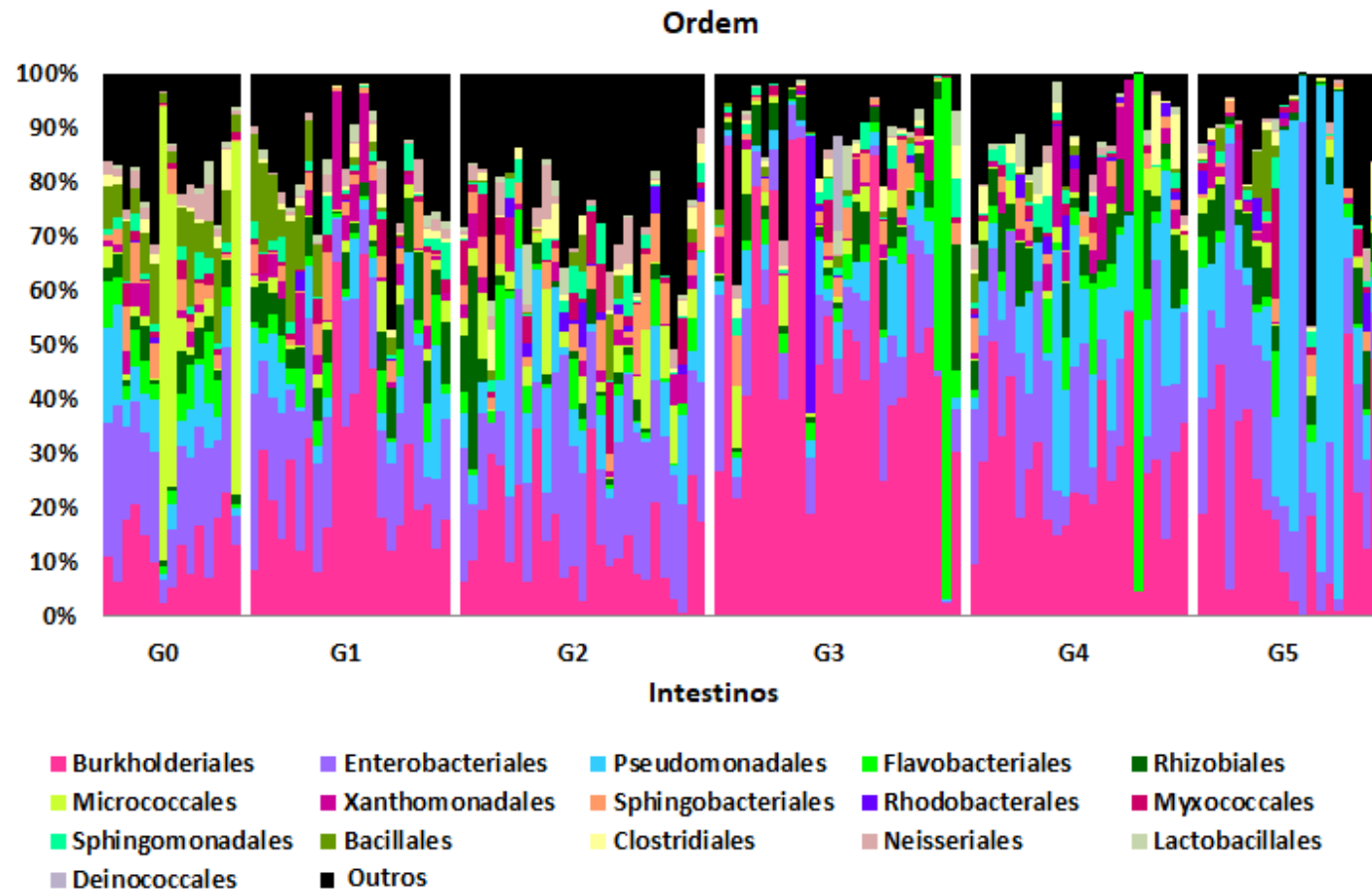
OTU	Reads	%
AB845279.1.1381	513423	61,5
GQ867408.1.1451	226650	27,1
JQ958876.1.1408	42286	5,1
DQ835530.1.1454	24685	3,0
AMQL0100001.12248.13793	7086	0,8
AF024608.1.1421	3434	0,4
GU339282.1.1496	3169	0,4
KC163803.1.1266	2152	0,3
CU915022.1.1359	1915	0,2
KF465820.1.1231	1478	0,2
FJ644573.1.1358	979	0,1
FJ268980.1.1454	887	0,1
KF464600.1.1265	862	0,1
DQ676288.1.1408	660	0,1
CU915091.1.1357	517	0,1
EF088376.1.1487	505	0,1
DQ278909.1.1419	491	0,1
GU826686.1.1256	479	0,1
AJKV01000019.72.1593	467	0,1
CU915089.1.1328	346	0,0
KC431794.1.1408	331	0,0
AB845266.1.1384	311	0,0
JF766421.1.1506	284	0,0
EU528229.1.1400	260	0,0
DQ456289.1.1457	236	0,0
HQ219947.1.1457	147	0,0
HM448993.1.1452	142	0,0
KF464921.1.1432	141	0,0
FJ628183.1.1501	107	0,0
KC755074.1.1504	84	0,0
HQ774435.1.1450	79	0,0
GU815104.1.1471	68	0,0
HQ728209.1.1508	68	0,0
EU939426.1.1510	56	0,0
EU776588.1.1254	54	0,0
FJ823007.1.1420	46	0,0
JF766458.1.1509	36	0,0
EU816587.1.1482	17	0,0
KC011147.1.1494	17	0,0
Total	834955	100

Quadro S5. Microbioma compartilhado. 67 OTUs encontradas em todas as gerações com a respectiva abundância (em porcentagem) em cada geração.

Microbioma compartilhado	G0	G1	G2	G3	G4	G5
JF772487.1.1459	0,2	0,1	0,5	0,2	0,3	0,0
DQ125677.1.1442	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
JF706644.1.1410	0,2	0,9	2,0	0,6	0,1	0,4
AY764159.1.1480	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0
HM326201.1.1345	0,4	0,5	0,6	0,2	0,1	0,2
KC734243.1.1310	0,1	0,1	0,4	2,1	10,8	0,0
FJ375487.1.1458	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0
AY856847.1.1449	0,7	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0
AB487542.1.1343	0,3	0,0	0,3	0,1	0,1	0,2
EU283364.1.1448	0,9	0,3	0,8	0,0	0,1	0,1
ASYG01000021.3312.4808	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
HE574373.1.1890	0,1	0,3	0,0	0,1	0,2	0,1
JQ966057.1.1416	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
FQ859183.1179124.1180623	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
JX040386.1.1468	0,4	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1
AB510988.1.1425	0,3	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0
KC967412.1.1394	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
FJ534990.1.1495	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
HG799952.1.1818	0,7	0,2	0,2	0,1	0,1	0,7
JQ448766.1.1407	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
CU920243.2.1323	0,3	0,3	0,4	0,0	0,3	0,2
AB845279.1.1381	8,9	8,8	10,9	4,5	11,2	16,6
GU724598.1.1386	0,3	0,9	0,6	0,5	0,3	0,8
GQ867408.1.1451	4,5	4,3	4,7	2,2	6,7	2,8
HF572853.1.1272	0,6	0,2	0,2	0,2	1,9	1,7
AB062283.1.1345	0,8	0,0	0,2	0,0	1,5	0,2
HM481335.1.1453	1,6	1,6	2,4	0,7	0,5	0,7
EU706241.1.1234	0,4	0,9	0,4	0,3	0,8	0,6
JQ010850.1.1428	0,3	0,1	0,5	0,1	0,1	0,2
AY865607.1.1415	0,2	0,6	0,3	0,0	0,6	0,5
FJ891018.1.1343	0,2	0,1	0,6	0,2	0,1	0,0
EU170548.1.1369	1,6	3,9	0,8	0,4	5,2	2,6
HM314278.1.1366	0,5	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1
KC000258.1.1363	3,4	4,1	3,1	19,4	5,5	3,5
HF572851.1.1257	0,2	0,3	0,7	0,0	0,8	0,6
DQ813307.1.1471	0,7	0,7	1,0	0,7	0,5	0,5
DQ803169.1.1336	0,0	0,2	1,4	0,0	0,4	0,1
AB199569.1.1459	0,2	0,1	0,4	0,0	0,2	0,1
AY250100.1.1457	0,8	0,3	0,6	0,2	0,2	0,2
JN030506.1.1298	0,9	1,9	0,5	0,5	1,3	1,1
HG780372.1.1269	0,1	0,2	1,1	0,5	0,0	0,0
JN379416.1.1496	0,3	0,2	0,0	0,0	0,1	0,3

Microbioma compartilhado	G0	G1	G2	G3	G4	G5
JQ958876.1.1408	0,1	2,7	0,6	0,1	0,5	0,1
EF018778.1.1384	1,1	2,0	0,4	0,2	2,5	1,3
KF188943.1.1289	0,1	0,7	0,5	1,3	0,7	0,2
KF464600.1.1265	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
JQ867286.1.1402	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
HM278065.1.1375	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2
GU563764.1.1499	0,3	0,7	0,8	0,1	1,2	0,6
EU432170.1.1461	0,4	0,1	0,8	0,1	0,2	0,1
JQ014191.1.1461	0,9	1,4	0,8	0,1	0,1	0,4
GAJK01095101.106.1432	0,1	21,6	1,9	28,5	0,2	5,6
KC429616.1.1348	0,0	0,4	0,1	0,2	0,1	0,3
HE855909.1.1498	0,2	0,6	0,3	0,0	1,4	0,2
FM200992.1.1338	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
AB531408.1.1491	0,4	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2
AB745642.1.1507	0,1	6,0	0,0	0,3	2,3	0,0
FN421850.1.1371	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
GQ480100.1.1429	0,2	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0
FJ592517.1.1370	0,1	0,2	0,6	0,0	0,0	0,1
EU817107.1.1400	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0
HM445088.1.1309	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
EU790198.1.1235	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
JN003060.1.1282	0,3	0,2	1,7	0,2	0,1	0,2
AM991239.1.1391	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0
HG529104.1.1303	0,4	0,2	0,6	0,3	0,0	0,2
CU926027.1.1324	0,1	0,2	0,6	0,1	0,0	0,2
Total	37,4	71,2	48,2	66,7	61,7	45,9

Figura S1. Perfil do microbioma intestinal de indivíduos de uma população de campo de *Ae. aegypti*, e das cinco gerações seguintes desenvolvidas em insetário. Apresentação no nível taxonômico de ordem.



B

Referências bibliográficas

ALPHEY, L. et al. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. **Pathog Glob Health**. v. 107, p. 170-179, 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2017.
http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201 (Acessado em 17/06/2018)

APTE-DESHPANDE, A. et al. *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-10, 2012.

BENNETT, K. E. et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, p. 85–92, 2002.

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

BLACK, IV W. C. et al. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**. v. 33, p. 379–388, 2002.

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.

BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, p. 1-15, 2012.

BRIONES, A. M. et al. *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. **The ISME Journal**. v. 2, p. 74–82, 2008.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**. v. 16, p. 1-8, 2016.

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

CHARAN, S. S. et al. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying

in vector competence to dengue virus. **Parasitol Res**. v. 112, p. 2627-2637, 2013.

CHAVSHIN, A. R. et al. Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles culicifacies*, a first step in a paratransgenesis approach. **Parasites & Vectors**. v. 7, p. 419, 2014.

CHENG, G. et al. Mosquito defense strategies against viral infection. **Trends Parasitol**. v. 32, p. 177-186, 2016.

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

CIRIMOTICH, C. M. et al. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. **Science**. v. 332, p. 855-858, 2011.

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, p. 225, 1994.

COON, K. L. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol.* v. 23, p. 2727-2739, 2014.

COON, K. L., BROWN, M. R., STRAND, M. R. Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors.** v. 9, p. 375, 2016.a

COON, K. L., BROWN, M. R., STRAND, M. R. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. **Molecular Ecology.** v. 25, p. 5806–5826, 2016.b.

CREAN, A. J. et al. Fitness consequences of larval traits persist across the metamorphic boundary. **Evolution.** v. 65, p. 3079–3089, 2011.

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.

CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature.** v. 534, p. 267-271, 2016. DADA, N. et al. Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. **Parasites & Vectors.** v. 7, p. 391, 2014.

DAMIANI, C et al. Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. **Microb Ecol.** v. 60, p. 644-654, 2010.

DAVID, J. P. et al. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Phil Trans R Soc B.** v. 368, p. 1-12, 2013.

DAVID, M. R. et al. Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 119, p. 577-587, 2016.

DE BLOCK, M. et al. Fitness effects from egg to reproduction: Bridging the life history transition. **Ecology.** v. 86, p. 185–197, 2005.

DICKSON, L. B. et al. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. **Sci Adv.** v. 3, p. 1-14, 2017.

DICKSON, L. B. et al. Diverse laboratory colonies of *Aedes aegypti* harbour the same adult midgut bacterial microbiome. **Parasit Vectors**. v. 11, p. 1-8, 2018.

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. 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.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Review**. v. 37, p. 699-735, 2013.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**. v. 352, p. 345-349, 2016.

FAVIA, G. et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 104, p. 9047-9051, 2007.

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.

FLOREZ, L. V. et al. Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. **Nature Communications**. v. 8, p. 1-9, 2017.

FREDERICKS, A. C. et al. The Burden of Dengue and Chikungunya Worldwide: Implications for the Southern United States and California. **Annals of Global Health**. v. 80, p. 466-475, 2014.

FREITAK, D. et al. The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. **Virulence**. v. 5, p. 547-554, 2014.

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.

HAMADY, M., LOZUPONE, C., KNIGHT, R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. **ISME J.** v. 4, p. 17-27, 2010.

KANTOR, I. N. Dengue, Zika Y Chikungunya. **Medicina (B Aires).** v. 76, 2016.

KATO, F.; HISHIKI, T. Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. **Viruses.** v. 8, p. 122, 2016.

KUCZYNSKI, J. et al. Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns. **Nat Methods.** v. 7, p. 813-819, 2010.

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.

MARTELLI, C. M. T. *et al.* Economic Impact of Dengue: Multicenter Study across Four Brazilian Regions. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 9, p. 1-19, 2015.

MERRITT, R. W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annu Rev Entomol.** v. 37, p. 349-376, 1992.

MINARD, G. *et al.* Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. **Parasit Vectors.**, v. 146, p. 1-12, 2013.

MINARD, G. et al. French invasive Asian tiger mosquito populations harbour reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. **Front. Microbiol.** v. 6, p. 970, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela. Informe nº 26, 2017/2018.

Acesso: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/07/af_informe-febre-amarela_12_6fev18-2.pdf

MOLL, R. M. et al. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis. **J. Med. Entomol.** v. 38, p. 29-32, 2001.

MONCAYO, A. C. et al. Meconial Peritrophic Matrix Structure, Formation, and Meconial Degeneration in Mosquito Pupae/Pharate Adults: Histological and Ultrastructural Aspects. **J. Med. Entomol.** v. 42, p. 939-944, 2005.

MONGODIN, E. F. et al. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. **PLoS Genet.** v. 2, 214, 2006.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLoS Comput Biol** v. 8, p. 12, 2012.

MORO, C. V. et al. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. **BMC Microbiology.** v. 13, p. 1-11, 2013.

MUSSO, D. *et al.* Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect.** v. 20, p. O595-O596, 2014.

MUTURI, E. J. et al. Comparative Analysis of Gut Microbiota of *Culex restuans* (Diptera: Culicidae) Females From Different Parents. **Journal of Medical Entomology.** v. 55, p. 163-171, 2017.

NEVES, D. P. Culicidae. In:__. **Parasitologia Dinâmica.** 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2009. cap. 52, p. 485-486.

ORMAETXE, I. I. *et al.* Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO Rep.** v. 12, p. 508-518, 2011.

OSEI-POKU, J. et al. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. **Molecular Ecology.** v. 21, p. 5138-5150, 2012.

Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO). Timeline of the emergence of Zika virus in the Americas. 2016. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959&Itemid=41711&lang=en (Acessado em 17/06/2018).

PITISUTTITHUM, P. & BOUCKENOOGHE, A. The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. **Expert Rev Vaccines.**

POWELL, J. R. & TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 108, p. 11-17, 2013.

RAHARIMALA, F. N. et al. Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. **Parasitol Res.** v. 115, p. 1391-1399, 2015.

RAMIREZ, J. L. et al. Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 6, p. 1-11, 2012.

RAMIREZ, J. L. et al. Chromobacterium Csp_P Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities. **PLoS Pathog.** v. 10, p. 1-13, 2014.

REY, J. R. & O'CONNELL, S. M. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. **J Vector Ecol.** v. 39, p. 190-196, 2014.

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.

RODGERS, F. H. et al. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. **PLoS Pathog** v. 13, p. 1-22, 2017.

ROMOSER, W. S.; ROTHMAN, M. E. The presence of a peritrophic membrane in pupal mosquitoes (Diptera: culicidae). **J Med Entomol.** v. 10, p. 312-314, 1973.

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.

SCHAFFNER, F. et al. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. **Clin Microbiol Infect.** v. 19, p. 685-692, 2013.

SIM, S. et al. Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. **PLoS Neg Trop Dis.** v. 7, p. 1-14, 2013.

SOUZA-NETO, J. A. et al. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 106, p. 17841-17846, 2009.

STATHOPOULOS, S. et al. Genetic Dissection of *Anopheles gambiae* Gut Epithelial Responses to *Serratia marcescens*. **PLoS Pathog.** v. 10, p. 1-19, 2014.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, p. 6, v. 45, n. 20, 2014,

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, p. 9, v. 46, n. 44, 2015.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, p. 14, v. 49, n. 24, 2018.

TAKKEN, W. & VERHULST, N. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. **Annu Rev Entomol.** v. 58, p. 433-453, 2013.

TERENIUS, O. et al. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 80, p. 556-565, 2012.

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.

WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors.** v. 8, p. 1-9, 2015.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS.Pathog.** v. 4, p. 1-12, 2008.

YADAV, K. K. et al. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. **Parasites & Vectors.** v. 8, p. 1-8, 2015.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 110, p. 569-572, 2015.

ZOUACHE, K. et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 75, p. 377-389, 2010.

ZOUACHE, K. et al. *Chikungunya* virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. **Mol Ecol.** v. 21, p. 2297-2309, 2012.