UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

MARIA RAQUEL GOMES FERNANDES

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS DA MICROBIOTA INTESTINAL E OVARIANA DO MOSQUITO A*edes aegypti*

Araraquara, SP
2023

MARIA RAQUEL GOMES FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Araraquara, SP

2023

Fernandes, Maria Raquel Gomes.
F541b Bioprospecção de bactérias com propriedades antivirais da microbiota intestinal e ovariana do mosquito *Aedes aegypti* / Maria Raquel Gomes Fernandes. – Araraquara: [S.n.], 2023.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Biotecnologia.

Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto.

1. *Aedes aegypti*. 2. Arbovírus. 3. Microbiota. 4. Intestino-médio. 5. Ovários. I. Souza Neto, Jayme Augusto, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

Impacto potencial dessa pesquisa

O intestino-médio e os ovários do mosquito *Aedes aegypti* são importantes órgãos no ciclo de transmissão dos arbovírus aos seres humanos ou à prole de mosquitos. A caracterização e avaliação antiviral das bactérias cultiváveis encontradas nesses órgãos pode ampliar o entendimento sobre a interação hospedeiro/microbiota e promover a elaboração de estratégias inovadoras de controle vetorial e terapias antivirais.

Potential impact by this research

The midgut and ovaries from *Aedes aegypti* mosquito are important organs in the arboviruses cycle transmission to humans or mosquito offspring. The profiling and antiviral assessment of the cultivable bacteria found in these organs can broaden the understanding of the host/microbiota interaction contributing to development of innovative strategies for vector control and antiviral therapies.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bioprospecção de bactérias com propriedades antivirais da microbiota intestinal e ovariana do mosquito *Aedes aegypti*

AUTORA: MARIA RAQUEL GOMES FERNANDES

ORIENTADOR: JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agronomicas do Câmpus de Botucatu da UNESP

Dra. MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia e Acarologia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. ADRIANO MONDINI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 28 de março de 2023

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, a minha família e amigos. Especialmente a minha saudosa avó Rody que mesmo que não tenha tido a oportunidade de finalizar a educação básica, sempre me incentivou a estudar enquanto esteve viva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pela oportunidade e privilégio de cumprir mais uma etapa de realização pessoal e profissional na minha vida. Por Ele ter colocado pessoas de boa índole no meu caminho para me ajudar ao longo dessa jornada, incluindo a minha família desde o início. Por Ele sempre enviar a Sua palavra e falar comigo para me confortar e renovar as minhas forças. Por Ele sempre ser a minha inspiração e propósito de vida.

Agradeço de coração a minha **família** que sempre esteve ao meu lado torcendo por mim diante dos desafios. Especialmente a minha mãe **Eliana** que não mediu esforços para me ajudar a realizar o meu sonho. Aos meus irmãos **Erick e Diogo** que sempre compartilharam palavras de conforto e carinho e ao meu pai **Edson** que sempre contribuiu com aquilo que estava ao seu alcance. E por fim, ao meu avô **João** que sempre acreditou no meu potencial. Eu amo muito vocês!

Agradeço as **duas famílias** que me acolheram em Botucatu enquanto desenvolvi os experimentos de mestrado, **Elenita e José** como também **Ivani e Misael,** sou muito grata a todos vocês pelo amor e carinho. Especialmente à **Arielle** com quem morei praticamente todo o meu mestrado, minha irmãzinha de coração, dedico toda a minha gratidão e consideração.

Agradeço **aos meus amigos** que sempre estiveram ao meu lado, mesmo que virtualmente, contribuindo com apoio, alegria e conselhos quando eu estive diante das adversidades. Vocês estão no meu coração!

Agradeço imensamente ao meu orientador **Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto** pela oportunidade de poder desenvolver um projeto de pesquisa maravilhoso e desafiador para o mestrado. Sou muito grata pela orientação, por compartilhar as suas experiências comigo e pela parceria. Também, agradeço de coração pelo apoio, motivação e conselhos ao longo do processo.

Agradeço imensamente aos meus colaboradores **Dr. Jacksson, Dra. Vanessa, Mestranda. Amanda, Dr. Elerson, Doutoranda. Lauana, Mestranda.**

Heloysa, Dr. Leonardo, Dra. Fabiana, Dra. Saura e Prof.ª Dra. Rejane pela parceria ao longo do desenvolvimento do projeto de pesquisa para o mestrado. Vocês contribuíram de forma significativa para que o trabalho fosse finalizado com êxito. Sou extremamente grata a todos vocês pelas conversas, compartilhamento de experiências, apoio e motivação. Especialmente a **Prof.ª Dra. Rejane** por ter permitido eu desenvolver a segunda parte dos meus experimentos em seu Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Agradeço aos membros da comissão que fizeram parte do meu exame geral de qualificação **(Prof.ª Dra. Mara, Dra. Marta e Prof. Dr. Vitor)** e defesa da dissertação **(Prof. Dr. Jayme, Dra. Marta e Prof. Dr. Adriano)**. Contribuíram de forma didática com sugestões construtivas que aperfeiçoaram a minha dissertação de mestrado. Sou muito grata a todos vocês.

Agradeço a todos os membros do **Laboratório Vectomics** e do **Laboratório de Biotecnologia Aplicada** do Hospital das Clínicas de Botucatu que me acolheram gentilmente durante o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa para o mestrado. Sou grata pelas conversas, pelo compartilhamento de experiências e aprendizados.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (PPG-BBAF)** por proporcionar uma experiência única e enriquecedora ao ser matriculada no curso de mestrado. Especialmente a todos os **Professores** que ministraram as aulas, ao **conselho do programa** e a toda **equipe técnica** que sempre esteve disposta a esclarecer as dúvidas. Sou muita grata também por ter tido a oportunidade de participar da comissão organizadora de vários eventos científicos da PPG-BBAF. Isso me proporcionou crescer em diversos aspectos além de conhecer pesquisadores incríveis.

Agradeço imensamente a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento do meu projeto de pesquisa para o mestrado **(nº do processo: 2019/19686-6)**. O apoio financeiro foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho e contribuição de novas evidências científicas para a área.

Agradeço ao **CNPq** pelo apoio financeiro e institucional ao **Laboratório de Biotecnologia Aplicada** do Hospital das Clínicas de Botucatu durante o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa para o mestrado.

Agradeço a **Prof.ª Dra. Cristiane** que foi minha orientadora de Iniciação Científica durante a graduação e que sempre me apoiou nas minhas decisões científicas, inclusive quando decidi mudar de área de pesquisa. Sou grata pelo trabalho que desenvolvemos juntas e que rendeu bons frutos. Também sou grata a todos os membros do grupo de pesquisa “Uso Racional de Medicamentos”, especialmente ao **Prof. Dr. Silvio** e a **Dra. Lívia**.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor dos arbovírus dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela e representa um grande problema de saúde pública. Os microrganismos simbiontes que constituem a microbiota do intestino-médio e ovários do *Ae. aegypti* podem interferir na replicação do arbovírus e consequentemente na sua competência vetorial. No entanto, pouco se sabe sobre as bactérias cultiváveis desses órgãos e seu papel na resposta antiviral. O objetivo do presente estudo foi identificar bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Ae. aegypti* com atividade antiviral contra o vírus da Zika (ZIKV). Após 24h e 72h do repasto sanguíneo pelos mosquitos fêmea *Ae. aegypti*, foram dissecados os intestinos-médio e ovários, semeados em ágar sangue e ágar chocolate e mantidos a 24ºC e 37ºC por 48h. A identificação das bactérias foi realizada *via* gene 16S rRNA por sequenciamento de *Sanger* e as sequências foram alinhadas e comparadas no *GenBank*, *SILVA Ribosomal RNA gene database project* e *Ribosomal Database Project* (RDP). Foram dissecados 42 intestinos-médio e ovários, 31 bactérias cultiváveis foram isoladas e identificadas. Houve o predomínio de bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Proteobacteria (71%), classe Gammaproteobacteria (71%) e ordem Enterobacteriales (61,3%). Em relação ao gênero, *Serratia* (35,6%) seguida da *Elizabethkingia* (25,8%), *Klebsiella* (16,2%), *Enterobacter* (9,6%), *Pseudomonas* (9,7%) e *Staphylococcus* (3,2%). Todos os gêneros de bactérias identificadas foram encontrados em ambos os órgãos, exceto *Staphylococcus* que foi apenas nos ovários. As espécies de bactérias pertencentes ao mesmo gênero compartilhadas no intestino-médio e nos ovários apresentaram pouca divergência entre si. Sendo assim, a composição da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários foi semelhante. Nenhum gênero causou redução ou inibição de ZIKV *in vitro*. Portanto, as bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários não mostraram atividade anti-ZIKV.

Palavras-chave: *Aedes aegypti,* arbovírus, microbiota, intestino-médio, ovários.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever arboviruses and represents a major public health problem. The symbiotic microorganisms from midgut and ovaries microbiota of *Ae. aegypti* can interfere with the replication of the arbovirus. Consequently, its vectorial competence. However, little is known about the cultivable bacteria from these organs and their role in the antiviral response. The objective from this study was to identify cultivable bacteria from midgut and ovaries microbiota of *Ae. aegypti* mosquito with antiviral activity against Zika virus (ZIKV). After 24h and 72h of blood meal by female *Ae. aegypti*, the midguts and ovaries were dissected, seeded on blood agar and chocolate agar and kept at 24ºC and 37ºC for 48h. Bacterial identification was performed *via* 16S rRNA gene by Sanger sequencing and the sequences were aligned and compared in GenBank, SILVA Ribosomal RNA gene database project and Ribosomal Database Project (RDP). 42 midguts and ovaries were dissected, 31 cultivable bacteria were isolated and identified. There was a predominance of gram-negative bacteria belonging to the phylum Proteobacteria (71%), class Gammaproteobacteria (71%) and order Enterobacteriales (61.3%). Genera *Serratia* (35.6%) followed by *Elizabethkingia* (25.8%), *Klebsiella* (16.2%), *Enterobacter* (9.6%), *Pseudomonas* (9.7%) and *Staphylococcus* (3.2%). All genera were found in both organs, except Staphylococcus which was found only in the ovaries. Bacteria species belonging to the same genera shared between midgut and ovaries showed little divergence between them. Therefore, the composition of the cultivable microbiota from midgut and ovaries was similar. No genera showed reduction or inhibition of ZIKV *in vitro*. Therefore, cultivable bacteria from midgut and ovaries microbiota did not show anti-ZIKV activity.

Keywords: *Aedes aegypti*, arbovirus, microbiota, midgut, ovaries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo..... 44
Figura 2. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo..... 44
Figura 3. Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo..... 45
Figura 4. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo.....45
Figura 5. Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo..... 46
Figura 6. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo.....46
Figura 7. – Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo..... 47
Figura 8. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo.....47
Figura 9. Caracterização das bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* segundo..... 51
Figura 10. Taxonomia da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do Aedes aegypti nos pontos de coleta 24h e 72h após o repasto sanguíneo.....52
Figura 11. Árvore fenética com as espécies dos gêneros das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti....* 53
Figura 12. Frequência das bactérias cultiváveis em ágar chocolate e ágar sangue presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti*.... 57
Figura 13. Diagrama de *Venn* mostrando o compartilhamento dos gêneros das bactérias cultiváveis presentes em ágar sangue e ágar chocolate a 24ºC e 37ºC..... 58
Figura 14. Células C6/36 de *Aedes albopictus.....* 59
Figura 15. Detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* nas alíquotas de DENV-4.....60
Figura 16. Detecção de Mycoplasma e Acholeplasma nas alíquotas de DENV-4 e ZIKV..... 61
Figura 17. Ausência de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* nas células Vero.....62

Figura 18. Infecção de DENV-4 e ZIKV nas células Vero.....63
Figura 19. Descontaminação de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* na alíquota de ZIKV63
Figura 20. Ensaio de placa para ZIKV.....64
Figura 21. Placas semeadas com o fator de diluição, número de diluições seriadas e volume de pipetagem padronizados..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alvos e tamanhos esperados dos *amplicons* 35
Tabela 2. Temperatura de incubação das bactérias isoladas da microbiota cultivável intestinal e ovariana 41
Tabela 3. Bactérias cultiváveis isoladas da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* 48
Tabela 4. Relação entre as bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* com o cultivo em ágar chocolate e ágar sangue a 24ºC e 37ºC 54
Tabela 5. Confirmação molecular de ZIKV 63
Tabela 6. Avaliação da atividade antiviral das bactérias cultiváveis isoladas da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* 66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ae. aegypti	***Aedes aegypti***
Anti-Anti	**Antibiótico-Antifúngico**
BHI	***Brain Heart Infusion***
cDNA	***Complementary DNA*** **- DNA complementar**
CFU	**Unidade formadora de colônia**
CHIKV	**Vírus do chikungunya**
CO_2	**Dióxido de carbono**
DENV	**Vírus da dengue**
DENV-4	**Vírus da Dengue sorotipo 4**
DMEM	***Dulbecco's Modified Eagle Medium***
DNA	**Ácido desoxirribonucleico**
DNAse	**Desoxirribonuclease**
EDTA	***Ethylenediaminetetraacetic acid*** **- Ácido etilenodiamino tetra-acético**
L	**Litro**
MEB	***Midgut Escape Barrier*** **- Barreira de escape do intestino-médio**
MIB	***Midgut Infection Barrier*** **– Barreira de infecção do intestino-médio**
miRNA	**microRNA**
mL	**Mililitro**
Ng	**Nanograma**
OMS	**Organização Mundial de Saúde**
Pb	**Pares de base**
PBS 1X	**Tampão fosfato-salino 1x**
PCR	***Polymerase chain reaction*** **- Reação em cadeia da polimerase**
PFU	**Unidade formadora de partícula**
rcf	***Relative centrifugal field*** **- Força Centrífuga Relativa**
RDP	***Ribosomal Database Project***
RNA	**Ácido desoxirribonucléico**
rRNA	**RNA ribossomaL**
SCZ	**Síndrome Congênita da Zika**
SFB	**Soro fetal bovino**
TCID50	***Median Tissue Culture Infectious Dose***

YFV	***Yellow fever virus* – Vírus da febre amarela**
ZIKV	**Vírus da Zika**
µL	**Microlitro**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1. O Vírus da Zika, um arbovírus preocupante 20
1.2. O vetor *Aedes aegypti* e a sua interação com o arbovírus 21
1.3. A microbiota do mosquito *Aedes aegypti* e seu papel na resposta antiviral. 24
1.4. Identificação molecular de bactérias *via* gene 16S ribossomal 25
1.5. Aplicações biotecnológicas de bactérias no controle da transmissão dos arbovírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* 26
2. OBJETIVOS 27
2.1. GERAL 27
2.2. ESPECÍFICOS 27
3. MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1. Parte I - Isolamento, identificação e caracterização da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti* 27
3.1.1. Colônia de *Aedes aegypti* população de Botucatu 28
3.1.2. Amostra de mosquitos fêmeas *Aedes aegypti* 28
3.1.3. Dissecção dos intestinos-médios e ovários 28
3.1.4. Amostra cultivável de intestino-médio e ovários 29
3.1.5. Meios de cultivo 29
3.1.6. Caracterização da microbiota cultivável utilizando uma técnica dependente de cultivo 30
3.1.7. Identificação das bactérias cultiváveis via 16S rRNA 30
3.1.8. Extração de DNA bacteriano 30
3.1.9. Amplificação do gene 16S rRNA 31
3.1.10. Purificação dos produtos de PCR utilizando beads magnéticas 31
3.1.11. Purificação em coluna dos produtos de PCR 32
3.1.12. Quantificação dos produtos de PCR purificados e Sequenciamento de Sanger..... 32
3.1.13. Processamento das sequências obtidas pelo Sequenciamento de Sanger..... 33
3.1.14. Construção da Árvore fenética 33
3.2. Parte II - Avaliação do potencial antiviral das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti* 33

3.2.1. Detecção de Mycoplasma e Acholeplasma 33
3.2.2. Extração de ácidos nucleicos 34
3.2.3. RT-PCR para detecção de Mycoplasma e Acholeplasma 34
3.2.4. Descontaminação de Mycoplasma e Acholeplasma 35
3.2.5. Confirmação do arbovírus 36
3.2.6. Extração de RNA 36
3.2.7. Tratamento do RNA com DNAse 37
3.2.8. Síntese de cDNA 37
3.2.9. Amplificação do gene da proteína não estrutural altamente conservada 5 (NS5) de Flavivírus 37
3.2.10. Cultivo celular de células C6/36 de Aedes albopictus 38
3.2.11. Cultivo celular das células Vero 38
3.2.12. Propagação viral 38
3.2.13. Ensaio de placa para a quantificação de ZIKV viáveis 39
3.2.14. Quantificação de bactérias em CFU/mL 39
3.2.15. Ensaio antiviral *in vitro* 40
3.2.16. Reagentes dos tratamentos 40
3.2.17. Preparo dos tratamentos para infecção das células Vero 42
3.2.18. Infecção das células Vero com os tratamentos 43
3.2.19. Análise estatística 43
4. RESULTADOS 43
4.1. Parte I - isolamento, identificação e caracterização da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti* 43
4.1.1. Dissecção dos mosquitos fêmeas e amostra cultivável do intestino-médio e dos ovários 43
4.1.2. Caracterização da microbiota cultivável e identificação das bactérias do intestino-médio e dos ovários via 16s rRNA 44
4.2. Parte II - Avaliação do potencial antiviral das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti* 59
4.2.1. Ensaio de placa para quantificação de ZIKV viáveis 59
4.2.2. Quantificação de bactérias em CFU/mL 64
4.2.3. Ensaio antiviral *in vitro* 65
5. DISCUSSÃO 66
6. CONCLUSÃO 70

REFERÊNCIAS 70
APÊNDICE 1 - Identificação das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* 78

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus da Zika, um arbovírus preocupante

A febre Zika é uma doença causada pelo vírus da Zika (ZIKV) que é constituído por uma fita simples positiva de RNA, envelopado e pertencente ao gênero *Flavivírus* e família *Flaviviridae*. Tendo em vista que o principal vetor do ZIKV é um artrópode, o mosquito *Aedes* aegypti, ele é denominado um arbovírus (1).

O ZIKV foi isolado e identificado pela primeira vez em macacos rhesus da floresta Zika em 1947 (África, Uganda) e em seres humanos na Uganda e República Unida da Tanzânia em 1952. Mais tarde, após sofrer mutações o ZIKV migrou para a Ásia (1983) e ocasionou surtos isolados fora desta região que foram intensificados na Polinésia Francesa em 2007, 2013 e 2014 (2).

Dessa forma existem duas linhagens principais de ZIKV, uma africana e outra asiática e ambas podem ser transmitidas aos seres humanos por meio do repasto sanguíneo realizado pela fêmea *Aedes aegypti* infectada, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Além disso, o ZIKV também pode ser transmitido da mãe para o feto durante a gestação (transmissão vertical), contato sexual, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (2, 3).

Anualmente é estimado que o *Aedes aegypti* esteja associado a 100-400 milhões de infecções pelo vírus da dengue (DENV) em seres humanos (4). Enquanto que cerca de 1,62 milhões de pessoas já tenham sido infectadas pelo ZIKV em mais de 70 países ao redor do mundo (2) levando a quadros de Síndrome Congênita da Zika (SCZ) e desencadeando doenças neurológicas como Síndrome de Guillain–Barré (5).

No Brasil, a presença de ZIKV foi confirmada em abril de 2015 através da técnica de PCR com amostras de casos suspeitos de pacientes da Bahia e Rio Grande do Norte e correspondeu à linhagem asiática (6). Neste mesmo ano foi estimado que tenham ocorrido 440.000-1.300.000 casos suspeitos e 2.975 casos de Zika associados a microcefalia no país, o que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarar estado mundial de emergência de saúde pública (7, 8).

O período de incubação do ZIKV ocorre em média de 3 a 12 dias e geralmente a maior parte das pessoas são assintomáticas ou apresentam sintomas brandos como febre, erupção cutânea, conjuntivite, dor muscular e articular, mal-estar e dor de

cabeça por até 14 dias (9). Entretanto, sintomas mais severos e preocupantes podem ser observados quando a transmissão do ZIKV ocorre durante a gestação. Por exemplo, microcefalia congênita, abortos, morte do feto, anormalidades oculares e do nervo óptico em recém-nascidos, entre outros (10, 11). Como também, o desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré, neuropatia e mielite têm sido desencadeadas após a infecção de ZIKV (5, 12).

Na ausência de medicamentos e vacinas seguros e eficazes para o tratamento da doença causada pelo arbovírus Zika (2), a principal forma de prevenção é através do manejo integrado de estratégias para o controle vetorial que consistem na remoção física de criadouros (controle físico), uso de pesticidas (inseticidas, repelentes, entre outros - controle químico) e microrganismos que apresentem atividade entomopatogênica (controle biológico) (13). No entanto, devido a problemas de resistência e intoxicação associados a pesticidas, o desenvolvimento e a adoção de novas e eficientes ferramentas que contenham a disseminação deste arbovírus são de fundamental importância (14).

Atualmente, as ferramentas de biologia molecular disponíveis permitem que alternativas inovadoras viáveis sejam estudadas como a geração de mosquitos refratários aos patógenos. Por meio da paratransgênese, há a possibilidade de conter a transmissão do arbovírus utilizando uma abordagem de controle da transmissão do patógeno e do vetor (15).

Em contrapartida, a existência de metabólitos secretados por bactérias simbiontes aos vetores que apresentem atividade anti-patógeno como candidatos a biofármacos, também consiste em uma estratégia inovadora que utiliza uma abordagem terapêutica para o tratamento e prevenção da doença causada pelo arbovírus (16, 17).

1.2. O vetor *Aedes aegypti* e a sua interação com o arbovírus

O mosquito *Aedes aegypti* pertence à família Culicidae, ao gênero *Aedes (18)* e foi reconhecido a primeira vez como vetor transmissor de arbovírus em Cuba (1900) por Walter Reed, Carlos Finlay e James Carroll (19). Além do *Ae. aegypti*, o mosquito *Aedes albopictus* também é o responsável pela transmissão dos arbovírus da Zika (ZIKV), dengue (DENV), febre amarela – *yellow fever virus* –(YFV) e chikungunya

(CHIKV). As epidemias causadas por esses arbovírus estão presentes em diversos países da África, Ásia, Oceano Índico, Pacífico, Europa e América (20, 21).

No Brasil, o *Aedes aegypti* desempenha com maior relevância seu papel na transmissão dos arbovírus devido a sua alta competência e capacidade vetorial. Além disso, é uma espécie altamente sinantrópica e antropofílica cuja atividade ocorre principalmente ao amanhecer e ao entardecer. Entretanto, devido as fêmeas *Ae. aegypti* serem voraz, o repasto sanguíneo pode ser realizado por elas a qualquer momento do dia. Enquanto que o *Aedes albopictus* está mais adaptado a ambientes selváticos (22, 23).

O ciclo de vida do *Aedes aegypti* compreende duas fases, aquática (ovo, larva e pupa) e alada/terrestre (mosquito adulto) (24). Após os ovos serem imersos em água por meio da oviposição dos mosquitos fêmea, as larvas eclodem e se desenvolvem em quatro estádios (25).

As larvas se alimentam principalmente de matéria orgânica em suspensão ou aderida às paredes ou sedimentos no fundo dos reservatórios. Alguns fatores ambientais influenciam o tempo de desenvolvimento das larvas como temperatura, disponibilidade de comida e densidade de larvas no criadouro. Porém, em condições ideais, o tempo médio para completar todos os estádios é de quatro a cinco dias (25).

Em compensação, o estágio das pupas dura em média dois dias (temperatura a 27ºC), não ocorre alimentação e é caracterizado por uma série de transformações internas que conduz à emersão do mosquito adulto (23). Após a emersão, os mosquitos adultos buscam ambientes úmidos, protegidos da luz e vento que geralmente são próximos a potenciais criadouros para que o ciclo seja iniciado novamente (23).

Os mosquitos adultos apresentam coloração escura com anelações prateadas no abdômen e pernas. Geralmente, as fêmeas são maiores que os machos, porém são diferenciados entre si pelas características morfológicas presentes na antena. Os machos possuem antenas emplumadas enquanto que nas fêmeas é observado o oposto (18).

A alimentação dos mosquitos adultos *Aedes aegypti* é baseada em soluções açucaradas presentes nas plantas como também o consumo obrigatório de sangue que é realizado somente pelas fêmeas (26). O repasto sanguíneo pela fêmea é primordial logo após a copulação com o macho visto que as proteínas necessárias para a maturação dos ovários e produção dos ovos são fornecidas pelo sangue (27).

Tendo em vista que o *Aedes aegypti* é antropofílico, a transmissão do arbovírus para o mosquito ocorre principalmente quando a fêmea realiza o repasto sanguíneo em um ser humano infectado (28). Por outro lado, existem outras formas de transmissão que ocorrem em menor frequência denominadas transmissão transovariana e sexual/venérea. Consistem na transmissão do arbovírus da fêmea *Ae. aegypti* para a prole de mosquitos durante a maturação e produção dos seus ovos como também na copulação do macho com a fêmea, respectivamente (29, 30).

Após o arbovírus ser ingerido durante o repasto sanguíneo, ele infecta o intestino-médio da fêmea *Aedes aegypti* e se replica no interior das células epiteliais, subsequentemente atingindo a hemolinfa e órgãos periféricos como o corpo gorduroso e as traqueias. Finalmente, o arbovírus atinge a cabeça e as glândulas salivares, podendo ser transmitido através da saliva para o ser humano durante o próximo repasto sanguíneo (31). Em geral este processo decorre de 7 a 14 dias e é chamado de período extrínseco de incubação que é o tempo decorrido entre a ingestão do arbovírus e sua disseminação até as glândulas salivares do mosquito (32, 33). Os arbovírus YFV e DENV começam a ser detectados nas glândulas salivares do *Ae. aegypti* em torno de 10 dias após a infecção (34) ao passo que ZIKV é aproximadamente 7-9 dias após a infecção (35, 36).

A transmissão do arbovírus pelo *Aedes aegypti* está diretamente relacionada à competência vetorial cuja definição é a capacidade do mosquito adquirir o patógeno e permitir a sua transmissão (37). Desta forma, a competência vetorial é governada por diversos fatores genéticos e ambientais/ecológicos que determinam a eficiência da infecção viral no vetor e influenciam diretamente a susceptibilidade do mosquito ao vírus (38). Após o repasto sanguíneo pela fêmea *Ae. aegypti*, o vírus deve vencer barreiras para o sucesso de sua infecção e transmissão pelo mosquito, tais quais: (i) a barreira de infecção do intestino-médio (MIB, *midgut infection barrier*) que impede o vírus de estabelecer uma infecção neste tecido; (ii) a barreira de escape do intestino-médio (MEB, *midgut escape barrier*) que bloqueia a disseminação das partículas virais para a hemolinfa e órgãos adjacentes (iii) a barreira de infecção da glândula salivar que impede a infecção do vírus neste tecido; (iv) a barreira de escape da glândula salivar que bloqueia a disponibilização das partículas virais na saliva do mosquito e que a fêmea seja capaz de transmiti-las no próximo repasto sanguíneo (39-41).

Alguns estudos observaram que o intestino-médio do *Aedes albopictus* foi mais suscetível à infecção pelo DENV comparado ao *Aedes aegypti* devido a diferença de

expressão do miRNA envolvido no processo. Entretanto, a disseminação subsequente de DENV do intestino médio é mais lenta em *Aedes albopictus*. Esse fato sugere diferenças interespecíficas tanto na competência do vetor quanto nos mecanismos moleculares responsáveis pela barreira de invasão do intestino médio (42).

1.3. A microbiota do mosquito *Aedes aegypti* e seu papel na resposta antiviral

A microbiota simbionte presente nos mosquitos exerce uma grande influência no desenvolvimento e funcionamento de diversos processos fisiológicos como digestão, nutrição, reprodução, sistema imunológico, entre outros. Além disso, estudos recentes têm mostrado a participação de bactérias em resposta a infecção de patógenos *in vitro* e *in vivo* nos mosquitos (14, 43, 44).

A microbiota intestinal do *Aedes aegypti* é um fator determinante na sua competência vetorial. Tendo em vista que pode agir diretamente e indiretamente na resposta antiviral do hospedeiro diminuindo ou aumentando a sua susceptibilidade ao patógeno (16, 45, 46).

A modulação da resposta imunológica do mosquito pelas bactérias pode ocorrer através da estimulação basal do sistema imunológico. Este cenário resulta em um aumento na produção das moléculas efetoras que podem atuar contra as infecções de patógenos (17, 47). Como por exemplo, alguns estudos mostraram a influência da microbiota intestinal do *Aedes aegypti* na ativação da via imunológica antiviral (48). Xi e colaboradores demonstraram o aumento da expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (defensina, cepropina, atacina, entre outros) nos mosquitos cuja microbiota foi preservada comparado aos mosquitos assépticos (49). Dessa forma, neste contexto a microbiota está mostrando um papel indireto na resposta antiviral do hospedeiro ao patógeno.

Além disso, a microbiota intestinal do mosquito também é capaz de secretar metabólitos que apresentam propriedades antivirais caracterizando uma resposta antiviral direta das bactérias ao patógeno (45). Como por exemplo, a degradação da proteína E presente no envelope do DENV ocasionada pela secreção dos metabólitos protease e aminopeptidase da bactéria *Chromobacteriaum* sp. que desestabiliza o vírus e impede a sua ligação e infecção às células hospedeiras do *Aedes aegypti* (17).

Em contrapartida, a microbiota intestinal do mosquito também é capaz de secretar metabólitos que modulam as barreiras físicas do hospedeiro caracterizando uma ação indireta das bactérias frente ao patógeno. No entanto, este cenário tem sido associado ao aumento da susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao arbovírus. Como por exemplo, a degradação de mucinas presentes no epitélio intestinal do *Ae. aegypti* por meio da secreção do metabólito *SmEnhancin* da bactéria *Serratia marcescens* que favorece a infecção de DENV e ZIKV (50). Ou ainda, o bloqueio da Proibitina presente no epitélio intestinal do *Ae. aegypti* por meio da secreção do polipeptídeo P40 da bactéria *Serratia odorífera* que também aumenta a sua susceptibilidade ao DENV (51).

Além da investigação do papel da microbiota intestinal na resposta antiviral do *Ae*des *aegypti*, nos últimos anos alguns estudos têm se dedicado em avaliar a diversidade da microbiota do ovário e glândulas salivares do *Ae. aegypti* que também influenciam na transmissão do arbovírus (52, 53). Porém, as informações publicadas na literatura sobre esse tipo de abordagem ainda são escassas.

Portanto, as bactérias simbiontes que constituem a microbiota do *Aedes aegypti* podem interferir na sua competência vetorial através da modulação direta e indireta da resposta antiviral do hospedeiro ao patógeno. Mais estudos são necessários para elucidar melhor os mecanismos envolvidos na interação do mosquito vetor, microbiota e patógeno na transmissão dos arbovírus (37).

1.4. Identificação molecular de bactérias *via* gene 16S ribossomal

Os métodos mais comuns utilizados na identificação molecular de bactérias são por meio do sequenciamento de genes universais como os de RNAs ribossomais (rRNA) 5S, 23S e 16S presentes nas bactérias. No entanto, a escolha do sequenciamento da subunidade menor do gene 16S rRNA (~1500pb) é favorecida pela presença de nove regiões hiper variáveis intercaladas (V1-V9) ao longo da sequência 16S altamente conservada que favorece o desenho de *primers* e identificação de características filogenéticas nos microrganismos (54, 55). Desta forma, o sequenciamento deste gene é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (56). As sequências obtidas referentes ao gene 16S rRNA das bactérias são comparadas em bancos de dados públicos como *GenBank*, SILVA *Ribosomal RNA gene database project* e *Ribosomal Database Project* (RDP). Vale ressaltar que o SILVA e RDP são bancos de dados mais apurados e específicos para

o gene 16S rRNA, portanto apresentam elevada relevância na identificação das bactérias (57). Todavia, vale ressaltar que a identificação molecular de bactérias a nível de espécie exige a análise de um conjunto mais amplo de genes sequenciados e comparados nesses bancos de dados.

1.5. Aplicações biotecnológicas de bactérias no controle da transmissão dos arbovírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*

A utilização de microrganismos simbiontes para reduzir a competência vetorial dos mosquitos na disseminação dos arbovírus é uma abordagem inovadora que vem ganhando força nos últimos anos. Tendo em vista que o uso da microbiota do mosquito como alternativa às estratégias tradicionais para o controle vetorial diminui os problemas enfrentados com a resistência aos pesticidas e efeitos negativos para o meio ambiente (14).

Neste sentido, a identificação de bactérias simbiontes do mosquito *Aedes aegypti* que apresentem elevado potencial antiviral contra o ZIKV podem proporcionar a geração de linhagens de mosquitos refratárias a este arbovírus. Por exemplo, a *Chromobacterium* sp. isolada do intestino-médio do *Ae. aegypti* diminuiu a sua susceptibilidade ao DENV (16). Resultado semelhante também foi encontrado com a *Lysinibacillus* sp. isolada do intestino-médio do *Ae. aegypti* ao infectá-lo com ZIKV (58).

Nos últimos anos, a paratransgênese tem se tornado uma forte tendência para o controle vetorial. Essa técnica consiste em modificar geneticamente microrganismos simbiontes e introduzi-los no vetor com a finalidade de expressarem moléculas anti-patógenos e diminuir a sua competência vetorial (44). Por exemplo, um estudo gerou cepas de bactérias pertencentes ao gênero *Serratia* capazes de expressar proteínas anti-*Plasmodium* e colonizar diversas espécies de *Anopheles* inibindo o desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* (59). Resultado semelhante foi encontrado com a bactéria pertencente ao gênero *Asaia* em mosquitos *Anopheles stephensi* com *Plasmodium berghei* (60).

Diferentemente da paratransgênese, outra abordagem crescente de controle vetorial e transmissão de patógenos que utiliza microrganismos simbiontes é a incompatibilidade citoplasmática gerada pela bactéria intracelular pertencente ao

gênero *Wolbachia* (14). Por exemplo, alguns estudos observaram que essa bactéria foi capaz de diminuir a susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao DENV (61).

Por outro lado, a identificação de bactérias simbiontes que sejam capazes de secretar metabólitos com atividade antiviral para o tratamento da doença causada pelo arbovírus, tem conquistado cada vez mais espaço como uma estratégia inovadora e promissora. Atualmente não existem medicamentos ou vacinas eficazes na prevenção da Zika. Deste modo, a existência de metabólitos anti-ZIKV como candidatos a biofármacos consiste em um forte apelo farmacêutico para o tratamento e prevenção desta doença. Poucos estudos têm se dedicado em investigar metabólitos com potencial atividade antiviral secretados por microrganismos simbiontes (16, 17, 62).

Neste sentido, a adoção de estratégias que envolvam o uso de bactérias no controle da transmissão do patógeno e do vetor ou como candidatas a produção de biofármacos, constituem uma justificativa forte para conter a disseminação da doença causada pelo arbovírus da Zika.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Identificar bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* capazes de inibir ou reduzir a replicação de ZIKV.

2.2. ESPECÍFICOS

Caracterizar a microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* (população de Botucatu/SP – Aaeg_BTU) *in natura*.

Identificar dentre as bactérias isoladas quais apresentam propriedades antivirais contra o ZIKV *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parte I - Isolamento, identificação e caracterização da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti*

3.1.1. Colônia de *Aedes aegypti* população de Botucatu

A colônia de mosquitos *Aedes aegypti* utilizada no presente estudo foi decorrente da coleta de 156 larvas em seis diferentes áreas do município de Botucatu/SP, no período entre novembro/2017 e setembro/2018 pela Dra. Vanessa Rafaela Carvalho, e vem sendo mantida sucessivamente em nosso laboratório. A manutenção desta colônia consistiu em manter todos os estágios de desenvolvimento do mosquito (larva, pupa e mosquito adulto) em condições padrões de insetário tais como temperatura a 27±1ºC, umidade relativa de 70±5% e fotoperíodo de 12h. Os mosquitos adultos foram providos com solução estéril de sacarose 10% (m/v) e alimentados com sangue comercial de carneiro Anilab® desfibrinado para maturação dos ovários, oviposição e posterior coleta de ovos.

3.1.2. Amostra de mosquitos fêmeas *Aedes aegypti*

Os ovos da população de mosquitos *Aedes aegypti* Botucatu mantida em nosso laboratório desde 2017 foram coletados e as larvas eclodidas de forma sincrônica por meio de um sistema a vácuo. Todos os estádios larvais do mosquito (L1, L2, L3 e L4) foram alimentados com ração para peixe ornamental TetraMin®. Com a emergência das pupas foi necessário transferi-las para recipientes contendo água de osmose reversa e armazená-las no interior de gaiolas providas com solução estéril de sacarose 10% (m/v) para emersão dos mosquitos adultos. Após cinco dias de emersão, os mosquitos adultos foram desprovidos de solução estéril de sacarose 10% (m/v) por 24h. Em seguida, foram alimentados com sangue comercial de carneiro Anilab® desfibrinado com o auxílio de alimentadores artificiais de vidro Isotemp Circulators 4100 H7 (Thermo Fisher Scientific®) e banho-maria de circulação externa que manteve o sangue comercial de carneiro Anilab® a 37ºC. Foram separadas duas amostras de mosquitos fêmea visivelmente ingurgitados para realizar a dissecção 24h (n=30) e 72h (n=35) após o repasto sanguíneo, e mantidas em gaiolas menores com solução estéril de sacarose 10% (m/v).

3.1.3. Dissecção dos intestinos-médios e ovários

A dissecção dos intestinos-médios e ovários foi adaptada conforme descrito na literatura (63). A superfície dos mosquitos fêmeas *Aedes aegypti* foi assepsiada com etanol 70% por 60 segundos e enxaguada por 60 segundos cinco vezes com água de osmose reversa por imersão. Em seguida, os intestinos-médios e ovários foram dissecados em tampão fosfato-salino 1x (PBS 1X) estéril com o auxílio de pinças e do microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss).

3.1.4. Amostra cultivável de intestino-médio e ovários

A dissecção do intestino-médio e ovário sucedeu 24h e 72h após o repasto sanguíneo. Cada *pool* de intestino-médio e ovário dissecado foi armazenado em banho de gelo nos seus respectivos microtubos contendo tampão fosfato-salino-estéril 1x (PBS 1X) estéril e macerado com o auxílio de pistilo autoclavado.

3.1.5. Meios de cultivo

A escolha dos meios de cultivo para semear as bactérias do intestino-médio e ovários visou a não-seletividade e riqueza de nutrientes para isolar a maior diversidade possível de bactérias. Portanto, os ágares chocolate e sangue foram os escolhidos e preparados seguindo as instruções do fabricante Kasvi®. Brevemente, 40g de ágar sangue foi diluído em 1L de água osmose reversa e aquecido a 121ºC por 15 minutos. Quando a temperatura atingiu 50ºC foi adicionado em assepsia 50mL de sangue comercial de carneiro Anilab® desfibrinado e distribuído nas placas de petri. Enquanto que para o ágar chocolate, foi seguido as mesmas instruções que o ágar sangue, porém o sangue comercial de carneiro Anilab® desfibrinado foi adicionado logo após aquecer a mistura a 121ºC por 15 minutos. Para o isolamento das colônias de bactérias foi utilizado o ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e preparado seguindo as instruções do fabricante Kasvi®. Brevemente, 52g de ágar BHI foi diluído em 1L de água osmose reversa, aquecido a 121ºC por 15 minutos e distribuído nas placas de petri. Já para a preservação das colônias isoladas foi utilizado o caldo BHI Kasvi® com 30% de glicerol (v/v). Brevemente, 37g de caldo BHI foi diluído em 1L de água osmose reversa, aquecido a 121ºC por 15 minutos e distribuído nos tubos de Falcon. Em seguida, cada colônia isolada foi inoculada em seu respectivo tubo de Falcon e mantida sob agitação a 24ºC e 37ºC por 24 horas. Logo após, o glicerol esterilizado

foi adicionado (30% (v/v) em assepsia ao caldo com as bactérias e homogeneizado. Os isolados foram distribuídos em microtubos e preservados a -80ºC.

3.1.6. Caracterização da microbiota cultivável utilizando uma técnica dependente de cultivo

A caracterização foi adaptada conforme descrito na literatura (64). Cada *pool* de intestino-médio e ovários macerados foi diluído serialmente por quatro vezes em PBS 1X (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000) nos seus respectivos microtubos. O extrato bruto e as diluições foram semeados com o auxílio de pérolas de vidro (diâmetro 5mm) Laborglas® em placas de Petri contendo ágar chocolate e ágar sangue, mantidas a 24ºC e 37ºC em estufas *Refrigerated Incubator Shaker* (Amerex Instruments, Inc) e *General Purpose Incubator SL* (Shel lab®), respectivamente, por 48h para obter o *pool* de bactérias cultiváveis. Em seguida, o isolamento das colônias em ágar BHI foi realizado baseado nas características morfológicas aplicando a técnica de semeadura por esgotamento. As placas foram mantidas a 24ºC e 37ºC nas respectivas estufas por 48h. Os isolados bacterianos foram preservados em caldo BHI Kasvi® com 30% de glicerol (v/v) a -80ºC.

3.1.7. Identificação das bactérias cultiváveis via 16S rRNA

O sequenciamento da subunidade menor do gene 16S rRNA de cada isolado foi realizado por meio do Sequenciamento de Sanger. Para isso, foi necessário o preparo das amostras de bactérias através das etapas de extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA bacteriano através da reação em cadeia da polimerase (PCR), purificação e quantificação dos produtos de PCR para o Sequenciamento de Sanger.

3.1.8. Extração de DNA bacteriano

A extração dos ácidos nucleicos das células bacterianas foi realizada através do choque térmico. Brevemente, cada colônia bacteriana isolada foi homogeneizada em um microtubo contendo 500µL de água de osmose reversa autoclavada seguido de aquecimento a 99ºC por 10 minutos no termociclador *Mastercycler Pro*

(Eppendorf®). Em seguida, a amostra foi colocada em banho-de-gelo por 10 minutos para prosseguir para a amplificação do gene 16S rRNA bacteriano. O DNA bacteriano extraído foi armazenado em freezer a -20ºC.

3.1.9. Amplificação do gene 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA referente à subunidade menor do ribossomo bacteriano foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com o *primer forward* (16S08F: GYCCADACWCCTACGG) e *primer reverse* (16S08R: CACGAGCTGACGAC) (65) cuja porção amplificada corresponde a um fragmento de aproximadamente 700pb e compreende as regiões hipervariáveis V2 a V6 do gene 16S rRNA. Os reagentes utilizados na PCR foram 12,5µL de Taq DNA Polimerase 2X *Master Mix RED* (Neobio®), 7,5µL de água livre de nuclease, 3µL de DNA, 1µL de 16S08F (10µM) e 1µL de 16S08R (10µM), totalizando 25µL. Estes volumes de reagentes foram duplicados em uma segunda PCR quando a concentração medida no espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific® NanoDrop fosse inferior a 20µg/µL do DNA purificado. A PCR foi conduzida no termociclador *Mastercycle Nexus X2*(Eppendorf®) com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos seguida de 30 ciclos constituídos por etapas de desnaturação a 94°C por 45 segundos, hibridização dos *primers* a 50°C por 30 segundos e extensão da fita a 72ºC por 1 minuto e uma extensão de fita final a 72ºC por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador UV em géis de agarose a 1%.

3.1.10. Purificação dos produtos de PCR utilizando beads magnéticas

Os *amplicons* foram purificados com o sistema de partículas magnéticas ou *beads* magnéticas (AMPure Agencourt®) e com o auxílio do suporte magnético Thermo Fisher Scientific®. A partícula magnética é formada por uma região que se liga ao DNA amplificado e outra que é atraída por magnetismo. Consequentemente, ao homogeneizar as partículas com o material amplificado, todo o DNA é ligado a elas. Portanto, o produto amplificado foi homogeneizado com as partículas magnéticas, transferido para a placa de 96 poços e posicionado sobre o suporte magnético de modo que as partículas se agrupassem na parede do recipiente formando um *pellet*. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas duas lavagens com

etanol 70% recém-preparado. Para a dissociação do DNA das partículas magnéticas, a placa de 96 poços foi retirada do suporte magnético e foi adicionada água livre de nuclease no pellet seguida de homogeneização. Em seguida, a placa foi novamente colocada no suporte magnético e o sobrenadante (*amplicon* purificado) foi armazenado e preservado a -20ºC.

3.1.11. Purificação em coluna dos produtos de PCR

Quando não foi possível purificar os produtos de PCR por meio de *beads* magnéticas foi empregado a purificação em coluna. Os produtos de PCR foram purificados utilizando colunas seguindo as instruções descritas no QIAquick® PCR *Purification Kit* que consiste basicamente em etapas de lavagens e eluição do DNA. Brevemente, foi adicionado 5x o volume do produto de PCR do reagente Buffer PB para 1x volume do produto de PCR e homogeneizada a mistura. Em seguida, a mistura foi transferida para a coluna e encaminhada para centrifugação por 60 segundos a 14.500rcf. O fluxo residual foi descartado. Em seguida foram adicionados 750µL de Buffer PE à coluna. Logo após, a coluna foi centrifugada duas vezes (60 segundos a 14.500rcf) e descartado o fluxo residual. Por fim, o DNA foi eluído em 30µL de Buffer EB e após 60 segundos de espera, a coluna foi centrifugada novamente (60 segundos a 14.500rcf). O fluxo da última centrifugação (produto de PCR purificado) foi armazenado e preservado a -20ºC.

3.1.12. Quantificação dos produtos de PCR purificados e Sequenciamento de Sanger

Após os produtos de PCR terem sido purificados por coluna ou *beads* magnéticas, eles foram quantificados por meio do espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific® NanoDrop. As amostras foram ajustadas na concentração de 20 ng/µL e enviadas para realizar o sequenciamento com os primers da PCR descritos acima. O sequenciamento de Sanger foi realizado pelo Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu (IBTEC/UNESP) por meio do sequenciador automático ABI 3500 Thermo Fisher Scientific® (Sequenciamento Sanger - Unesp - Instituto de Biotecnologia - Câmpus de Botucatu). E, no laboratório de Biotecnologia Pesquisa e Inovação (BPI)

por meio do sequenciador automático ABI 3730xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®) (Sequenciamento Sanger – BPI).

3.1.13. Processamento das sequências obtidas pelo Sequenciamento de Sanger

As sequências obtidas foram acuradas visualmente, corrigidas manualmente e alinhadas através do método ClustalW utilizando o programa MEGA versão 11.0.13 (66) e comparadas àquelas disponíveis no *GenBank* (Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query (nih.gov), SILVA *Ribosomal RNA gene database project* (https://www.arb-silva.de) e *Ribosomal Database Project* (RDP) (http://rdp.cme.msu.edu/).

3.1.14. Construção da Árvore fenética

A árvore fenética foi construída alinhando as sequências consenso dos isolados de bactéria com o programa MAFFTversão 7 (67) utilizando os parâmetros padrão. Em seguida, o dendrograma foi construído por meio do método *Neighbor-Joining* e, para suporte de clado, foi usado o método *bootstrap* com 1000 pseudoreplicatas. Para a edição da árvore foi utilizado o software online *Interactive Tree Of Life* (68).

3.2. Parte II - Avaliação do potencial antiviral das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti*

Antes de padronizar a quantificação viral e bacteriana para iniciar os ensaios antivirais *in vitro*, foi realizado o teste de detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* nas alíquotas virais e celular. Além disso, a alíquota viral de arbovírus foi confirmada seguida de cultivo celular, propagação viral e quantificação de vírus e bactérias.

3.2.1. Detecção de Mycoplasma e Acholeplasma

A realização deste experimento consistiu na extração de ácidos nucleicos presente na amostra e reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-PCR).

3.2.2. Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos presente na amostra foi realizada com o Kit da Bio Gene® cujas orientações de preparo foram seguidas. Brevemente, 200µL da amostra foram adicionados a 200µL de Tampão de Lise (Hidrocloreto de Guanidina) e 5,6µL de Carrier RNA (Ácido Poliadenílico) para extração dos ácidos nucleicos. Em seguida, foram realizadas as etapas de lavagens com Etanol 96%-100%, reagente de lavagem1(Hidrocloreto de Guanidina, TRIS-HCl), e reagente de lavagem 2 (TRIS-HCl, SDS). Logo após, os ácidos nucleicos foram eluidos em água livre de nuclease a 70ºC, incubados por 5 minutos a temperatura ambiente e preservados a -20ºC.

3.2.3. RT-PCR para detecção de Mycoplasma e Acholeplasma

A detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* foi efetuada pela técnica de reação em cadeia polimerase em tempo real (RT-PCR) com três *primers* forward (MF: TCTGAAT(C/T)TGCCGGGACCACC – para seis espécies de *Mycoplasma*; PF: GGAAAATGTTATTTTGACGGAACCT – somente para *M. pirum*; AF: GGAATCCCGTTTGAAGATAGGA – somente para *A. aidlawii*) e um *primer* reverse (MR: CTTTCC(A/C)TCAC(G/T)GTACT(A/G)GTTCACT - para as espécies de *Mycoplasma* e *Acholeplasma*). Esses *primers* amplificam a região do gene RNA ribossomal 23S das principais espécies associadas à contaminação de cultura celular *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. pirum* e *Acholeplasma laidlawii*. O tamanho esperado dos *amplicons* gerados estão descritos na tabela abaixo **(Tabela 1)** (69). Brevemente, os reagentes utilizados foram: 5,1µL de água livre de nuclease, 0,2µL do *primer* MF (10µM), 0,2µL do *primer* PF (10µM), 0,2µL do *primer* AF (10µM), 0,3µL do *primer* MR (10µM), 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 2x (Promega®) e 4µL de DNA, totalizando 20µL. Para a programação da RT- PCR foram utilizadas as seguintes etapas: 95°C por 3 minutos para desnaturação inicial da dupla fita; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação da dupla fita) e 65ºC por 60 segundos (hibridização dos *primers* e extensão da fita); para a curva de *Melting* foram utilizados os seguintes parâmetros: 95°C por 15 segundos, 65ºC por 60 segundos, 95°C por 30 segundos e 65ºC por 15 segundos.

Tabela 1. Alvos e tamanhos esperados dos *amplicons*

Par de *primers*	**Alvo**	**Tamanho do *amplicon* (pb)**
MF-MR	*M. arginini* *M. fermentans* *M. hominis* *M. hyorhinis* *M. orale* *M. salivarium*	77
PF-MR	*M. pirum*	93
AF-MR	*A. laidlawii*	86

Legenda: MF-MR: *primers forward* e *reverse* para seis espécies de *Mycoplasma*. PF-MR: *primers forward* e *reverse* somente para *M. pirum*. AF-MR: *primers forward* e *reverse* somente para *A. aidlawii*. Fonte: Adaptação de Ishikawa e colaboradores (69).

3.2.4. Descontaminação de Mycoplasma e Acholeplasma

A descontaminação das alíquotas virais aconteceu simultaneamente com a propagação viral em células Vero na presença do antibiótico ciprofloxacino até a RT-PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* indicar resultado negativo na amostra de interesse. Brevemente, o meio de cultivo foi removido do frasco de cultura celular de 25cm^2 cuja células apresentaram uma confluência ≥80%. Em seguida, foi adicionado 300µL do meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Invitrogen®) 10% inativado, 1% de antibiótico/antifúngico, 0,5% de antibiótico ciprofloxacino e 200µL da alíquota viral. Em seguida, o frasco de cultura celular foi colocado em um agitador gangorra (K40- 3012 - Kasvi) a 37ºC e 5% CO_2 por 60 minutos. Logo após, o sobrenadante do frasco de cultura celular foi descartado e adicionado 6mL do meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Invitrogen®) 10% inativado, 1% de antibiótico/antifúngico e 0,5% de antibiótico ciprofloxacino. Depois, as células infectadas com os vírus foram incubadas a 37ºC e 5% CO_2 por 2 dias para propagação viral. Em seguida, o sobrenadante do frasco de cultura celular foi centrifugado a 2.880rcf por 5 minutos, aliquotado em volume de 800µL e preservado a -80ºC para posterior teste de detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma*. O *pellet* contendo os debris celulares foi descartado.

3.2.5. Confirmação do arbovírus

Embora esteja descrito nos objetivos realizar os ensaios antivirais com ZIKV, inicialmente foi proposto trabalhar com DENV-4 seguido de ZIKV caso houvesse alguma intercorrência durante a execução dos experimentos. A alíquota de DENV-4 foi cedida ao nosso laboratório de pesquisa pelo professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior. Enquanto que a alíquota de ZIKV foi cedida pelo Prof. Dr. João Trindade Marques. Este ZIKV foi originalmente isolado em Recife (Zika BR) e disponibilizado pela Rede Zika para todos os pesquisadores do Brasil. A confirmação dos arbovírus foi realizada através do sequenciamento da região do gene da proteína não estrutural altamente conservada 5 (NS5) (70). Para isso, foi necessário o preparo das amostras virais para o Sequenciamento de *Sanger* através das etapas de extração de RNA, tratamento com DNAse, síntese de cDNA, amplificação do gene da proteína não estrutural altamente conservada 5 (NS5) através da PCR, purificação dos produtos de PCR (descrito acima) e quantificação dos produtos de PCR purificados para o Sequenciamento de *Sanger* (descrito acima).

3.2.6. Extração de RNA

A extração de RNA das alíquotas virais de DENV-4 e ZIKV preservadas a -80ºC foi realizada por meio do método químico utilizando Trizol® Reagent (Life Technologies). Brevemente, 200μl de Trizol® Reagent (Life Technologies) foi homogeneizado com 150μl da alíquota viral seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos com posterior adição de 40μl de clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 15.000rcf por 15 minutos a 4°C. A parte aquosa (fase superior) foi transferida para um novo microtubo e neste foi adicionado 100μL de isopropanol gelado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Na sequência, o microtubo foi novamente centrifugado a 15.000rcf por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado com cuidado para não eliminar o *pellet* de RNA durante o processo. Então, o *pellet* foi lavado com 200μL de etanol 75% e depois centrifugado a 8.600rcf por 5 minutos a 4°C. O etanol 75% foi descartado e o microtubo deixado aberto para

secagem. O RNA foi ressuspendido em 50µL de água livre de nuclease e preservado a -80°C.

3.2.7. Tratamento do RNA com DNAse

Após a extração e isolamento do RNA das alíquotas virais, em microtubos foram adicionados 2µL do RNA extraído, 1µL de tampão 10X de reação para DNase, 2µL de DNAse, 5µL de água livre de nuclease, totalizando 10µL de reação que foram colocados a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

3.2.8. Síntese de cDNA

Antes de realizar a síntese de cDNA a partir do RNA viral foi necessário realizar o tratamento com EDTA que é responsável por inativar a DNAse. Então, logo após a finalização da incubação do tratamento do RNA com DNAse foi acrescentado 1µL de EDTA 25 mM e depois o microtubo foi incubado a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada amostra 1µL de Random *primers* e incubadas a 65ºC por 5 minutos. A síntese de cDNA foi realizada com o kit *RevertAid Fisrt Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). As reações foram preparadas seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, foram adicionados 4µL de tampão 5x de reação, 1 µL da enzima RiboLock RNAse, 2µL de Mix de dNTP e 1µL da enzima RevertAid (transcriptase reversa) em cada microtubo contendo as amostras. Logo após, os microtubos foram incubados a 25ºC por 5 minutos, seguidos de 42ºC por 1 hora e 30 minutos e finalizando com 70ºC por 5 minutos. As amostras foram diluídas 10 vezes e preservadas a -20ºC.

3.2.9. Amplificação do gene da proteína não estrutural altamente conservada 5 (NS5) de Flavivírus

A confirmação da alíquota foi efetuada pelo sequenciamento da região da proteína não estrutural altamente conservada 5 (NS5) de *Flavivírus*. Sendo assim, foi empregada a técnica de PCR para amplificar essa região utilizando o *primer* universal para *Flavivírus* forward (FLAF: GGTCTCCTCTAACCTCTAG) e reverse (FLAR: GAGTGGATGACCACGGAAGACATGC) cujo fragmento corresponde a 675pb (70,

71). Brevemente, os reagentes utilizados foram: 12,5µL de Taq DNA Polimerase 2X *Master Mix RED* (Neobio®), 1µL FLAF (10µM), 1µL FLAR (10µM), 3µL de cDNA e 7,5µL de água livre de nuclease, totalizando 25uL. Para a programação da PCR foram utilizadas as seguintes etapas: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 53°C por 30 segundos para a hibridização dos *primers*, 72ºC por 60 segundos para a fase de extensão da fita e extensão final 72ºC por 5 minutos (70).

3.2.10. Cultivo celular de células C6/36 de Aedes albopictus

A linhagem celular de *Aedes albopictus* C6/36 foi obtida através do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em frascos de cultura celular de 25cm^2 com meio de cultivo DMEM 1X (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino (SFB - Invitrogen®) 10% inativado, 1% L-glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais e 0,4% do antibiótico gentamicina a 28ºC e 5% CO_2.

3.2.11. Cultivo celular das células Vero

A linhagem de células Vero utilizadas para o cultivo, propagação e infecção de arbovírus foi a *Vero - CCL-81™ - ATCC®*. Brevemente, as células foram mantidas em frasco de cultura celular de 75cm^2 com meio de cultivo DMEM 1X (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma®) suplementado com soro fetal bovino (SFB - Nova Biotecnologia®) 10% inativado e 1% de antibiótico/antifúngico a 37ºC e 5% CO_2.

3.2.12. Propagação viral

A infecção viral ocorreu em frascos de cultivo celular cujas células apresentaram uma confluência 100%. Brevemente, o meio de cultivo foi removido do frasco de cultura celular de 75cm^2, adicionado 800µL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma®) suplementado com soro fetal bovino (SFB - Invitrogen®) 10% inativado, 1% de antibiótico/antifúngico e 200µL de alíquota viral. Em seguida, o frasco de cultura celular foi colocado em um agitador gangorra (K40- 3012 - Kasvi) a 37ºC e 5% CO_2 por 60 minutos. Logo após, o sobrenadante do frasco de cultura celular foi descartado e adicionado 12mL de meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle*

Medium - Sigma®) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Nova Biotecnologia®) 2% inativado e 1% de antibiótico/antifúngico. As células infectadas com os vírus foram incubadas a 37ºC e 5% CO_2 por 2 dias. Após observar o efeito citopático ocasionado pela propagação do vírus nas células Vero do frasco de cultivo celular, o sobrenadante foi transferido para o tubo de Falcon, centrifugado a 2.880rcf por 5 minutos, aliquotado e preservado a -80ºC. O *pellet* contendo os debris celulares foi descartado.

3.2.13. Ensaio de placa para a quantificação de ZIKV viáveis

Este ensaio foi realizado com o propósito de quantificar vírus viáveis através da formação de placas de lise devido a morte celular ocasionada pela propagação viral nos poços de cultura celular. Brevemente, quando as células Vero apresentaram uma confluência de 100% nos poços das placas de 06 poços, o meio de cultivo foi descartado e realizada a infecção viral com as diluições seriadas de vírus (1:10; $1:10^2$; $1:10^3$; $1:10^4$; $1:10^5$; $1:10^6$ e $1:10^7$) em triplicata. As células infectadas foram incubadas sob agitação por 60 minutos a 37ºC e 5% CO_2. Em seguida, foi descartado o sobrenadante de cada poço e adicionado 3mL de DMEM 2x diluído no ágar Noble ou ágar-ágar. Após o ágar ter solidificado, as placas foram invertidas e colocadas na estufa por até sete dias a 37ºC e 5% CO_2. Logo após ocorreu a fixação e coloração das placas utilizando o formaldeído e o azul de metileno, respectivamente, para que fosse possível visualizar as placas de lise formadas devido a propagação viral. O cálculo para quantificar os vírus viáveis em PFU/mL foi obtido por meio da seguinte fórmula: P = Z x R. Onde, P: volume do inóculo, Z: média do nº de placa de lise e R: fator de diluição.

3.2.14. Quantificação de bactérias em CFU/mL

A quantificação das bactérias isoladas foi baseada na relação entre a absorbância e plaqueamento do inóculo em ágar BHI. Brevemente, o isolado de bactéria escolhido foi recuperado em ágar BHI durante 24h com a sua respectiva temperatura de incubação (24ºC). A confirmação de inexistência de contaminação foi comprovada por meio da observação de características morfológicas das colônias na placa. Em seguida, foi preparado o pré-inóculo semeando a colônia em caldo BHI e incubando por 17h a 24ºC sob agitação de 150rpm no *shaker*. O inóculo foi preparado

diluindo 100x o pré-inóculo, incubado a 24ºC sob agitação de 150rpm no *shaker* e realizadas leituras no espectrofotômetro na OD 600 até atingir 0,5 de absorbância. Em seguida, os fatores de diluição 1:10, 1:20, 1:100, diluições seriadas bem como o volume de pipetagem 50µL e 100µL foram testados durante a semeadura do inóculo em ágar BHI para definir o melhor parâmetro para contagem de colônias na placa (obter uma placa com 30 a 300 colônias). As placas foram incubadas por 24h a 24ºC. A quantificação das bactérias em CFU/mL foi baseada em cálculos levando em consideração o fator de diluição e o volume do inóculo padronizados para o plaqueamento.

3.2.15. Ensaio antiviral *in vitro*

O ensaio antiviral *in vitro* foi baseado em infectar as células Vero com quatro tratamentos: T1) ZIKV, T2) metabólitos do isolado de bactéria, T3) ZIKV e metabólitos do isolado de bactérias e T4) veículo (DMEM 1X). E, observar a presença ou ausência do efeito citopático e citotóxico nas células infectadas por meio da formação de placas de lise nos poços das placas.

No que diz respeito à infecção das células com T1 e T3, os dados de efeito citopático foram utilizados para calcular a carga viral por meio do TCID50 e avaliar a atividade anti-ZIKV dos metabólitos dos isolados de bactérias através dos valores da carga viral das células infectadas com T1 e T3. Por outro lado, os dados do efeito citotóxico e citopático referente a infecção das células com T2 e T4 contribuíram qualitativamente para determinar se os metabólitos do isolado de bactéria foram tóxicos para as células ou a existência de contaminação durante a execução experimental. Desta forma, este ensaio foi dividido em algumas etapas experimentais tendo em vista os tratamentos T1) ZIKV, T2) metabólitos do isolado de bactéria, T3) ZIKV e metabólitos do isolado de bactéria e T4) veículo (DMEM 1X) como também o cultivo e infecção das células Vero.

3.2.16. Reagentes dos tratamentos

T1 e T3) Solução de ZIKV

A solução estoque de ZIKV (34,6 x 10^6 PFU/mL) foi diluída 100x no veículo (DMEM 1X).

T2 e T3) Inóculo do isolado de bactéria

A fim de conduzir o ensaio antiviral *in vitro* foram escolhidos alguns isolados de bactérias (n=11) de forma a representar todos os gêneros encontrados **(Tabela 2)**. Brevemente, o isolado de bactéria armazenado a -80ºC foi recuperado em ágar BHI durante 24h na respectiva temperatura de incubação **(Tabela 2)**. Em seguida, foi preparado o pré-inóculo ao semear as colônias em caldo BHI, incubar conforme temperatura descrita na **Tabela 2** e sob agitação de 150rpm no *shaker* por até 24h. O inóculo foi preparado ao diluir 100x o pré-inóculo, incuba-lo na respectiva temperatura a 150rpm no *shaker* até atingir a leitura de absorbância 0,5 na OD600 no espectrofotômetro. Em seguida, foi coletado 500µL deste inóculo e centrifugado a 3.000rcf por 5 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado, adicionado 5mL de PBS 1X estéril ao *pellet*, homogeneizado e centrifugado a 3.000rcf por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e adicionado 5mL do veículo (DMEM 1X) ao *pellet* seguido de homogeneização.

Tabela 2. Temperatura de incubação das bactérias isoladas da microbiota cultivável intestinal e ovariana

Isolado de bactéria	Órgão que a bactéria foi isolada	Gênero	Temperatura de incubação
Enterobacter sp.En1sp_BTU	Intestino	*Enterobacter*	37ºC
Serratia sp.Se2sp_BTU	Intestino	*Serratia*	24ºC
Klebsiella sp.Kl2sp_BTU	Intestino	*Klebsiella*	37ºC
Serratia sp.Se11sp_BTU	Intestino	*Serratia*	37ºC
Staphylococcus sp.St1sp_BTU	Ovário	*Staphyloccocus*	37ºC
Elizabethkingia sp.El3sp_BTU	Intestino	*Elizabethkingia*	37ºC
Elizabethkingia sp.El5sp_BTU	Intestino	*Elizabethkingia*	37ºC
Pseudomonas sp.Ps1sp_BTU	Intestino	*Pseudomonas*	37ºC
Pseudomonas sp.Ps2sp_BTU	Intestino	*Pseudomonas*	37ºC
Enterobacter sp.En3sp_BTU	Ovário	*Enterobacter*	37ºC
Klebsiella sp.Kl4sp_BTU	Ovário	*Klebsiella*	37ºC

Fonte: Autoria própria, 2022.

Quantificação da concentração inicial do inóculo em CFU/mL

Após o inóculo atingir a leitura de absorbância 0,5 na OD600 no espectrofotômetro, foi retirada uma alíquota de 100µL desta solução estoque e diluída

serialmente sete vezes com o fator de diluição 1:100 em caldo BHI. Em seguida, foi semeado 50µL de cada diluição (1:100 até $1:100^7$) em ágar BHI. As placas foram incubadas conforme a temperatura de incubação do isolado de bactéria **(Tabela 2)** por 24 horas. A quantificação das bactérias em CFU/mL foi baseada em cálculos levando em consideração a placa da diluição do inóculo que apresentou preferencialmente uma quantidade de colônias 30≤n≤300, o número de diluições seriadas, fator de diluição e o volume da solução estoque utilizados para realizar a diluição inicial (1:100).

T4) Veículo - DMEM 1X (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Este veículo foi preparado seguindo as especificações contidas no rótulo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) da Sigma®. Brevemente, o DMEM em pó foi diluído em 1000mL de água Milli-Q®, acrescentando 3,7g de bicarbonato de Sódio e filtrado com o auxílio de um filtro estéril com membrana (0,22µm tamanho de poro) sob um sistema a vácuo.

3.2.17. Preparo dos tratamentos para infecção das células Vero

Os tratamentos T1 e T2 foram resultados da adição e homogeneização de 800µL do respectivo reagente com 800µL do veículo (DMEM 1X). Enquanto que o tratamento T3 foi composto por 800µL de cada reagente (T1 e T2). O tratamento T4 foi apenas o próprio veículo (DMEM 1X) com um volume final de 1,6mL. Em seguida, os tratamentos foram incubados durante 45 minutos sob a temperatura de incubação do isolado de bactéria. Logo após, os tratamentos foram centrifugados a 3.000rcf por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado com o auxílio de um filtro de membrana estéril (diâmetro 30mm, tamanho dos poros: 0,22µm) e seringa descartável estéril. Cada tratamento filtrado foi diluído 10x em DMEM 1X suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino Inativado e 1% de Antibiótico-Antifúngico (DMEM 1X 2% SFB 1% Anti-Anti). Em seguida, foram preparadas seis réplicas técnicas de cada tratamento e diluídas serialmente sete vezes com o fator de diluição 1:10 em DMEM 1X 2% SFB 1% Anti-Anti (30µL do tratamento acrescido de 270µL de DMEM 1X 2% SFB 1% Anti-Anti) em duas placas em U de 96 poços.

3.2.18. Infecção das células Vero com os tratamentos

Considerando que o ensaio antiviral *in vitro* foi conduzido com seis réplicas técnicas para cada tratamento, as células Vero foram semeadas em duas placas de 96 poços. Após atingirem a confluência de 100%, o meio de cultivo celular de cada poço foi descartado com o auxílio de um sugador sob um sistema a vácuo. Em seguida, foi transferido 200µL de cada tratamento diluído nas placas de 96 poços em U para o seu respectivo poço nas placas com as células Vero semeadas. Logo após, as placas foram incubadas a 37ºC e 5% CO_2 por três dias para posteriormente observar a presença e ausência dos efeitos citopáticos ou citotóxicos nas células. O cálculo da carga viral de ZIKV nas células infectadas com os tratamentos T1 e T3 foi através do TCID 50 utilizando o software TCID50-calculator (v2.1 – 20-01-2017_MB) https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst_hygiene/molekulare_virologie/Downloads/TCID50_calculator_v2_17-01-20_MB.xlsx.

3.2.19. Análise estatística

A análise estatística das cargas virais de ZIKV foi realizada utilizando o teste-t para dados paramétricos e o Mann-Whitney Rank Sum para dados não paramétricos. Os valores de p≤0,05 foram considerados estatisticamente significante.

4. RESULTADOS

4.1. Parte I - isolamento, identificação e caracterização da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti*

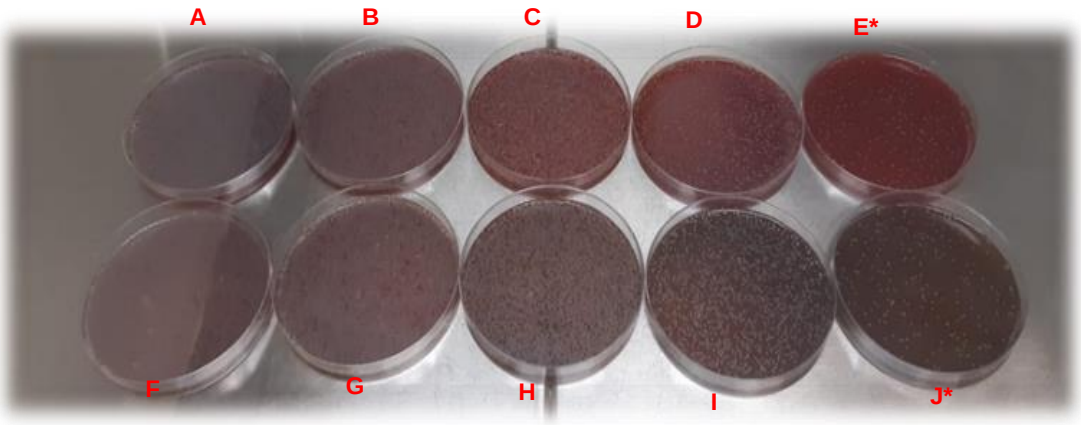
4.1.1. Dissecção dos mosquitos fêmeas e amostra cultivável do intestino-médio e dos ovários

Após 24h do repasto sanguíneo pelos mosquitos adultos fêmea *Aedes aegypti*, foram dissecados 20 intestinos-médio e ovários. Enquanto que após 72h, foram dissecados 22 intestinos-médio e ovários. Os *pools* de intestinos-médio e dos ovários foram macerados separadamente e semeados em ágar chocolate e sangue.

4.1.2. Caracterização da microbiota cultivável e identificação das bactérias do intestino-médio e dos ovários *via* 16s rRNA

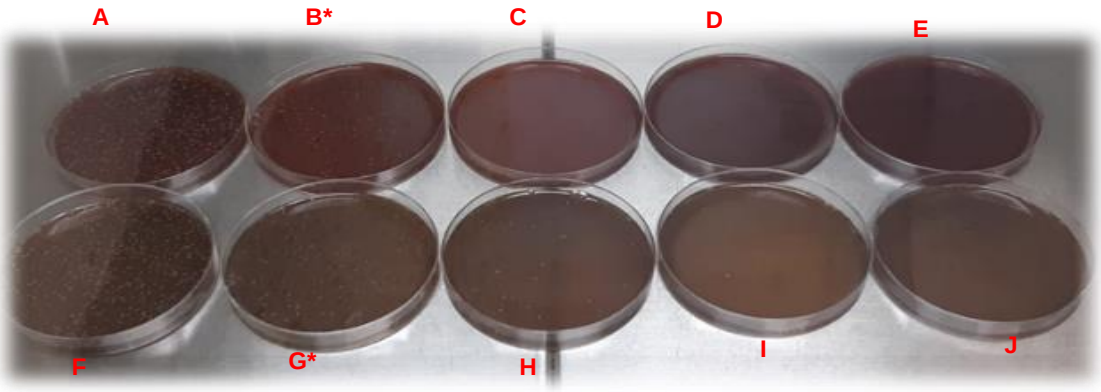
Um total de 31 bactérias foram isoladas em ágar BHI a partir do *pool* de colônias obtidas em ágar chocolate e ágar sangue. O isolamento foi baseado no tamanho da colônia, forma, cor, margem, opacidade, elevação e consistência **(Figuras 1-8)**.

Figura 1. Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo



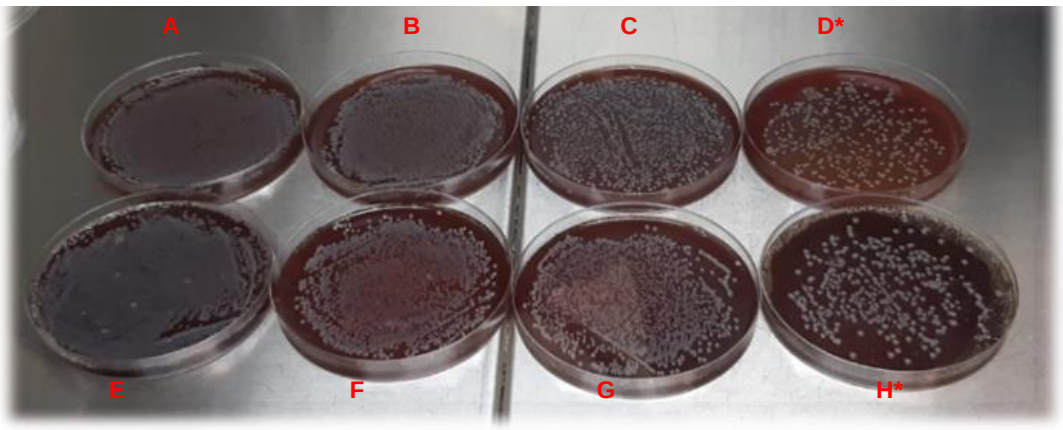
Legenda: As placas foram incubadas a 24ºC por 48h. A: AS(EB); B: AS(1:10); C:AS(1:100); D:AS(1:1000); E*: AS(1:10.000) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; F: AC(EB); G: AC(1:10); H: AC(1:100); I: AC(1:1000); J*: AC(1:10.000) – Placa escolhida para o isolamento das colônias. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 2. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo



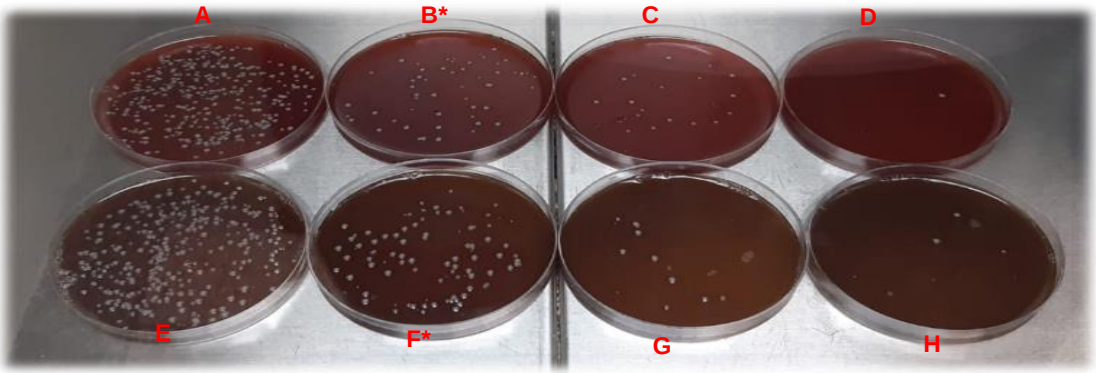
Legenda: As placas foram incubadas a 24ºC por 48h. A: AS(EB); B*: AS(1:10) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; C:AS(1:100); D:AS(1:1000); E: AS(1:10.000); F: AC(EB); G*: AC(1:10) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; H: AC(1:100); I: AC(1:1000); J: AC(1:10.000). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 3. Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo



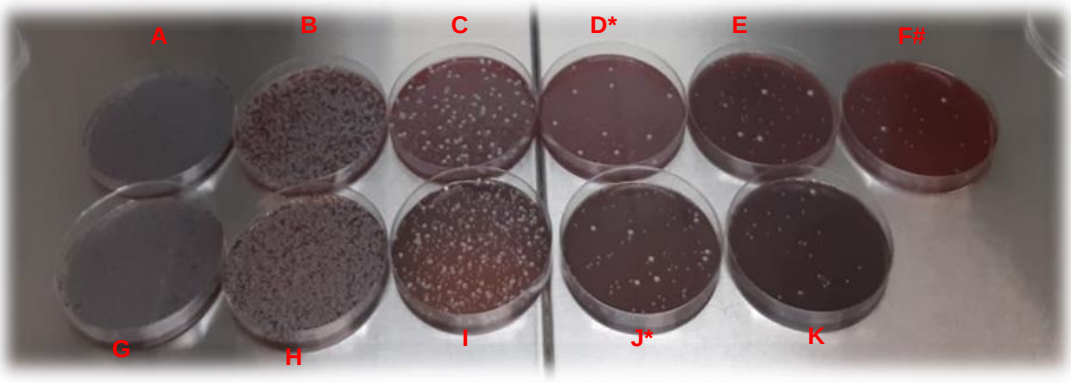
Legenda: As placas foram incubadas a 37ºC por 48h**.** A: AS(EB); B: AS(1:10); C:AS(1:100); D*:AS(1:1000) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; E: AC(EB); F: AC(1:10); G: AC(1:100); H*: AC(1:1000) - Placa escolhida para o isolamento das colônias. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 4. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 24h após o repasto sanguíneo



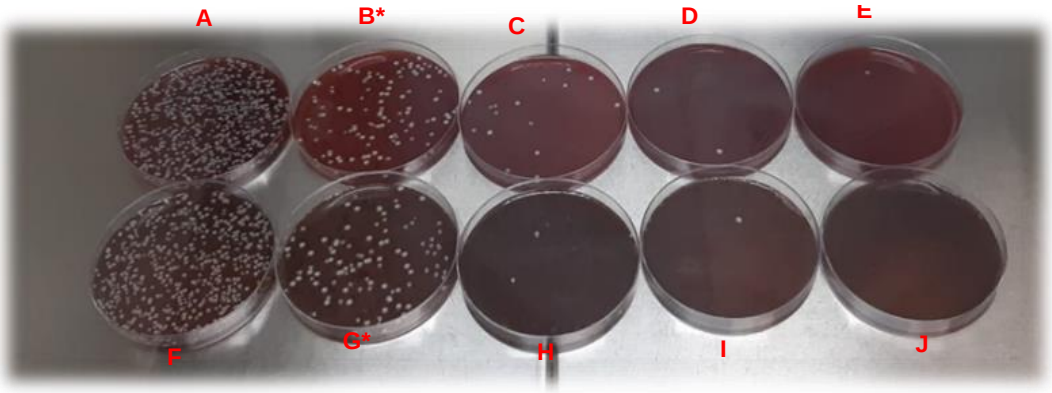
Legenda: As placas foram incubadas a 37ºC por 48h**.** A: AS(EB); B*: AS(1:10) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; C:AS(1:100); D:AS(1:1000); E: AC(EB); F*: AC(1:10) - Placa escolhida para o isolamento das colônias; G: AC(1:100); H: AC(1:1000). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 5. Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo



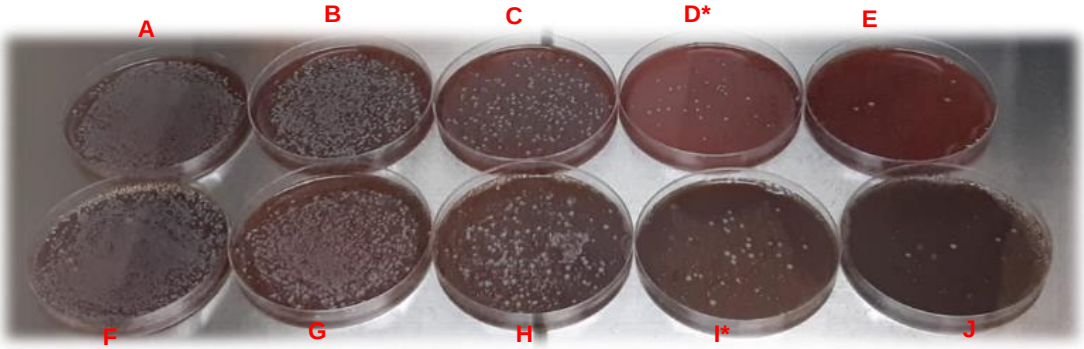
Legenda: As placas foram incubadas a 24ºC por 48h. A: AS(EB); B: AS (1:10); C:AS(1:100); D*:AS(1:1000) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; E: AS(1:10.000); F#: AS(1:10.000) – Duplicado por incerteza na semeadura; G: AC(EB); H: AC(1:10); I: AC(1:100); J*: AC(1:1000) - Placa escolhida para o isolamento das colônias; K: AC(1:10.000). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 6. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo



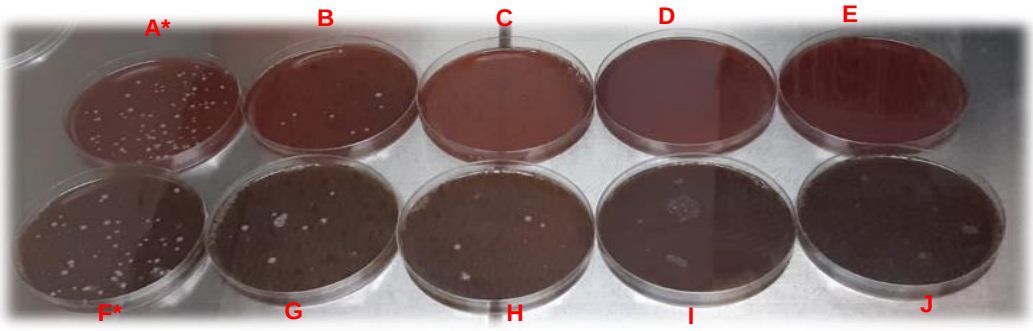
Legenda: As placas foram incubadas a 24ºC por 48h. A: AS(EB); B*: AS(1:10) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; C:AS(1:100); D:AS(1:1000); E: AS(1:10.000); F: AC(EB); G*: AC(1:10) - Placa escolhida para o isolamento das colônias; H: AC(1:100); I: AC(1:1000); J: AC(1:10.000). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 7. **–** Material cultivável do intestino-médio semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo



Legenda: As placas foram incubadas a 37ºC por 48h. A: AS(EB); B: AS(1:10); C:AS(1:100); D*:AS(1:1000) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; E: AS(1:10.000); F: AC(EB); G: AC(1:10); H: AC(1:100); I*: AC(1:1000) - Placa escolhida para o isolamento das colônias; J: AC(1:10.000). Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 8. Material cultivável dos ovários semeado em ágar chocolate (AC) e ágar sangue (AS) 72h após o repasto sanguíneo



Legenda: As placas foram incubadas a 37ºC por 48h. A*: AS(EB) – Placa escolhida para o isolamento das colônias; B: AS(1:10); C:AS(1:100); D:AS(1:1000); E: AS(1:10.000); F*: AC(EB) - Placa escolhida para o isolamento das colônias; G: AC(1:10); H: AC(1:100); I: AC(1:1000); J: AC(1:10.000). Fonte: Autoria própria, 2022.

Todas as bactérias isoladas (n=31) foram identificadas comparando as sequências no *GenBank* **(Apêndice 1)**, SILVA e RDP **(Tabela 3)** de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos por cada banco de dados público.

Tabela 3. Bactérias cultiváveis isoladas da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti*

Gênero	Espécie mais próxima	Qualidade da sequência	Qualidade do alinhamento	*Probabilidade de formar quimera	Nº de acesso
Serratia	*Serratia marcescens SM39*	93,43%	99,88%	100%	AP013063
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP018924
Serratia	*Serratia* sp. *FS14*	93,43%	99,88%	100%	CP005927
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP018915
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,20%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP018917
Serratia	*Serratia marcescens WW4*	93,43%	99,88%	100%	CP003959
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP018915
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP011642
Klebsiella	*Klebsiella variicola*	93,42%	99,85%	100%	CP000964
Serratia	*Serratia marcescens SM39*	93,43%	99,88%	100%	AP013063
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP018915
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	93,42%	99,85%	100%	CP009775
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae DMC1097*	93,42%	99,93%	100%	CP011976
	Klebsiella pneumoniae	93,42%	99,85%	100%	CP012987

Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Serratia	*Serratia marcescens*	93,43%	99,88%	100%	CP012685
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	97,80%	99,20%	100%	CP015852
	Pseudomonas putida	97,71%	98,82%	100%	HM217118
Enterobacter	*Enterobacter roggenkampii*	93,41%	99,92%	100%	CP012162
	Enterobacter cloacae	93,43%	99,78%	100%	CP021776
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	97,71%	100%	100%	AF468452
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	93,42%	99,85%	100%	CP012568
Enterobacter	*Enterobacter asburiae L1*	93,41%	99,92%	100%	CP007546
	Enterobacter cloacae	93,43%	99,92%	100%	CP021749
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	93,42%	99,85%	100%	CP014010
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746
Staphylococcus	*Staphylococcus caprae*	95,53%	99,91%	100%	AB009935
	Staphylococcus capitis	95,65%	99,92%	100%	AP014956
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	97,71%	100%	100%	AF468452

Enterobacter	*Enterobacter roggenkampii*	93,41%	99,92%	100%	CP012162
	Enterobacter cloacae	93,43%	99,92%	100%	CP021776
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica*	92,82%	100%	100%	AF207073
	Elizabethkingia ursingii	93,32%	99,92%	100%	CP016377
	Elizabethkingia miricola	93,32%	99,92%	100%	CP023746

Legenda: *Quando o número é próximo ou igual a 100%, significa que é baixa a probabilidade de ter formado quimera após alinhar a sequência alvo com as disponíveis no banco de dados. Fonte: Sequências comparadas no SILVA (https://www.arb-silva.de) e RDP (http://rdp.cme.msu.edu/).

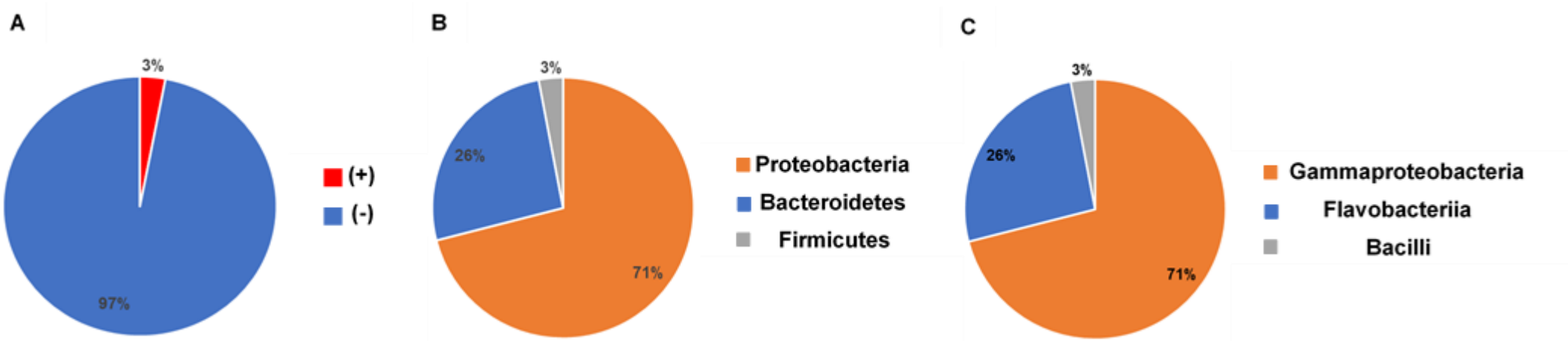
Após 24h e 72h do repasto sanguíneo pelos mosquitos fêmea *Aedes aegypti*, a microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários foi composta principalmente de bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Proteobacteria (71%) e classe Gammaproteobacteria (71%) **(Figura 9)**. Houve o predomínio de bactérias da ordem Enterobacteriales (61,3%) seguida da Flavobacteriales (25,8%), Pseudomonadales (9,7%) e Bacilalles (3,2%) **(Figura 10A)**. Em relação ao gênero, *Serratia* (35,6%) apresentou maior frequência seguida da *Elizabethkingia* (25,8%), *Klebsiella* (16,2%), *Enterobacter* (9,6%), *Pseudomonas* (9,7%) e *Staphylococcus* (3,2%). Quando observado cada órgão separadamente, o intestino-médio mostrou principalmente os gêneros *Serratia* (16,2%) e *Elizabethkingia* (16,1%) enquanto que nos ovários foi apenas *Serratia* (19,4%). *Staphylococcus* foi o único gênero encontrado nos ovários **(Figura 10B)**.

Além disso, após 24h do repasto sanguíneo, o gênero *Serratia* (9,7%) observado nos ovários mostrou predomínio entre os demais identificados em ambos os órgãos. Enquanto que após 72h do repasto sanguíneo, foi a *Elizabethkingia* (12,9%) no intestino-médio **(Figura 10B)**. Todos os gêneros identificados no intestino-médio e nos ovários foram observados 24h e 72h após o repasto sanguíneo, exceto *Staphylococcus* que foi encontrado apenas nos ovários 24h após o repasto sanguíneo e *Pseudomonas* que foi encontrada em ambos os órgãos, mas apenas 72h após o repasto sanguíneo. Além disso, os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*

foram encontrados em ambos os órgãos, porém no intestino-médio foram observados apenas 24h e 72h após o repasto sanguíneo, respectivamente. Enquanto que nos ovários, foram observados em ambos os pontos de repasto sanguíneo **(Figura 10B).**

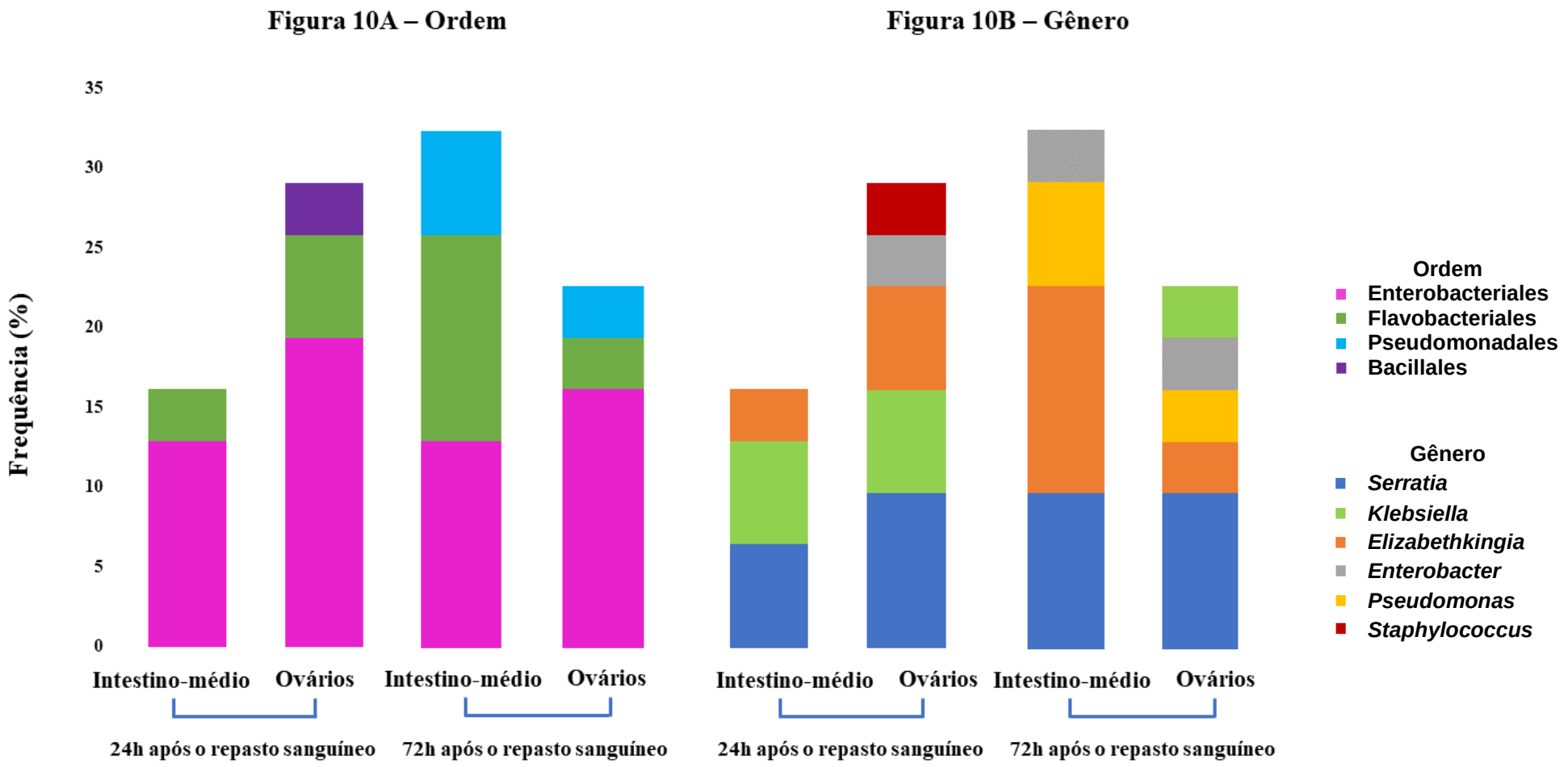
Todas as espécies pertencentes ao mesmo gênero e compartilhadas no intestino-médio e nos ovários apresentaram alta similaridade e pouca mutação entre si conforme observado em cada grupo funcional da árvore fenética **(Figura 11)**.

Figura 9. Caracterização das bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* segundo a coloração de gram (A), filos (B) e classes (C)



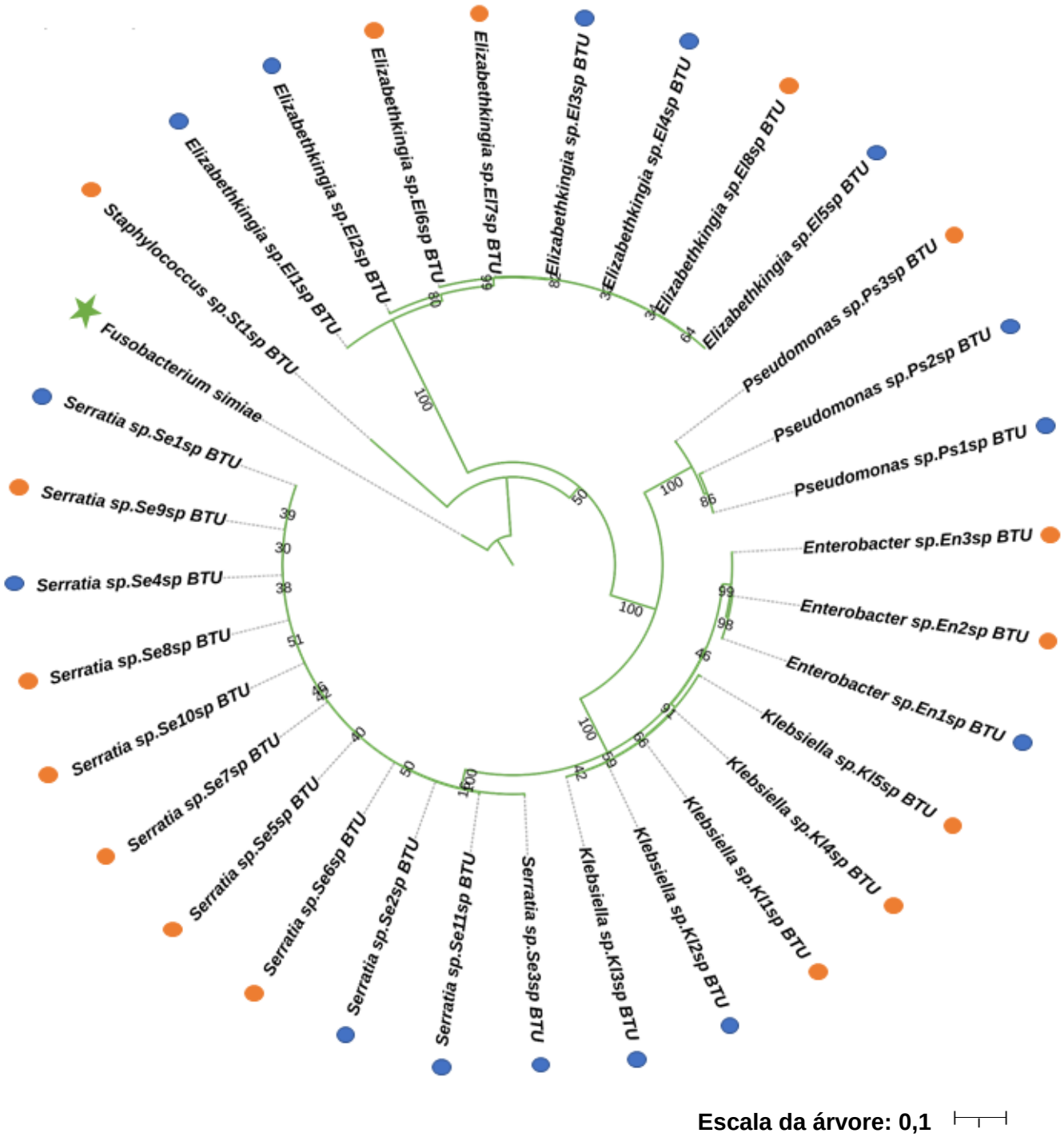
Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 10. Taxonomia da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* nos pontos de coleta 24h e 72h após o repasto sanguíneo.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 11. Árvore fenética com as espécies dos gêneros das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti*



Legenda	
	Intestino-médio
	Ovários
	Raiz

Fonte: Autoria própria, 2022.

As bactérias cultiváveis encontradas no intestino-médio e nos ovários também foram associadas aos meios de cultivo e temperatura de incubação **(Tabela 4)**.

Tabela 4. Relação entre as bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* com o cultivo em ágar chocolate e ágar sangue a 24ºC e 37ºC

Gênero	Espécie mais próxima	Órgão do mosquito *Ae.aegypti*	Meio de cultivo	Temperatura de incubação
Serratia	*Serratia marcescens SM39*	Intestino-médio	Ágar Chocolate	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Intestino-médio	Ágar Sangue	24ºC
Serratia	*Serratia* sp. *FS14*	Intestino-médio	Ágar Chocolate	24ºC
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Intestino-médio	Ágar Chocolate	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Intestino-médio	Ágar Sangue	24ºC
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Intestino-médio	Ágar Sangue	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Ovários	Ágar Chocolate	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens WW4*	Ovários	Ágar Sangue	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Ovários	Ágar Sangue	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Ovários	Ágar Chocolate	24ºC
Klebsiella	*Klebsiella variicola*	Ovários	Ágar Chocolate	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens SM39*	Ovários	Ágar Sangue	24ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Ovários	Ágar Sangue	24ºC
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae DMC1097* *Klebsiella pneumoniae*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC

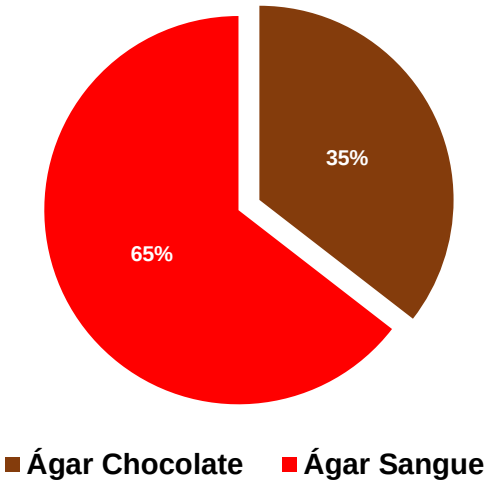
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC
Serratia	*Serratia marcescens*	Intestino-médio	Ágar Chocolate	37ºC
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Intestino-médio	Ágar Chocolate	37ºC
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis* *Pseudomonas putida*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC
Enterobacter	*Enterobacter roggenkampii* *Enterobacter cloacae*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	Intestino-médio	Ágar Sangue	37ºC
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	Ovários	Ágar Chocolate	37ºC
Enterobacter	*Enterobacter asburiae L1* *Enterobacter cloacae*	Ovários	Ágar Chocolate	37ºC
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Ovários	Ágar Chocolate	37ºC
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	Ovários	Ágar Sangue	37ºC
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Ovários	Ágar Sangue	37ºC
Staphylococcus	*Staphylococcus caprae* *Staphylococcus capitis*	Ovários	Ágar Sangue	37ºC
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	Ovários	Ágar Sangue	37ºC
Enterobacter	*Enterobacter roggenkampii*	Ovários	Ágar Sangue	37ºC

	Enterobacter cloacae			
Elizabethkingia	*Elizabethkingia meningoseptica* *Elizabethkingia ursingii* *Elizabethkingia miricola*	Ovários	Ágar Sangue	37ºC

Fonte: Autoria própria, 2022.

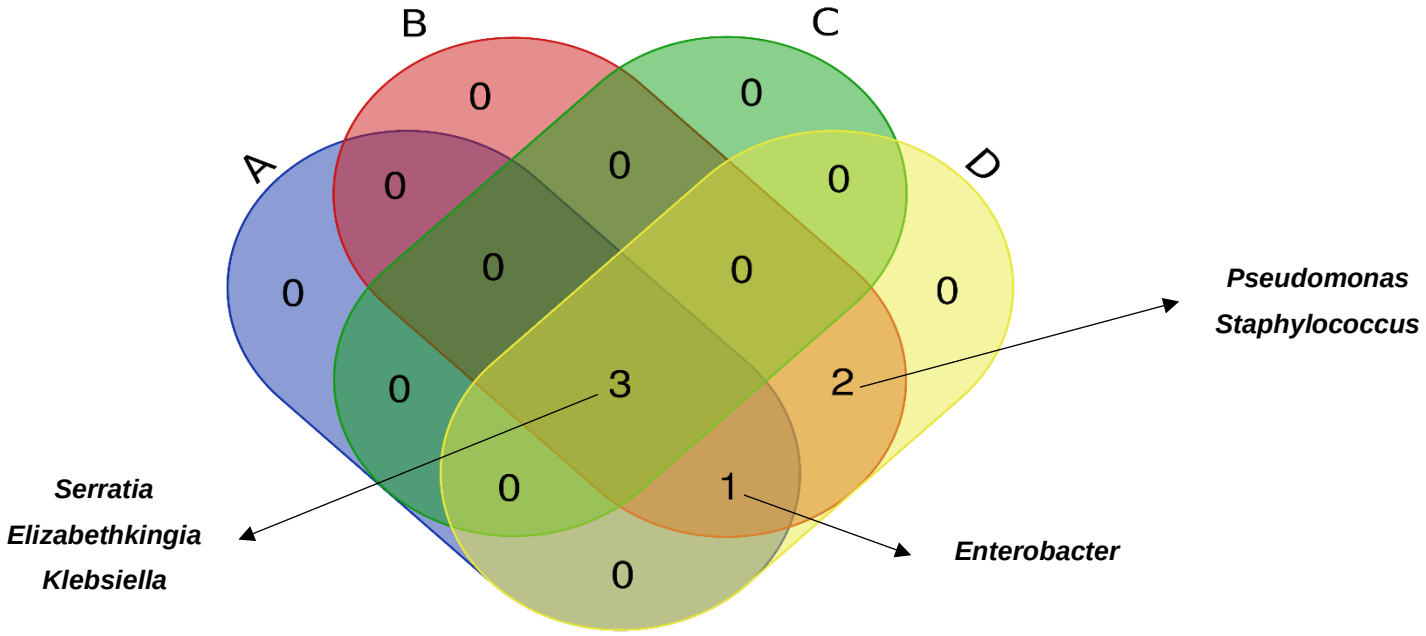
Foi observado que 65% das bactérias identificadas foram cultivadas em ágar sangue **(Figura 12)**. Quanto aos gêneros, todos foram encontrados em ágar sangue e ágar chocolate, exceto *Pseudomonas* e *Staphylococcus* que não foram obtidos em ágar chocolate. A temperatura de incubação a 37ºC permitiu cultivar todos os gêneros enquanto que a 24ºC não foi observada a presença de *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Sthapylococcus* **(Figura 13)**. Portanto, foi encontrada uma diversidade maior de gêneros de bactérias cultiváveis sob as condições de ágar sangue a 37ºC.

Figura 12. Frequência das bactérias cultiváveis em ágar chocolate e ágar sangue presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti*.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 13. Diagrama de *Venn* mostrando o compartilhamento dos gêneros das bactérias cultiváveis presentes em ágar sangue e ágar chocolate a 24ºC e 37ºC.



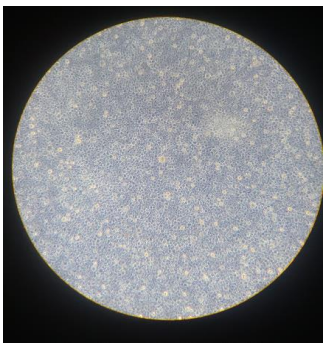
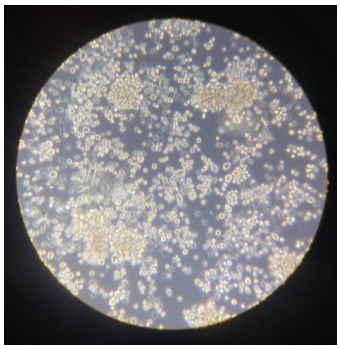
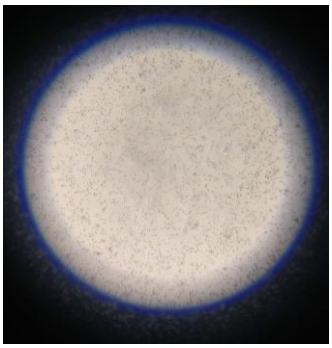
Legenda: A. Ágar chocolate. **B.** Ágar sangue. **C.** Temperatura de incubação no cultivo: 24ºC. **D.** Temperatura de incubação no cultivo: 37ºC.
Fonte: Autoria própria, 2022. Software utilizado para elaboração do diagrama de *Venn:* Draw Venn Diagram (ugent.be).

4.2. Parte II - Avaliação do potencial antiviral das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti*

4.2.1. Ensaio de placa para quantificação de ZIKV viáveis

A padronização do ensaio de placa para quantificação de ZIKV viáveis exigiu previamente o cultivo de células para a propagação viral. E, embora o presente trabalho tenha determinado nos objetivos trabalhar com ZIKV, inicialmente foi proposto o DENV-4. As células recomendadas para a propagação desses arbovírus são as C6/36 de *Aedes albopictus*. No entanto, após sucessivas tentativas de cultivo destas células em laboratório como troca de meio de cultivo e alterações nas concentrações de soro fetal bovino, foi observado uma cultura celular atípica para esta linhagem. Ou seja, houve a presença de células não aderidas no fundo do frasco de cultivo celular, células com morfologia celular atípica, mortas e formação de grumos. Todas estas características evidenciaram uma possível contaminação de *Mycoplasma*, *Acholeplasma* ou algum tipo de arbovírus nas células C6/36 de *Ae. albopictus* **(Figura 14)**.

Figura 14. Células C6/36 de *Aedes albopictus*

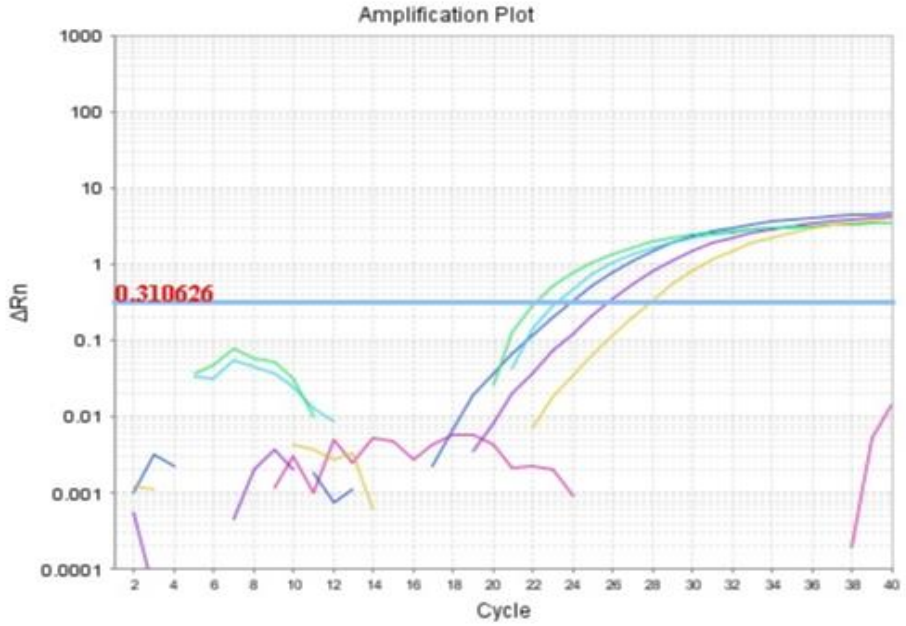
Cultura celular típica	Cultura celular atípica	
		

Fonte: Autoria própria, 2022.

Tendo em vista o ocorrido, foi decidido realizar o teste para detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* nas alíquotas de DENV-4 e ZIKV para evitar o manejo

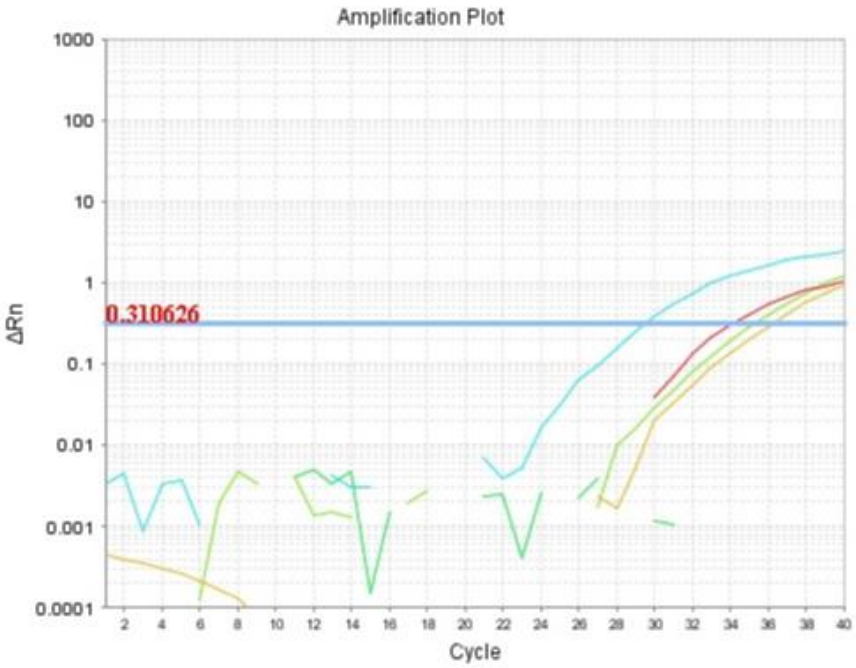
de amostras contaminadas nos experimentos e comprometer os resultados obtidos nos ensaios antivirais *in vitro*. O resultado das amostras foi positivo **(Figura 15-16).**

Figura 15. Detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* nas alíquotas de DENV-4



Legenda: Alíquotas de DENV-4 propagadas e armazenadas a -80ºC em períodos diferentes. (DENV-4: 2015). (DENV-4: 2015). (DENV-4: 2017). (DENV-4: 2021). Controle positivo para *Mycoplasma* e *Acholeplasma***.** Controle negativo para *Mycoplasma* e *Acholeplasma.*
Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 16. Detecção de Mycoplasma e Acholeplasma nas alíquotas de DENV-4 e ZIKV



Legenda: Alíquotas de DENV-4 e ZIKV propagadas e armazenadas a -80ºC em períodos diferentes.
(DENV-4: 2021). (ZIKV – 2017). (ZIKV – 2017).
Controle positivo para *Mycoplasma* e *Acholeplasma*.
Controle negativo para *Mycoplasma* e *Acholeplasma*.
Fonte: Autoria própria, 2022.

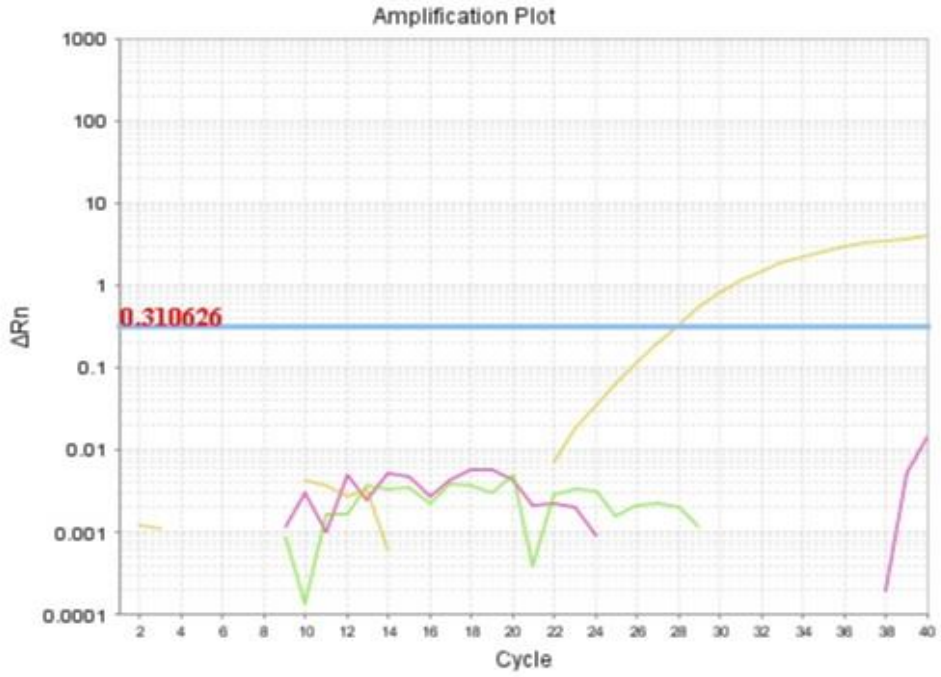
Dessa maneira, foi iniciado o processo de descontaminação das alíquotas virais (DENV-4 e ZIKV) usando o antibiótico ciprofloxacino. A fim de otimizar o tempo, as células Vero foram escolhidas para propagação dos arbovírus visto que não apresentaram contaminação de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* no teste realizado **(Figura 17).** Porém, ao realizar a infecção de DENV-4 e ZIKV nas células Vero, somente o ZIKV conseguiu se propagar causando o efeito citopático esperado **(Figura 18)**. Então, o tratamento de descontaminação prosseguiu apenas com o ZIKV e após duas propagações virais na presença do antibiótico ciprofloxacino a alíquota foi descontaminada **(Figura 19)**. Além disso, a confirmação molecular do ZIKV também foi realizada antes de prosseguir para a padronização do ensaio de placa para quantificação de ZIKV viáveis **(Tabela 5)**.

A padronização da quantificação de ZIKV viáveis por meio do ensaio de placa exigiu definir a variável tempo de incubação da placa visto que já havia um protocolo estabelecido no laboratório para este tipo de ensaio, mas direcionado a outro vírus. Desta maneira, foram testados alguns pontos de incubação (dois, quatro e seis dias

após infecção viral), mas sem obter êxito. Então, foi levantada a hipótese que o ZIKV não estava totalmente viável devido ao tratamento com ciprofloxacino para descontaminação. Portanto, foi realizada novamente a propagação de ZIKV nas células Vero, mas agora sem a presença deste antibiótico. Em seguida, o ensaio de placa foi conduzido novamente e com dois dias de incubação foi possível a quantificação da amostra na diluição 10^{-5} do inóculo **(Figura 20)**. Logo, a quantidade de vírus viáveis presente na alíquota de ZIKV foi 34,6 x 10^{6} PFU/mL.

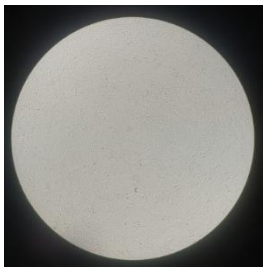
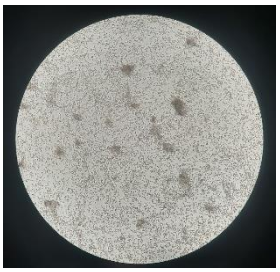
Com base no exposto, houve a substituição do DENV pelo ZIKV na realização dos ensaios antivirais. Tendo em vista que além do ZIKV ser um arbovírus transmitido pelo *Aedes aegypti* também representa um modelo experimental de elevada relevância devido aos problemas gerados na saúde pública ao redor do mundo.

Figura 17. Ausência de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* nas células Vero



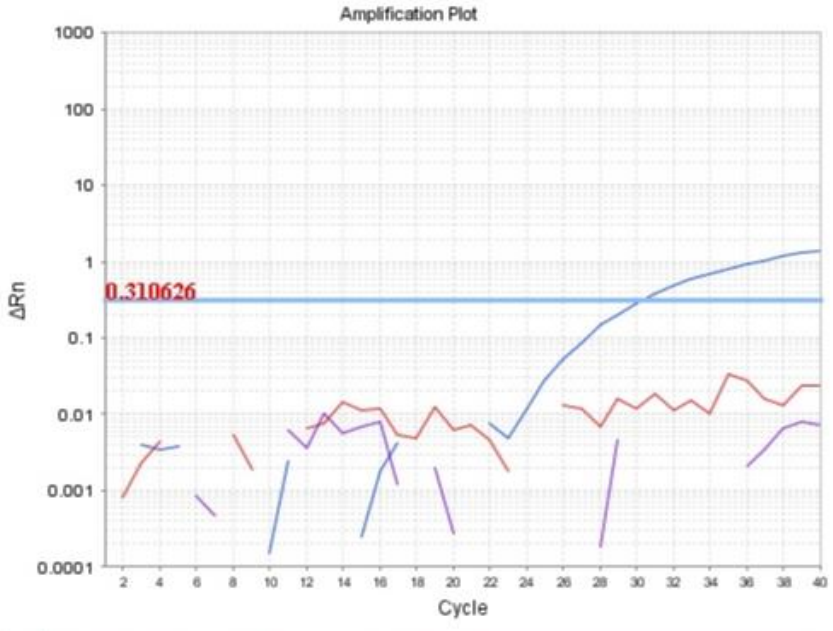
Legenda: Células Vero. Controle positivo. Controle negativo.
Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 18. Infecção de DENV-4 e ZIKV nas células Vero

Efeito citopático	
***Ausente DENV-4**	****Presente ZIKV**
	

Legenda: *Houve morte celular, porém sem a formação de grumos celulares que caracteriza o efeito citopático. **Presença de morte e grumos celulares evidenciando a propagação de ZIKV. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 19. Descontaminação de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* na alíquota de ZIKV



Legenda: ZIKV. Controle positivo. Controle negativo.
Fonte: Autoria própria, 2022.

Tabela 5. Confirmação molecular de ZIKV

Amostra	Percentual de cobertura	Percentual de identidade	Acesso
ZIKV	99%	99,16%	MT507050.1

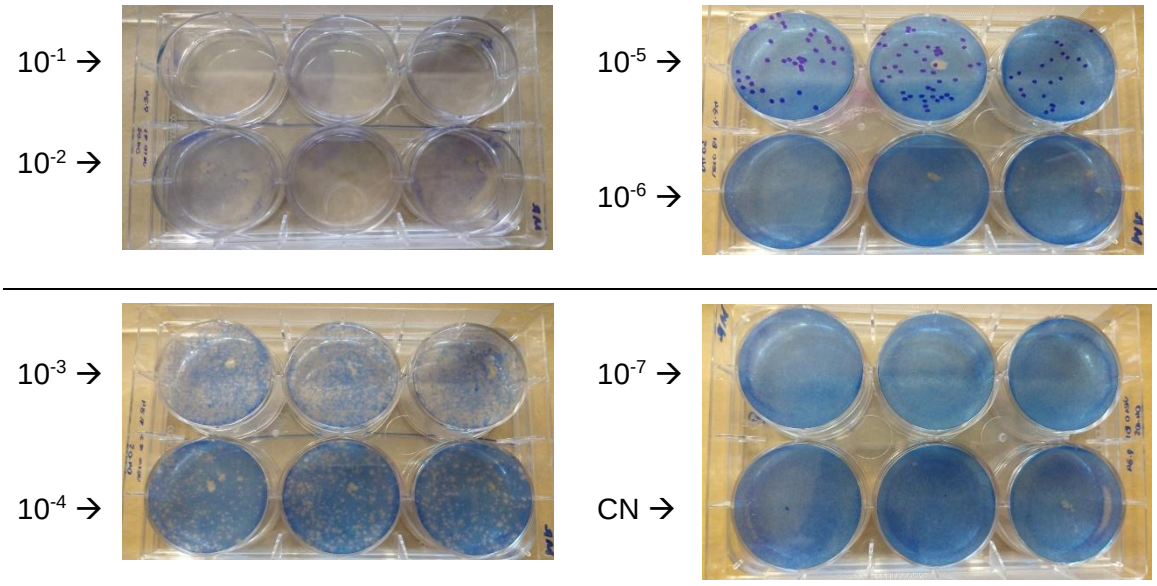
Fonte: Sequências comparadas no *GenBank* (Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query (nih.gov).

4.2.2. Quantificação de bactérias em CFU/mL

A padronização da quantificação de bactérias em CFU/mL exigiu definir algumas variáveis como fator de diluição, quantidade de diluições seriadas e volume de inóculo para plaqueamento. Ao testar todas as variáveis propostas nos métodos para a quantificação do isolado da bactéria R2 que pertence ao gênero *Serratia*, ficou definido trabalhar com o fator de diluição 1:100, realizar sete diluições seriadas e pipetar o volume de 50µL na placa. Essa padronização também foi aplicada para a quantificação posterior dos demais isolados de bactérias que foram direcionados para os ensaios antivirais.

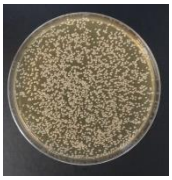
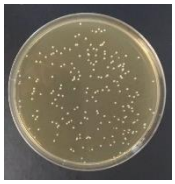
Em relação a quantificação do isolado de bactéria R2, a placa escolhida para contagem de colônias foi na diluição $1:100^{7}$ do inóculo **(Figura 21)** cuja concentração inicial foi aproximadamente 10^{17} CFU/mL.

Figura 20. Ensaio de placa para ZIKV



Legenda: CN: controle negativo. Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 21. Placas semeadas com o fator de diluição, número de diluições seriadas e volume de pipetagem padronizados.

1:100	$1:100^2$	$1:100^3$	$1:100^4$	$1:100^5$	$1:100^6$	$1:100^7$
						

Fonte: Autoria própria, 2022.

4.2.3. Ensaio antiviral *in vitro*

Alguns desafios foram enfrentados ao longo da execução dos ensaios antivirais como a padronização de algumas variáveis (ex.: fator de diluição a ser trabalhado com o inóculo e solução de ZIKV, tempo de incubação da placa infectada com os tratamentos, entre outros). Além disso, houve problemas de crescimento não esperados com alguns gêneros como *Elizabethkingia* (R16 e R21) e *Pseudomonas* (R19 e R22) não cresceram em caldo BHI após algumas tentativas e devido à ausência do pré-inóculo não foi possível realizar os ensaios antivirais com esses isolados. Enquanto que o ensaio antiviral de *Staphylococcus* (R28) foi realizado com o pré-inóculo mesmo, pois este isolado apresentou um crescimento muito lento em caldo BHI. Outras adversidades encontradas foram a presença de contaminação nas placas infectadas com os tratamentos ao realizar o ensaio antiviral com a *Enterobacter* sp. (R30) e as placas de células Vero não estarem com a confluência adequada para realizar a infecção dos tratamentos envolvendo a *Klebsiella* sp. (R23). Portanto, o ensaio antiviral *in vitro* foi realizado com cinco espécies de bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter* (~10^{17} CFU/mL), *Klebsiella* (~10^8 CFU/mL), *Serratia* (~10^{17} CFU/mL) e *Staphylococcus* (~10^7 CFU/mL).

Não foi encontrada nenhuma bactéria capaz de produzir metabólitos com atividade de redução ou inibição contra o ZIKV, pois não houve diferença estatisticamente significante ao infectar as células com ZIKV na presença dos metabólitos (tratamento T3) ao comparar com as células infectadas somente com o ZIKV (tratamento T1) ($p \geq 0,05$) **(Tabela 6)**. Não foi observado efeito citotóxico ao infectar as células somente com os metabólitos das bactérias (tratamento T2).

Tabela 6. Avaliação da atividade antiviral das bactérias cultiváveis isoladas da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti*

Isolado de bactéria	Órgão do mosquito	Gênero	Carga viral		Valor de p
			Tratamento 3	Tratamento 1	
Enterobacter sp.En1sp_BTU	Intestino-médio	**Enterobacter*	7,75±0,82	7,25±0,52	p≥0,05
Serratia sp.Se2sp_BTU	Intestino-médio	**Serratia*	7,16±0,29	7,00±0,50	
Klebsiella sp.Kl2sp_BTU	Intestino-médio	*#Klebsiella*	8	7,5	
Serratia sp.Se11sp_BTU	Intestino-médio	**Serratia*	7,33±0,29	7,66±0,29	
Staphylococcus sp.St1sp_BTU	Ovários	**Staphylococcus*	7,16±0,29	7,66±0,76	

Legenda: Valores expressam a carga viral em log na base 10. *Teste-t aplicado, carga viral ± desvio padrão. #Mann-Whitney Rank Sum aplicado para dados não paramétricos, carga viral sem ± desvio padrão. Fonte: Autoria própria, 2022.

5. DISCUSSÃO

A maior parte das bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti* população de Botucatu criados em laboratório foram caracterizadas em gram-negativas, Proteobacteria e Gammaproteobacteria **(Figura 9)**. Uma revisão de literatura sobre a microbiota de *Aedes spp.* também encontrou o predomínio de gram-negativa e Proteobacteria no intestino e nos ovários dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus* criados em laboratório (43). No presente estudo, a microbiota cultivável de ambos os órgãos teve o predomínio do filo Proteobacteria (71%) seguido de Bacteroidetes (26%) e Firmicutes (3%) **(Figura 9)**. Outro estudo mostrou que as bactérias isoladas e identificadas no intestino-médio do *Ae. aegypti* foram Proteobactéria (64,29%) e Firmicutes (28,57%) (72). Enquanto que no *Ae. albopictus*, entre os 113 isolados e 35 bactérias identificadas pertencentes a diferentes estágios de vida, o filo Proteobacteria e Firmicutes representaram 80% das espécies (72). Mais recentemente, mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* criados em laboratório mostraram predominância do filo Proteobacteria entre as bactérias sequenciadas independentes de cultivo presentes no intestino-médio e no corpo inteiro (73).

Em relação as classes das bactérias cultiváveis presente no intestino-médio e nos ovários, aqui foram encontradas Gammaproteobacteria, Flavobacteriia e Bacilli **(Figura 9)**. Em outro estudo, foram isoladas 40 bactérias do intestino-médio do *Aedes aegypti*, sendo caracterizadas 34 delas. Neste estudo, observou-se o predomínio das

classes Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacilli e a Alphaproteobacteria (64).

Entre as 31 bactérias isoladas e identificadas no intestino-médio e nos ovários, foram observados os gêneros *Serratia, Elizabethkingia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* **(Figura 10B)**. Outros estudos encontraram dados semelhantes com estes mesmos órgãos em *Aedes aegypti* (52, 58, 64, 74). Outro ponto interessante é a presença desses mesmos gêneros na microbiota cultivável de vetores diferentes. Como por exemplo, em ovos, larvas, pupas e mosquitos adultos de *Anopheles darlingi* foram isoladas e identificadas bactérias cultiváveis. Entre os gêneros dominantes encontrados foram *Serratia*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (75). Enquanto que no flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, bactérias cultiváveis pertencentes a diferentes estágios de vida e condições fisiológicas mostraram a presença dos gêneros *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (62).

No presente estudo, a microbiota cultivável do intestino-médio apresentou o predomínio dos gêneros *Serratia* e *Elizabethkingia*. Em contrapartida, nos ovários foi apenas *Serratia* **(Figura 10B)**. Houve o compartilhamento de todos os gêneros identificados em ambos os órgãos, exceto *Staphylococcus* que foi encontrado apenas nos ovários **(Figura 10B)**. Estes dados diferiram de alguns estudos onde houve o predomínio de *Serratia* e *Enterobacter* no intestino de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* por meio da análise realizada com *metabarcoding* (76). Enquanto que na microbiota cultivável dos ovários de *Ae.aegypti* foi *Serratia* e *Klebsiella*, sem a presença de *Staphylococcus* (52).

Por outro lado, as espécies de bactérias pertencentes ao mesmo gênero compartilhado em ambos os órgãos apresentaram pouca divergência e alta similaridade entre si conforme demonstrado na árvore fenética **(Figura 12)**. Resultado semelhante foi observado em outro estudo com as espécies das bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio de *Aedes aegypti* pertencentes aos gêneros *Serratia*, *Enterobacter* e *Staphylococcus* (64).

As bactérias cultiváveis encontradas no intestino-médio e nos ovários foram obtidas através de dois meios de cultivo, ágar chocolate e ágar sangue, e duas temperaturas de incubação, 24ºC e 37ºC. A hipótese formulada para essas variáveis foi se meios diferentes de cultivo e temperatura de incubação promoveriam isolar uma maior diversidade de bactérias cultiváveis em ambos os órgãos do mosquito *Aedes*

aegypti. Ao comparar as bactérias isoladas a partir de ágar chocolate e ágar sangue foi observado que 65% foram cultivadas em ágar sangue **(Figura 12)**. Todos os gêneros foram cultivados em ágar sangue e ágar chocolate exceto *Pseudomonas* e *Staphylococcus* que não foram cultivados em ágar chocolate. Em contrapartida, a temperatura de incubação a 37ºC permitiu cultivar todos os gêneros descritos no presente estudo ao passo que a 24ºC não foi observada a presença de *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Sthapylococcus* **(Figura 13)**.

Ao comparar com os estudos publicados na literatura que isolaram bactérias cultiváveis de diferentes estágios de vida de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Anopheles darlingi* foi observado que a maior parte utilizou os meios de cultivo ágar nutriente e ágar sangue na faixa de temperatura de incubação 20ºC-25ºC (*"room temperature"*) e 37ºC. Todos os gêneros encontrados na microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do *Ae. aegypti* população de Botucatu também foram descritos nesses trabalhos com exceção de *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Phytobacter*, *Microbacterium*, *Chryseobacterium*, entre outros. (52, 53, 64, 72, 74, 75, 77). A ausência desses gêneros pode estar associada a outros fatores que interferem na diversidade da microbiota do mosquito como espécie, alimentação, criação (mosquito selvagem ou de laboratório), sistema imunológico, estágio de vida do mosquito, órgão, entre outros.

Por outro lado, os dois pontos de coleta utilizados para o isolamento das bactérias cultiváveis do intestino-médio e dos ovários foram definidos para responder o questionamento se haveria diferença na diversidade das bactérias cultiváveis em ambos os órgãos entre o primeiro e o terceiro dia após o repasto sanguíneo pelas fêmeas *Aedes aegypti*. Na literatura, já foi observado alterações na composição e diversidade da microbiota de *Anopheles gambie* e *Ae. aegypti* devido a metabolização das proteínas do sangue e formação de espécies reativas de oxigênio que promove a proliferação diferencial de táxon de bactérias (78-80). No presente estudo, todos os gêneros identificados foram encontrados em ambos os pontos de coleta com exceção de *Staphylococcus* e *Pseudomonas* que só foram encontrados em 24h e 72h após o repasto sanguíneo, respectivamente **(Figura 10B)**.

Os ensaios antivirais *in vitro* conduzidos com os gêneros *Serratia*, *Enterobacter, Klebsiella* e *Staphylococcus* mostraram nenhuma atividade anti-ZIKV **(Tabela 6)**. Na literatura há registro de dois estudos que conseguiram encontrar bactérias isoladas

com atividade anti-patógena *in vitro*. *Chromobacterium* sp. e *Serratia* sp./*Lysinibacillus* sp. foram anti-DENV/anti-*Plasmodium* e anti-Leishmania, respectivamente (16, 62).

No entanto, o primeiro estudo demonstrou que a atividade antiviral da *Chromobacterium* sp. contra o DENV-2 só foi observada em seu estado de biofilme e aparentemente esteve dependente da sua maturação (16). Diferente do presente estudo cuja avaliação da atividade antiviral foi somente no estado planctônico dos isolados de bactérias. Além disso, não foi encontrado o gênero *Chromobacterium* no intestino-médio e nos ovários do *Aedes aegypti* população de Botucatu.

Em contrapartida, o segundo estudo observou atividade de redução nos gêneros *Enterobacter, Klebsiella* e *Staphylococcus* como também atividade de inibição na associação *Serratia* sp./*Lysinibacillus* sp., porém contra o protozoário *Leishmania* (62), ao passo que no presente estudo foi avaliada atividade contra o arbovírus ZIKV.

Tendo em vista que são escassos os estudos publicados na literatura que caracterize a microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários de *Aedes aegypti* e a avalie quanto a sua atividade antiviral, o presente estudo contribuiu para reunir evidências científicas sobre esses assuntos para poder ampliar o entendimento sobre a interação hospedeiro/microbiota.

Considerando algumas adversidades encontradas durante o mestrado como a pandemia (COVID-19), contaminação de amostras, entre outros, não foi possível responder a outros questionamentos levantados durante o desenvolvimento da pesquisa. Como por exemplo, será que os isolados de bactérias encontrados no intestino-médio e nos ovários de *Aedes aegypti* mostrariam alguma atividade antiviral *in vitro* se estivessem na forma de biofilme? Ou ainda, será que essas bactérias teriam alguma atividade antiviral *in vivo*? O biofilme é uma estrutura complexa baseada na produção de vários metabólitos, talvez algum poderia mostrar atividade anti-ZIKV. Em contrapartida, ao conduzir os ensaios antivirais *in vivo*, fatores endógenos do mosquito, como por exemplo o sistema imunológico, podem interferir na interação hospedeiro/microbiota/patógeno refletindo diretamente na replicação e permissibilidade do vetor ao patógeno.

Futuramente, outros ensaios antivirais poderão ser realizados pelo grupo de pesquisa com os isolados de bactérias cultiváveis encontrados no intestino-médio e nos ovários do mosquito *Aedes aegypti* população de Botucatu para responder as hipóteses levantadas acima. As bactérias que mostrarem atividade antiviral poderão

ser candidatas a elaboração de estratégias inovadoras para o controle vetorial e da transmissão do patógeno como também para terapias antivirais.

Além disso, outro ponto interessante observado aqui foi a presença da *Serratia* no intestino-médio e nos ovários do *Aedes aegypti*, em ambos os pontos de coletas, meios de cultivo e temperaturas de incubação. Como também em outro estudo foi encontrado que este gênero foi capaz de ser transmitido à prole de mosquitos *Anopheles* e modificado geneticamente para expressar moléculas anti-patógenos (59). Estes resultados mostram que a *Serratia* é uma forte candidata para a realização de futuros ensaios de paratransgênese.

6. CONCLUSÃO

A microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Aedes aegypti* população de Botucatu criado em laboratório foi composta principalmente de bactérias gram-negativas, pertencentes ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales e gênero *Serratia*. No intestino-médio houve o predomínio dos gêneros *Serratia* e *Elizabethkingia* enquanto que nos ovários foi apenas *Serratia*. No entanto, a diversidade da microbiota cultivável de ambos os órgãos é semelhante. Nenhum gênero causou redução ou inibição de ZIKV *in vitro*. Portanto, as bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários não mostraram atividade anti-ZIKV.

REFERÊNCIAS

1. Javed F, Manzoor KN, Ali M, Haq IU, Khan AA, Zaib A, et al. Zika virus: what we need to know? J Basic Microbiol. 2018;58(1):3-16.
2. Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. Virology. 2020;543:34-42.
3. Simonin Y, van Riel D, Van de Perre P, Rockx B, Salinas S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(9):e0005821.
4. WHO WaHO. Dengue and severe dengue. 2022.

5. Peixoto HM, Romero GAS, de Araújo WN, de Oliveira MRF. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection in Brazil: a cost-of-illness study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2019;113(5):252-8.

6. Albuquerque MdFPMd, Souza WVd, Araújo TVB, Braga MC, Miranda Filho DdB, Ximenes RAdA, et al. Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. 2018;34.

7. Bernardo-Menezes LC, Agrelli A, Oliveira A, Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. An overview of Zika virus genotypes and their infectivity. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2022;55:e02632022.

8. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2016;65(3):55-8.

9. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. Emerg Infect Dis. 2016;22(7):1185-92.

10. Padilla C, Pan A, Geller A, Zakowski MI. Zika virus: review and obstetric anesthetic clinical considerations. J Clin Anesth. 2016;35:136-44.

11. Freitas DA, Souza-Santos R, Carvalho LMA, Barros WB, Neves LM, Brasil P, et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. PLoS One. 2020;15(12):e0242367.

12. White MK, Wollebo HS, David Beckham J, Tyler KL, Khalili K. Zika virus: An emergent neuropathological agent. Ann Neurol. 2016;80(4):479-89.

13. Dahmana H, Mediannikov O. Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically. Pathogens. 2020;9(4).

14. Huang W, Wang S, Jacobs-Lorena M. Use of Microbiota to Fight Mosquito-Borne Disease. Front Genet. 2020;11:196.

15. Ratcliffe NA, Furtado Pacheco JP, Dyson P, Castro HC, Gonzalez MS, Azambuja P, et al. Overview of paratransgenesis as a strategy to control pathogen transmission by insect vectors. Parasit Vectors. 2022;15(1):112.

16. Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, et al. *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. PLoS Pathog. 2014;10(10):e1004398.

17. Saraiva RG, Fang J, Kang S, Angleró-Rodríguez YI, Dong Y, Dimopoulos G. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium sp*. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(4):e0006443.

18. Consoli RA, Oliveira RLd. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil: Editora Fiocruz; 1994.

19. Reed W, Carroll J. The Prevention of Yellow Fever. Public Health Pap Rep. 1901;27:113-29.

20. Diouf B, Dia I, Sene NM, Ndiaye EH, Diallo M, Diallo D. Morphology and taxonomic status of Aedes aegypti populations across Senegal. PLoS One. 2020;15(11):e0242576.

21. Kraemer MUG, Reiner RC, Jr., Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Nat Microbiol. 2019;4(5):854-63.

22. Ayres CF. Identification of Zika virus vectors and implications for control. Lancet Infect Dis. 2016;16(3):278-9.

23. Carvalho FD, Moreira LA. Why is Aedes aegypti Linnaeus so Successful as a Species? Neotrop Entomol. 2017;46(3):243-55.

24. Faull KJ, Williams CR. Intraspecific variation in desiccation survival time of Aedes aegypti (L.) mosquito eggs of Australian origin. J Vector Ecol. 2015;40(2):292-300.

25. Oliveira RLd. Biologia e comportamento do vetor. Dengue: teorias e práticas2015. p. 75-92.

26. Almire F, Terhzaz S, Terry S, McFarlane M, Gestuveo RJ, Szemiel AM, et al. Sugar feeding protects against arboviral infection by enhancing gut immunity in the mosquito vector *Aedes aegypti*. PLoS Pathog. 2021;17(9):e1009870.

27. Takken W, Verhulst NO. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. Annu Rev Entomol. 2013;58:433-53.

28. Lima-Camara TN, Urbinatti PR, Chiaravalloti-Neto F. Finding *Aedes aegypti* in a natural breeding site in an urban zone, Sao Paulo, Southeastern Brazil. Rev Saude Publica. 2016;50:3.

29. Li CX, Guo XX, Deng YQ, Xing D, Sun AJ, Liu QM, et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. Emerging microbes & infections. 2017;6(4):e23.

30. Pereira-Silva JW, Nascimento VAD, Belchior HCM, Almeida JF, Pessoa FAC, Naveca FG, et al. First evidence of Zika virus venereal transmission in *Aedes aegypti* mosquitoes. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2018;113(1):56-61.

31. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):e0004543.

32. Raquin V, Lambrechts L. Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. Virology. 2017;507:75-81.

33. Koh C, Allen SL, Herbert RI, McGraw EA, Chenoweth SF. The Transcriptional Response of Aedes aegypti with Variable Extrinsic Incubation Periods for Dengue Virus. Genome Biol Evol. 2018;10(12):3141-51.

34. McElroy KL, Girard YA, McGee CE, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S. Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct yellow fever virus variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008;8(5):675-87.

35. Rohani A, Wong YC, Zamre I, Lee HL, Zurainee MN. The effect of extrinsic incubation temperature on development of dengue serotype 2 and 4 viruses in *Aedes aegypti (L.)*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009;40(5):942-50.

36. Xiao FZ, Zhang Y, Deng YQ, He S, Xie HG, Zhou XN, et al. The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. Arch Virol. 2014;159(11):3053-7.

37. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. Aedes aegypti vector competence studies: A review. Infect Genet Evol. 2019;67:191-209.

38. Severson DW, Behura SK. Genome Investigations of Vector Competence in *Aedes aegypti* to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches. Insects. 2016;7(4).

39. Lozano-Fuentes S, Kenney JL, Varnado W, Byrd BD, Burkhalter KL, Savage HM. Susceptibility and Vectorial Capacity of American *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to American Zika Virus Strains. J Med Entomol. 2019;56(1):233-40.

40. Caicedo PA, Serrato IM, Sim S, Dimopoulos G, Coatsworth H, Lowenberger C, et al. Immune response-related genes associated to blocking midgut dengue virus infection in *Aedes aegypti* strains that differ in susceptibility. Insect Sci. 2019;26(4):635-48.

41. Alonso-Palomares LA, Moreno-García M, Lanz-Mendoza H, Salazar MI. Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. Intervirology. 2018;61(6):255-64.

42. Su J, Li C, Zhang Y, Yan T, Zhu X, Zhao M, et al. Identification of microRNAs expressed in the midgut of *Aedes albopictus* during dengue infection. Parasit Vectors. 2017;10(1):63.

43. Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes spp*. and Their Microbiota: A Review. Front Microbiol. 2019;10:2036.

44. Gao H, Cui C, Wang L, Jacobs-Lorena M, Wang S. Mosquito Microbiota and Implications for Disease Control. Trends Parasitol. 2020;36(2):98-111.

45. Gómez M, Martinez D, Muñoz M, Ramírez JD. Aedes aegypti and *Ae. albopictus* microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission? Parasit Vectors. 2022;15(1):287.

46. Gabrieli P, Caccia S, Varotto-Boccazzi I, Arnoldi I, Barbieri G, Comandatore F, et al. Mosquito Trilogy: Microbiota, Immunity and Pathogens, and Their Implications for the Control of Disease Transmission. Front Microbiol. 2021;12:630438.

47. Saraiva RG, Kang S, Simões ML, Angleró-Rodríguez YI, Dimopoulos G. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. Dev Comp Immunol. 2016;64:53-64.

48. Liu T, Xu Y, Wang X, Gu J, Yan G, Chen XG. Antiviral systems in vector mosquitoes. Dev Comp Immunol. 2018;83:34-43.

49. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog. 2008;4(7):e1000098.

50. Wu P, Sun P, Nie K, Zhu Y, Shi M, Xiao C, et al. A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. Cell Host Microbe. 2019;25(1):101-12.e5.

51. Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. Serratia odorifera a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. PLoS One. 2012;7(7):e40401.

52. Alvarado WA, Agudelo SO, Velez ID, Vivero RJ. Description of the ovarian microbiota of *Aedes aegypti* (L) *Rockefeller* strain. Acta Trop. 2021;214:105765.

53. Balaji S, Deepthi KNG, Prabagaran SR. Native Wolbachia influence bacterial composition in the major vector mosquito *Aedes aegypti*. Arch Microbiol. 2021.

54. Hassler HB, Probert B, Moore C, Lawson E, Jackson RW, Russell BT, et al. Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. Microbiome. 2022;10(1):104.

55. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics. 2016;17:135.

56. Lange CC, Brito MA, Brito JR, Arcuri EF, Souza GN, Machado MA, et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. 2011;31:36-40.

57. Balvočiūtė M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare? BMC Genomics. 2017;18(Suppl 2):114.

58. do Nascimento RM, Campolina TB, Chaves BA, Delgado JLF, Godoy RSM, Pimenta PFP, et al. The influence of culture-dependent native microbiota in Zika virus infection in *Aedes aegypti*. Parasit Vectors. 2022;15(1):57.

59. Wang S, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, et al. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. Science (New York, NY). 2017;357(6358):1399-402.

60. Shane JL, Grogan CL, Cwalina C, Lampe DJ. Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota. Nat Commun. 2018;9(1):4127.

61. Jiggins FM. The spread of Wolbachia through mosquito populations. PLoS Biol. 2017;15(6):e2002780.

62. Campolina TB, Villegas LEM, Monteiro CC, Pimenta PFP, Secundino NFC. Tripartite interactions: *Leishmania*, microbiota and *Lutzomyia longipalpis*. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(10):e0008666.

63. Coleman J, Juhn J, James AA. Dissection of midgut and salivary glands from *Ae. aegypti* mosquitoes. J Vis Exp. 2007(5):228.

64. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(3):e1561.

65. Arruda A, Ferreira GS, Lima N, Santos Júnior AD, Custódio MGF, Benevides-Matos N, et al. A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Journal of microbiological methods. 2017;141:115-7.

66. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 2018;35(6):1547-9.

67. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in bioinformatics. 2019;20(4):1160-6.

68. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic acids research. 2021;49(W1):W293-w6.

69. Ishikawa Y, Kozakai T, Morita H, Saida K, Oka S, Masuo Y. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2006;42(3-4):63-9.

70. Tanaka M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. J Virol Methods. 1993;41(3):311-22.

71. Souza YRM, Manso PPA, Oliveira BCD, Terra M, Paschoal T, Caminha G, et al. Generation of Yellow Fever virus vaccine in skeletal muscle cells of chicken embryos. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2019;114:e190187.

72. Yadav KK, Datta S, Naglot A, Bora A, Hmuaka V, Bhagyawant S, et al. Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. PLoS One. 2016;11(12):e0167409.

73. Lin D, Zheng X, Sanogo B, Ding T, Sun X, Wu Z. Bacterial composition of midgut and entire body of laboratory colonies of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Southern China. Parasit Vectors. 2021;14(1):586.

74. Thapa S, Pant ND, Shrestha R, Gc G, Shrestha B, Pandey BD, et al. Prevalence of dengue and diversity of cultivable bacteria in vector *Aedes aegypti (L.)* from two dengue endemic districts, Kanchanpur and Parsa of Nepal. J Health Popul Nutr. 2017;36(1):5.

75. Rocha EM, Marinotti O, Serrão DM, Correa LV, Katak RM, de Oliveira JC, et al. Culturable bacteria associated with *Anopheles darlingi* and their paratransgenesis potential. Malar J. 2021;20(1):40.

76. Díaz S, Camargo C, Avila FW. Characterization of the reproductive tract bacterial microbiota of virgin, mated, and blood-fed *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* females. Parasit Vectors. 2021;14(1):592.

77. Yadav KK, Bora A, Datta S, Chandel K, Gogoi HK, Prasad GB, et al. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. Parasit Vectors. 2015;8:641.

78. Wang Y, Gilbreath TM, 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. PLoS One. 2011;6(9):e24767.

79. Oliveira JH, Gonçalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, et al. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. PLoS Pathog. 2011;7(3):e1001320.

80. Muturi EJ, Dunlap C, Ramirez JL, Rooney AP, Kim CH. Host blood-meal source has a strong impact on gut microbiota of *Aedes aegypti*. FEMS Microbiol Ecol. 2019;95(1).

APÊNDICE 1 - Identificação das bactérias cultiváveis presentes na microbiota do intestino-médio e dos ovários do *Aedes aegypti*

Gênero	Espécie mais próxima	Porcentagem de cobertura	Valor de E	Percentual de identidade	Nº de acesso
Serratia	*Serratia marcescens*	100%	0.0	99.83%	ON838125.1
Serratia	*Serratia marcescens*	99%	0.0	99.85%	CP055161.1
Serratia	*Serratia marcescens*	100%	0.0	98.55%	GU294130.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	99%	0.0	99.68%	CP039929.
	Elizabethkingia miricola	99%	0.0	99.68%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	99%	0.0	99.68%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	99%	0.0	99.68%	CP016377.1
Serratia	*Serratia marcescens*	100%	0.0	100.00%	CP053918.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	99%	0.0	99.71%	CP039929.1
	Elizabethkingia miricola	99%	0.0	99.71%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	99%	0.0	99.71%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	99%	0.0	99.71%	CP016377.1
Serratia	*Serratia marcescens*	100%	0.0	99.69%	CP055161.1
Serratia	*Serratia sp. F1390*	100%	0.0	99.69%	JQ417649.1
Serratia	*Serratia sp. S7.1*	100%	0.0	97.82%	MT623418.1
Serratia	*Serratia marcescens*	100%	0.0	99.84%	CP053572.1
Klebsiella	*Klebsiella variicola*	99%	0.0	99.60%	MK872305.1
	Klebsiella sp.	99%	0.0	99.60%	MN658477.1
	Klebsiella quasivariicola	99%	0.0	99.60%	MN082117.1
	Klebsiella pneumoniae	99%	0.0	99.60%	MN598660.1
Serratia	*Serratia marcescens*	98%	0.0	97.83%	CP053572.1
Serratia	*Serratia marcescens*	99%	0.0	100.00%	CP053918.1
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	100%	0.0	99.44%	MG855663.1
	Klebsiella sp.	100%	0.0	99.44%	ON845365.1

	Klebsiella variicola	100%	0.0	99.30%	ON973116.1
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	100%	0.0	99.54%	CP072200.1
	Klebsiella quasipneumoniae	100%	0.0	99.54%	CP099834.1
	Klebsiella sp.	100%	0.0	99.54%	ON845371.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	99%	0.0	99.56%	CP039929.1
	Elizabethkingia miricola	99%	0.0	99.56%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	99%	0.0	99.56%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	99%	0.0	99.56%	CP016377.1
Serratia	*Serratia marcescens*	100%	0.0	99.53%	CP055161.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	100%	0.0	100.00%	CP039929.1
	Elizabethkingia miricola	100%	0.0	100.00%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	100%	0.0	100.00%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	100%	0.0	100.00%	CP016377.1
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	100%	0.0	99.66%	MT629852.1
	Pseudomonas siliginis	100%	0.0	99.66%	CP099600.1
	Pseudomonas moraviensis	100%	0.0	99.66%	CP099608.1
	Pseudomonas sp.	100%	0.0	99.66%	ON514339.1
Enterobacter	*Enterobacter cloacae*	100%	0.0	100.00%	MT613381.1
	Enterobacter asburiae	100%	0.0	100.00%	MT613375.1
	Enterobacter ludwigii	100%	0.0	100.00%	LR797773.1
	Enterobacter mori	100%	0.0	100.00%	MK872355.1
	Enterobacter sp.	100%	0.0	100.00%	MT355797.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	100%	0.0	100.00%	CP039929.1
	Elizabethkingia miricola	100%	0.0	100.00%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	100%	0.0	100.00%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	100%	0.0	100.00%	CP016377.1

Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	100%	0.0	100.00%	MT629852.1
	Pseudomonas moraviensis	100%	0.0	100.00%	MN826538.1
	Pseudomonas sp.	100%	0.0	100.00%	MT507071.1
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	100%	0.0	99.55%	CP082840.1
Enterobacter	*Enterobacter cloacae*	100%	0.0	99.42%	MT613381.1
	Enterobacter asburiae	100%	0.0	99.42%	MT613375.1
	Enterobacter ludwigii	100%	0.0	99.42%	LR797773.1
	Enterobacter mori	100%	0.0	99.42%	MK872355.1
	Pantoea agglomerans	100%	0.0	99.42%	MT102127.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	100%	0.0	99.85%	CP039929.1
	Elizabethkingia miricola	100%	0.0	99.85%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	100%	0.0	99.85%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	100%	0.0	99.85%	CP016377.1
Klebsiella	*Klebsiella pneumoniae*	99%	0.0	98.22%	CP092589.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	100%	0.0	100.00%	CP039929.1
	Elizabethkingia miricola	100%	0.0	100.00%	MH789417.1
	Elizabethkingia meningoseptica	100%	0.0	100.00%	KY910108.1
	Elizabethkingia ursingii	100%	0.0	100.00%	CP016377.1
Staphylococcus	*Staphylococcus capitis*	100%	0.0	99.68%	CP053957.1
	Staphylococcus sp.	100%	0.0	99.68%	MT448946.1
Pseudomonas	*Pseudomonas koreensis*	99%	0.0	99.69%	MT629852.1
	Pseudomonas moraviensis	99%	0.0	99.69%	MN826538.1
	Pseudomonas sp.	99%	0.0	99.69%	MT507071.1
Enterobacter	*Enterobacter cloacae*	98%	0.0	99.18%	MT613381.1
	Enterobacter asburiae	98%	0.0	99.18%	MT613375.1
	Enterobacter mori	98%	0.0	99.18%	MK872355.1
	Enterobacter ludwigii	98%	0.0	99.18%	MT083963.1
Pantoea	*Pantoea agglomerans*	98%	0.0	99.18%	MT367857.1
Elizabethkingia	*Elizabethkingia sp. 2-6*	99%	0.0	99.45%	CP039929.1

Elizabethkingia miricola	99%	0.0	99.45%	MH789417.1
Elizabethkingia ursingii	99%	0.0	99.45%	CP016377.1
Elizabethkingia meningoseptica	99%	0.0	99.45%	JX067927.1

Fonte: Sequências comparadas no *GenBank* (Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query (nih.gov).