



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



Dinâmica da diversidade bacteriana intestinal do mosquito *Aedes aegypti* responsiva ao vírus da dengue

VANESSA RAFAELA DE CARVALHO

BOTUCATU - SP
2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

‘JÚLIO DE MESQUITA FILHO’

Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Dinâmica da diversidade bacteriana intestinal do mosquito *Aedes aegypti* responsiva ao vírus da dengue

ALUNA: VANESSA RAFAELA DE CARVALHO

ORIENTADOR: JAYME AUGUSTO SOUZA NETO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, no Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Genética).

BOTUCATU – SP

2021

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Vanessa Rafaela de.

Dinâmica da diversidade bacteriana intestinal do mosquito
Aedes aegypti responsiva ao vírus da dengue / Vanessa Rafaela
de Carvalho. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Jayme Augusto Souza Neto
Capes: 20204000

1. Dengue. 2. Aedes. 3. Metagenômica. 4. Intestinos -
Bactérias.

Palavras-chave: Competência vetorial; Gene 16S rRNA;
Metagenômica; MiSeq Illumina.

“Não coloque limites nos seus sonhos, coloque fé.”
(Autor desconhecido)

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que mais me ajudaram nessa jornada
e que me incentivaram para a materialização desse objetivo.

Meus pais e meu irmão. Muito obrigada por tudo!

Eu amo muito vocês!

Agradecimentos

Primeiramente eu agradeço à **Deus** por sempre estar ao meu lado em toda minha jornada, pelas oportunidades concedidas, por me guiar e me dar forças para concluir mais esta etapa em minha vida.

Agradeço do fundo do meu coração meus pais **Benedita e Antônio** e ao meu irmão **Vando**. Obrigada estarem sempre presentes em minha vida, por conduzirem minha formação, priorizando e apoiando meus estudos. Obrigada pela paciência que tiveram em todos os momentos difíceis e pelo amor incondicional. Sei que vocês batalharam muito e se esforçaram ao máximo pensando no meu bem. Tenho muito orgulho de vocês e toda a minha dedicação, persistência no trabalho e na vida é para um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim. Eu amo vocês mais que tudo!

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto**, pessoa a qual admiro imensamente e tenho como exemplo de competência e profissionalismo. Obrigada por todos os ensinamentos, apoio, incentivo, confiança e paciência. Sou muito grata por ter aberto as portas do laboratório e por me ajudar em cada passo para meu desenvolvimento profissional e principalmente, por ter acreditado em mim, muitas vezes mais do que eu mesma acreditava. “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” (Cora Coralina)

Agradeço a todos os amigos, novos e antigos **do Laboratório de Genômica Funcional e Microbiologia de Vetores (Vectomics)**, Bruno, Bruna, Carolzinha, Clara, Felipe, Jaque, Jack, Kamilinha, Lê Oda, Leo, Lídia, Mari, Marcelo, Milena, Nath, Pati, Pedro, Raquel, Vitor, Vitoria A., e Vitória D. e Whis pela convivência, aprendizados e por fazerem eu me sentir tão bem no laboratório. E em especial, à Amandinha e Bianca que se tornaram minhas grandes amigas e companheiras. As quais estiveram presentes em todos os meus melhores e piores dias durante esse percurso. Agradeço pelas risadas, pelo trabalho e por me ajudarem a crescer profissionalmente e pessoalmente. Vocês são os presentes que ganhei durante o Doutorado.

Agradeço a todos meus colegas do **Departamento de Proteção Vegetal**, especialmente aos professores Carlos Frederico Wilcken, Silvia Renata Wilcken, Renate Krause, Regiane Bueno, Nivaldo e Marcelo Soman. Obrigado por toda compreensão e pelo convívio diário.

Agradeço ao professor **Josias Rodrigues**, meu orientador de Mestrado com quem aprendi muito sobre respeito e honestidade na pesquisa científica e no ambiente de trabalho. Obrigada por permitir minha experiência em seu laboratório, por ter acreditado em mim e por me incentivar a buscar cada vez mais conhecimento.

Agradeço ao meu grande amigo e professor **Valber Pedrosa** pelo incentivo, ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar. Também agradeço ao professor **João Pessoa Araújo Junior**, meu orientador de IC, o qual aprendi muito e me inspirou por sua competência.

Agradeço aos **colegas, funcionários e técnicos** do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), em especial **Bárbara C.** e Laboratório Central (LACEM) pela assistência prestada.

Agradeço às minhas grandes amigas **Maria, Luciane e Jordan** por terem participado intensivamente desses meus últimos anos de doutorado. Obrigada pela amizade de vocês, pelas alegrias compartilhadas e pelo apoio em todas as horas. Além disso, não posso deixar de agradecer aos meus amigos **Carol, Caio, Henrique, Jessica, Lais, Leili, Nuno, Paulinha, Tainá e Viviana** por estarem sempre do meu lado, comemorando minhas conquistas.

Agradeço aos meus ex-companheiros de trabalho do Instituto de Biociências, **Silvia Modolo, Eloiza, Julia, Élida, Betinha, Juliana e Daniel**. Éramos oito, mas continuamos sendo uma família. Obrigada por estarem comigo em todos os momentos, amo muito vocês.

Agradeço muito ao meu namorado **Eduardo Rossi**, que me presenteia todos os dias com seu amor, amizade e companheirismo. Sou uma pessoa mais feliz agora que tenho você comigo nessa jornada. Obrigada pelos ensinamentos, pelo incentivo e paciência. Amo muito você!

Agradeço a todos os **funcionários da seção de Pós-Graduação** do Instituto de Biociências que sempre souberam me auxiliar em tudo. Em especial, agradeço muito ao meu amigo Davi Müller, um profissional excelente, paciente e muito prestativo. Obrigada por me ajudar durante esses seis anos de pós-graduação.

Resumo

O vírus da dengue é um arbovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, transmitido no Brasil principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). A dengue é considerada uma das doenças mais infecciosas no mundo e de maior crescimento nos últimos anos, com impactos sociais e econômicos devido às altas taxas de morbidade e mortalidade desencadeadas pela infecção. A transmissão do vírus DENV por mosquitos vetores está diretamente relacionada à sua competência vetorial, isto é, a permissividade à infecção, replicação e transmissão do patógeno. Estas características têm sido associadas a fatores genéticos e a microbiota intestinal do inseto. As bactérias presentes no intestino médio são componentes-chave da competência do vetor, uma vez que o microbioma do mosquito altera características fisiológicas importantes como feminização, auxiliam na digestão, regulam a imunidade e o desenvolvimento do hospedeiro. Compreender como a microbiota intestinal influencia a competência vetorial é fundamental para elucidar o controle da propagação das doenças transmitidas por estes vetores. No município de Botucatu, SP foram capturados larvas de mosquitos de *Ae. aegypti* e analisou-se a composição da microbiota intestinal sob diferentes dietas (açúcar ou açúcar e sangue), estágios de desenvolvimento e em resposta à infecção pelo vírus da Dengue tipo 4, através do sequenciamento de nova geração da região hipervariável V4 do gene 16S rRNA. Foram detectados um total de 2736 unidades taxonômicas operacionais e quatro filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria. Os resultados evidenciaram que moduladores da diversidade da microbiota, como os estágios de desenvolvimento, a idade e dieta possuem potenciais implicações na diversidade bacteriana presente no intestino dos mosquitos. Os estágios de desenvolvimento têm efeito direto nas alterações da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, enquanto a microbiota de mosquitos machos e fêmeas apresentou diferenças, independentes da dieta. O fator dieta tem uma forte influência na alteração da microbiota uma vez que a alimentação sanguínea reduz a diversidade bacteriana intestinal. Os mosquitos infectados com DENV-4 tiveram microbiota mais homogênea e após 96 horas de ingestão do alimento, ocorreu restabelecimento na microbiota. Os resultados obtidos nesse estudo permitem compreender melhor os microbiomas do intestino médio do mosquito e podem auxiliar no entendimento do microbioma de mosquitos suscetíveis e refratários, bem como contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do vetor e/ou redução da transmissão de arbovírus.

Palavras-chave: Competência vetorial, gene 16S rRNA, Metagenômica, MiSeq Illumina.

Abstract

Dengue virus is an arbovirus of the family Flaviviridae, genus Flavivirus, transmitted in Brazil mainly by the mosquito *Aedes aegypti*. Dengue is considered one of the most infectious diseases in the world and has grown considerably in recent years, with social and economic impacts due to the high rates of morbidity and mortality triggered by the infection. Transmission of the DENV virus by vector mosquitoes is directly related to their vector competence, which is defined as permissiveness to infection, replication and transmission of the pathogen, characteristics that have been associated with genetic factors of the mosquito as well as with the insect's intestinal microbiota. The bacteria present in the midgut are key components of the mosquito's vector competence, since the mosquito's microbiome alters important physiological characteristics such as feminization, aids digestion, regulates host immunity and development. Understanding how the intestinal microbiota influences vectorial competence is essential to elucidate the control of the spread of diseases transmitted by these vectors. *Ae. aegypti* mosquitoes were captured in the city of Botucatu, SP and analyzed the composition of the microbiota under different diets (sugar or sugar and blood), stages of development and in response to infection by Dengue virus serotype 4, through the sequencing of a new generation of the hypervariable region V4 of the 16S rRNA gene. We detected a total of 2736 OTUs and four phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria. The results showed that modulators of microbial diversity, such as diet, age or environment, have potential implications for the bacterial diversity present in the gut of mosquitoes. The developmental stages have a direct effect on changes in the intestinal microbiota of the *Ae. aegypti* mosquito, while the microbiota of male and female mosquitoes showed differences, independently of the diet. In addition, the diet factor has a strong influence on altering the microbiota since blood supply reduces the total number of intestinal bacteria. Mosquitoes infected with DENV-4 had a more homogeneous microbiota and after 96 hours of food intake, reestablishment occurred in the microbiota. The results obtained in this study help to increase our current understanding of the mosquito's midgut and can assist in the understanding of microbial data from susceptible and refractory mosquitoes, as well as contribute to the development of new vector control and/or reduction strategies transmission of arboviruses.

Keywords: Vector competence, 16S rRNA gene, Metagenomics, MiSeq Illumina.

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica da incidência de dengue por região do Brasil	3
Figura 2 - Mosquitos <i>Ae. aegypti</i> macho e fêmea	5
Figura 3 - Ciclo de replicação viral	6
Figura 4 - Fatores extrínsecos e intrínsecos que afetam a capacidade vetorial	8
Figura 5 - Gêneros bacterianos identificados em Culidade	15
Figura 6 - Regiões variáveis do RNA ribossômico 16S	17
Figura 7 - Áreas de coleta de larvas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> em Botucatu-SP	20
Figura 8 - Desenho experimental dos pontos coletados para disseção do intestino de diferentes grupos	21
Figura 9 - Fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com sangue de carneiro e fêmeas alimentadas com sangue infectado com DENV-4	23
Figura 10 - Esquema ilustrando a estratégia de uso dos <i>primers</i> utilizados na preparação das bibliotecas para o sequenciamento do microbioma	27
Figura 11 - Fluxo de trabalho e ferramentas usadas para análise de dados no CLC Genomics Workbench	29
Figura 12 - Gel de agarose da reação de PCR de larvas, mosquitos machos e fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	30
Figura 13 - Mosquitos <i>Ae. aegypti</i> dissecados	31
Figura 14 - Cultura de células de inseto linhagem C6/36	33
Figura 15 - Comparação de células C6/36 sadias e infectadas com DENV-4	35
Figura 16 - Gráfico de curva padrão DENV-4	36
Figura 17 - Gel de agarose das reações de PCR de microbioma padronizadas	38
Figura 18 - Gráfico resultante da análise de diversidade alfa	40
Figura 19 - Análise de beta diversidade por estágio de desenvolvimento larval	42
Figura 20 - Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem dos estágios larvais do <i>Ae. aegypti</i>	43
Figura 21 - Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem dos estágios de desenvolvimento de fêmeas adultas do <i>Ae. aegypti</i>	44
Figura 22 - Padrão oscilatório das ordens mais abundantes entre os estágios de desenvolvimento	46
Figura 23 - Diagramas de Venn das OTUs entre estágios larvais e desenvolvimento	47

Figura 24 - Análise de beta diversidade da microbiota de mosquitos fêmeas e machos de <i>Ae. aegypti</i>	49
Figura 25 - Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem de mosquitos machos e fêmeas do <i>Ae. aegypti</i>	50
Figura 26 - Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> de acordo com a dieta	52
Figura 27 - Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> de acordo com a dieta	53
Figura 28 - Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com sangue de carneiro sadio ou infectado com DENV-4	55
Figura 29 - Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentadas com sangue de carneiro e sangue de carneiro infectado DENV-4	56
Figura 30 - Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> infectadas com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor	58
Figura 31 - Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> infectadas com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor	59
Figura 32 - Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentados com sangue, infectados com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor	61

Lista de Quadro e Tabelas

Quadro 1 - Gêneros bacterianos identificados na microbiota de <i>Ae. aegypti</i>	13
Tabela 1 - Determinação da hierarquia taxonômica de acordo com a similaridade de sequências 16S rRNA	18
Tabela 2 - Dados de coleta de larvas de mosquitos no município de Botucatu-SP	19
Tabela 3 - Tabela com número correspondente aos valores de concentração em PFU/ml e valores de Ct	36
Tabela 4 - Quantificação da concentração média da extração de DNA das amostras	37
Tabela 5 - Níveis de classificação taxonômica das amostras	39
Tabela 6 - Resultados da análise PERMANOVA entre os estágios de desenvolvimento	45
Tabela 7 - Resultados da análise estatística PERMANOVA de acordo com a dieta (apenas açúcar ou acrescido de ingestão de sangue) com os intestinos dissecados com 24 e 96 horas após ingestão dos alimentos	52
Tabela 8 - Resultados da análise estatística PERMANOVA entre diversidade da microbiota das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> alimentados com sangue, infectados com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor	62
Tabela Suplementar 1 - Lista de <i>primers reverse</i> para cada amostra utilizados para PCR de microbioma	79
Tabela Suplementar 2 - Lista de amostras quantificadas por RT-qPCR, grupos controle, infectado com DENV-4, infectado com DENV-4 inativado e valores de Ct	82
Tabela Suplementar 3 - Lista de OTUs compartilhadas entre os estágios larvais e estágios de desenvolvimento	82

Lista de Siglas e Abreviaturas

μL - Microlitro

Aedes aegypti - *Ae. aegypti*

Aedes albopictus - *Ae. albopictus*

cDNA - DNA complementar

CHIKV - Vírus Chikungunya

Ct - Limiar do ciclo (*cycle threshold*)

DENV - Vírus dengue

DENV-1 Vírus Dengue sorotipo 1

DENV-2 Vírus Dengue sorotipo 2

DENV-3 Vírus Dengue sorotipo 3

DENV-4 Vírus Dengue sorotipo 4

DMSO - Dimetilsulfóxido

Dpi - Dias pós-infecção

g – Unidade da força centrífuga relativa

MEB - Barreira de escape do intestino médio

MIB - Barreira de infecção do intestino médio

MP - Matriz peritrófica

NF - *Nuclease free*

NGS - Sequenciamento de nova geração

OMS - Organização Mundial da Saúde

OTU - Unidade Taxonômica Operacional

Pb - Pares de base

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Pen-Strep - Penicillina-estreptomicina

Permanova - *Permutational multivariate analysis of variance*

PFU - Unidade formadora de placa

pmol - Picomol

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

R.E. – Recém emergidos

RNA - Ácido desoxirribonucléico

RNAse - Ribonuclease

SFB - Soro fetal bovino

TB - Barreira de transmissão

TTGE - *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

UV - Ultra-violeta

v/v – Volume por volume

WNV - Vírus do Oeste do Nilo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dengue	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3. Mosquito vetor <i>Ae. aegypti</i> (Diptera: Culicidae).....	4
1.4. Vírus	5
1.5. Interação vírus-vetor	6
1.6. Controle do vetor	8
1.7. Microbiota intestinal de <i>Ae. aegypti</i> e competência vetorial	10
1.8. Composição da microbiota intestinal.....	11
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Obtenção e manutenção das colônias de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	18
3.2. Confirmação de espécie por PCR	21
3.3. Confirmação do sorotipo DENV-4 antes da infecção	22
3.4. Cultivo celular C6/36.....	22
3.5. Replicação, isolamento e infecção com DENV-4	22
3.6. Quantificação da Carga Viral absoluta de DENV-4 por PCR em tempo real (qRT-PCR)	23
3.7. Extração de RNA	24
3.7.1. Quantificação DNA/RNA total.....	24
3.7.2. Tratamento do RNA com DNase.....	25
3.7.3. Síntese de cDNA.....	25
3.8. Dissecção dos mosquitos	25
3.9. Extração de DNA.....	25

3.10. Preparo das bibliotecas da microbiota	26
3.10.1. Purificação dos produtos de PCR	27
3.10.2. Quantificação do produto de PCR purificado por qPCR.....	27
3.10.3. Preparo do cartucho de sequenciamento Illumina	28
3.10.4. Sequenciamento Illumina e processamento das sequências	28
3.11. Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Confirmação morfológica e molecular da espécie <i>Ae. aegypti</i> e dissecção do intestino	30
4.2. Padronização do cultivo celular C6/36	31
4.3. Padronização do isolamento viral e quantificação absoluta de DENV-4 em células C6/36	33
4.4. Quantificação absoluta de DENV-4 em intestinos de <i>Ae. aegypti</i>	36
4.5. Extrações de DNA total para análises de metagenômica	36
4.6. Padronização da reação de PCR de microbioma em triplicata	37
4.7. Análises da composição taxonômica bacteriana da população de campo de <i>Ae. aegypti</i>	38
4.8. Diversidades alfa e beta das amostras totais	40
4.8.1. Efeitos dos estágios de desenvolvimento na microbiota do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	41
4.8.2. Influência do sexo na microbiota do mosquito.....	48
4.8.3. Efeitos da dieta na microbiota do mosquito vetor da dengue	51
4.8.4. Influência na microbiota de mosquitos alimentados com sangue e sangue infectado DENV-4.....	54
4.8.5. Efeitos de infecção pelo DENV-4 e inativado em laboratório	57
4.8.6. Comparação das microbiotas de mosquitos alimentados com sangue, sangue infectado DENV-4 e inativado	60
5. CONCLUSÕES	63

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A dengue é uma enfermidade viral infecciosa transmitida por mosquitos, cujo agente etiológico é o vírus dengue (DENV), que pertence ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), e que se manifesta sob duas formas clínicas: a febre da dengue e dengue clássica (Burke et al., 2001). O impacto da doença sobre a população humana é notório, não apenas pelos sintomas causados como também pela ocorrência de óbitos. Os impactos econômicos são grandes devido aos custos com tratamentos, hospitalizações, controle dos vetores e às perdas no setor turístico (WHO, 2009).

A dengue é uma das arboviroses (doenças virais transmitidas por artrópodes) de maior importância médica no mundo, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais do globo (Halstead, 1979; Guzmán et al., 2010). A incidência global da dengue cresceu dramaticamente nas últimas décadas. Cerca de metade da população mundial está em risco. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima entre 100 a 400 milhões de infecções anuais pelo vírus dengue (DENV) no mundo, (WHO, 2020). Outro estudo sobre a prevalência da dengue estima que 3,9 bilhões de pessoas estão em risco de infecção pelo vírus da dengue (Brady et al., 2012). Os países tropicais são os mais afetados devido as suas características climáticas, ambientais e sociais (Teixeira et al., 2009; Decker, 2012).

A maioria das análises filogenéticas demonstram que o DENV-4 divergiu primeiro, seguido do DENV-2, e por fim o DENV-1 e o DENV-3 (Coffey et al., 2008). Evidências apontaram para a existência de um novo sorotipo de dengue restrito à circulação silvestre na ilha de Bornéu, região pertencente à Malásia, sendo classificado inicialmente como DENV-5 (Vasilakis, 2013, Mustafa et al., 2015). Entretanto, ainda se discute as consequências deste achado na epidemiologia da dengue caso esta linhagem seja confirmada como pertencente a um novo sorotipo.

No Brasil, em 2019 foram processadas 27.957 amostras para identificação de sorotipo DENV, e 608 foram positivas. Das amostras analisadas, 518 (85,2%) foram positivas para DENV-2 (Brasil, 2019a). O sorotipo 2 voltou a circular no fim de 2018, depois de 10 anos sob controle e, desde então, vem encontrando populações suscetíveis à doença (Brasil, 2019b). É uma situação alarmante, uma vez que o tipo 2 do vírus da dengue tem potencial mais grave, pois está associado ao choque e manifestações hemorrágicas relacionadas à dengue severa (Balmaseda et al., 2006, Guzmán et al., 2010).

Não é possível prever qual a forma da doença que um indivíduo infectado irá desenvolver. No entanto, o risco de evolução para as formas mais graves é quinze vezes maior na infecção secundária do que na primária, e por um diferente sorotipo viral (Poloni, 2009). Os anticorpos heterólogos pré-

existentes reconhecem o novo vírus, mas formam um complexo antígeno-anticorpo que não neutraliza o novo sorotipo. Além disso, este complexo de baixa avidéz facilita a adsorção e entrada da partícula viral nas células de defesa do hospedeiro, sobretudo em monócitos e macrófagos, gerando uma resposta imunológica exacerbada e, conseqüentemente, uma forma mais grave da doença (Monath, 1994).

O controle da doença é um importante desafio e há décadas que se tenta desenvolver uma vacina contra os quatro sorotipos virais da doença. A primeira vacina tetravalente de dengue (*yellow fever* -17D-dengue vírus – CYD-TDV; Dengvaxia®, Sanofi Pasteur) foi criada e liberada em alguns países e no Brasil as respectivas aplicações iniciaram-se em 28/12/2015. No entanto, a sua eficiência difere quanto aos quatro sorotipos do vírus dengue e varia em relação à idade e ao histórico de infecções anteriores do indivíduo a ser vacinado, além de ter custos elevados (Pitisuttithum & Bouckennooghe, 2016; Silveira et al., 2019).

Alguns medicamentos são recomendados nos casos de dengue apenas para aliviar sintomas, pois não existem terapias antivirais específicas. Por isso é premente a necessidade de novos conhecimentos e tecnologias para aprimorar o controle da doença. Atualmente a sua contenção está baseada principalmente no controle químico do principal mosquito vetor *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) (Diptera: Culicidae) (CDC, 2016; Lorenzi, 2016).

1.2. Epidemiologia

Desde o meio da década de 1940 até a década de 1960 o vetor foi praticamente eliminado de muitos países da América do Sul e Central, incluindo o Brasil. Entretanto, devido à redução da vigilância e dos programas de controle, houve reinfestação do *Ae. aegypti* e conseqüentemente a incidência de casos de dengue aumentou em 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO, 2013). Alguns fatores que influenciaram a multiplicação do mosquito foram: urbanização descontrolada, falta de gerenciamento na deposição adequada do lixo humano, falta de saneamento básico e mudanças climáticas (WHO, 2013).

A OMS estima que 2,5 bilhões de pessoas estão sob o risco de infecção (WHO, 2020) e cerca de 390 milhões de infecções ocorram anualmente, dos quais cerca de 550 mil demandam hospitalização, provocando ao menos 20 mil óbitos, considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Bhatt et al., 2013).

O Brasil registrou 1.544.987 casos de dengue em 2019, um aumento de 488% em relação a 2018, que é o segundo maior número de casos de série histórica do país (Brasil, 2019b). A região sudeste concentrou 60% do total de casos registrados no país em 2019, seguidos das regiões Centro-

Oeste, Norte, Nordeste e Sul. O estado de São Paulo foi responsável por mais de 33% dos casos de dengue seguidos de morte no país, com 400.184 casos registrados, seguidos por 263 óbitos (Brasil, 2019b). Em 2020 foram notificados 979.764 casos prováveis de dengue no país, até a semana epidemiológica 50 (24/12/2020) (Figura 1). Esta redução das notificações em relação ao mesmo período de 2019, deve-se a mobilização das equipes de vigilância epidemiológica perante a pandemia da covid-19, gerando atrasos ou subnotificações para os casos das arboviroses e outro fator importante é o receio da população de procurar atendimento em uma unidade de saúde (Brasil, 2020).

Determinadas pessoas podem ser infectadas e não manifestarem os sintomas. Este fato deve-se ao sistema imunológico desses indivíduos ou à baixa virulência da cepa em questão (Souza et al., 2002.) Para cada cinco casos sintomáticos, estima-se que haja um assintomático (Serufo et al., 2000; Souza et al., 2002). Na doença febril indiferenciada, a dengue assemelha-se à síndrome gripal, não sendo possível distingui-la clinicamente das outras (Souza et al., 2002).

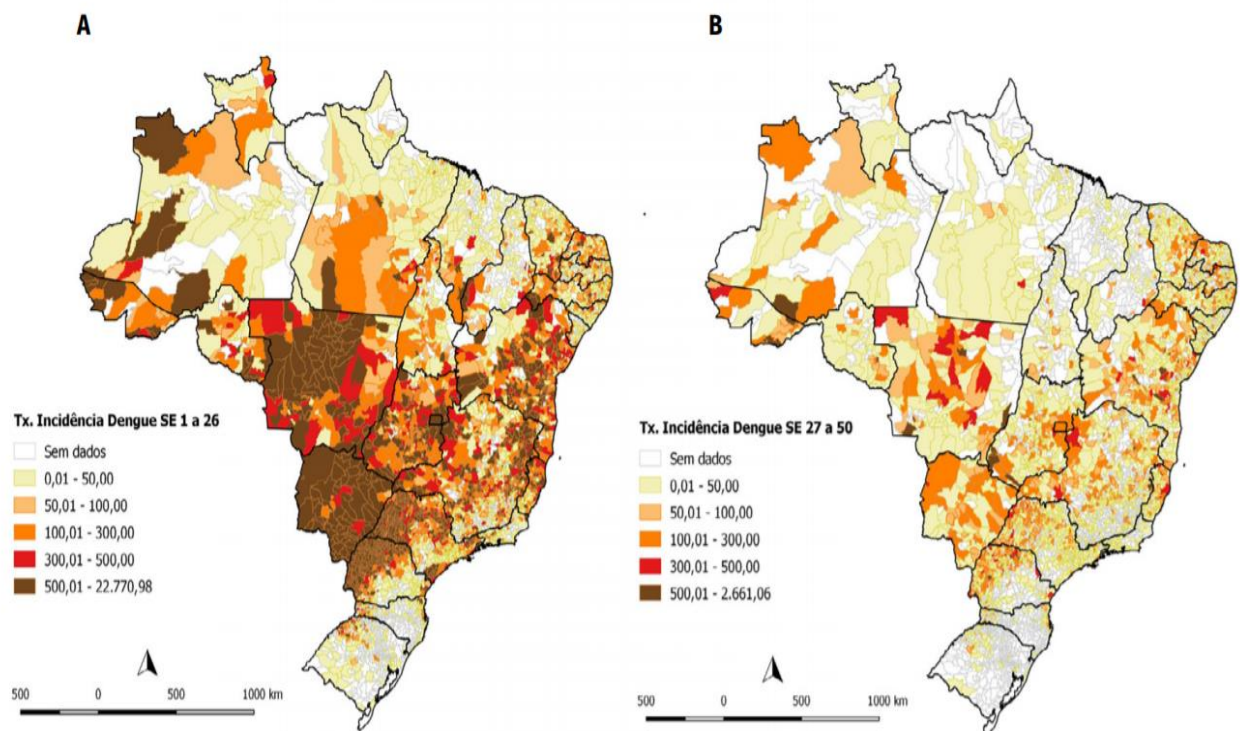


Figura 1. A. Distribuição da taxa de incidência de dengue por município, até a semana epidemiológica 1 a 26 de 2020. **B.** Distribuição da taxa de incidência de dengue por município, até a semana epidemiológica 27 a 50 de 2020. (Brasil, 2020).

1.3. Mosquito vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

O *Ae. aegypti* é o principal vetor na disseminação do vírus da dengue e é também responsável por transmitir outras arboviroses relevantes para a saúde pública - como as febres amarela, zika e Chikungunya - devido à sua morbidade e ao seu impacto econômico (David et al., 2013). Este inseto pertence à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Linnaeus, 1762). Morfologicamente o *Ae. aegypti* é pequeno porte, com cerca de 4-7 milímetros de comprimento, coloração escura com anelações prateadas no abdômen, pernas e tórax. Ele tem alto potencial invasivo e o seu ciclo de vida holometabólico tem metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adulto) (Carpenter & Lacasse 1974; Oliveira, 2015).

As larvas passam por estágios de desenvolvimento (L1 a L4) e possuem aspecto vermiforme, sendo alongadas e esbranquiçadas. O corpo está dividido em cabeça, tórax e abdome formado por oito segmentos. No segmento posterior do abdome há um sifão para respirar na superfície da água. O desenvolvimento larval se completa em 5 a 10 dias, desde que haja condições favoráveis de temperatura (25 a 29°C) e disponibilidade de alimento (Guedes, 2012). O estágio larval pode se desenvolver entre 12°C à 36°C (Farnesi et al., 2009).

Em seguida entram no estágio de pupa em que não se alimentam, e durante o qual fazem a transição entre o meio aquático e o terrestre. A pupa tem forma de “vírgula” e, tal como as larvas, possui cor esbranquiçada, à medida que se aproxima da transformação em adulto adquire coloração escura (Forattini, 2002).

Após emergência dos insetos adultos na superfície da água, e após a cópula e subsequente repasto sanguíneo. As primeiras 48 horas da etapa de ovo são críticas, e a temperatura e a umidade adequadas são fundamentais para a sua sobrevivência. O ciclo de ovo-adulto pode variar de 10 a 15 dias, dependendo das condições do ambiente (Forattini, 2002). Os mosquitos adultos vivem em média 2 a 4 semanas na natureza, podendo chegar a vários meses dependendo das condições de temperatura e umidade (FUNASA, 2001).

As fêmeas *Ae. aegypti* são geralmente maiores que os machos e distinguem-se por possuírem pequenos palpos com escamas brancas (Figura 2). Tanto o macho quanto a fêmea de mosquitos *Ae. aegypti* se alimentam de substâncias que contêm açúcar (néctar e seiva de plantas) e ocasionalmente as fêmeas se alimentam com sangue antes da cópula. Elas intensificam a hematofagia após a fecundação para realizar a maturação dos ovos e o desenvolvimento completo dos ovários. A hematofagia está associada com o seu potencial oportunista nos horários diurnos, ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo, mas consoante a disponibilidade de alimento elas também se alimentam de sangue durante a noite (Takken & Verhulst, 2013; WHO, 2016).

A transmissão do vírus inicia-se quando as fêmeas do mosquito picam um indivíduo que está na fase virêmica da doença (quatro a oito dias após a infecção). Uma vez infectado, o mosquito pode transmitir o vírus pelo resto da sua vida (Malavige et al., 2007).

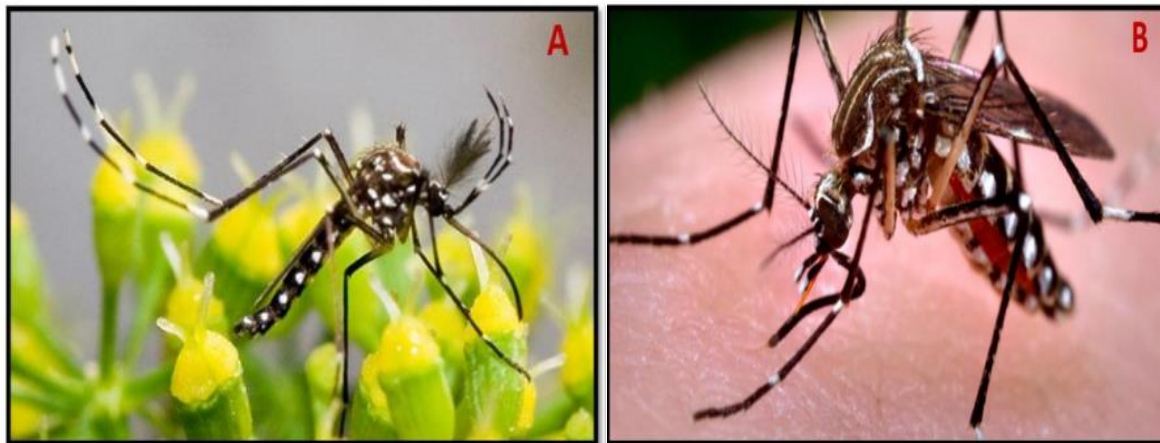


Figura 2. Mosquitos *Aedes aegypti*. **A)** *Ae. aegypti* macho (Foto: Marcos Teixeira de Freitas, Flickr); **B)** *Ae. aegypti* fêmea se alimentando de sangue de seu hospedeiro humano (Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC, 2013).

1.4. Vírus

O DENV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que é constituída de agentes virais responsáveis por causar enfermidades e mortalidade em humanos e animais. *Flavivirus* é gênero mais representativo da família, sendo constituído de 70 membros, dentre os quais: vírus dengue, vírus da Febre Amarela, Zika vírus, vírus do Oeste do Nilo e vírus da Encefalite Japonesa (Mukhopadhyay et al., 2005; Pinto et al., 2015).

O DENV é envelopado e mede 40-50 nm de diâmetro. O seu genoma de RNA fita simples é traduzido em uma poliproteína que é clivada por proteases do hospedeiro dando origem a três proteínas estruturais (Lindenbach et al., 2007). Existem sorotipos com propriedades antigênicas distintas, designados por DENV-1, -2, -3 e -4, que apresentam até 30% de divergência entre suas poliproteínas (Holmes & Twiddy, 2003).

A presença do envelope lipídico é uma característica comum do gênero, que é bastante utilizado em testes sorológicos rápidos, apesar da existência de reações cruzadas que dificultam a detecção de determinadas flaviviroses (Henchal; Putnak, 1990; Santos et al., 2008).

Fisiologicamente, o vírus precisa vencer diversas barreiras para que possa ser transmitido através de um vetor; 1) barreira de infecção do intestino médio (MIB) que impede o vírus de estabelecer infecção neste tecido; 2) barreira de escape do intestino médio (MEB) que bloqueia a

disseminação das partículas virais para a hemolinfa e órgãos adjacentes; 3) barreira de transmissão (TB) (Black et al., 2002; Lourenço-de-Oliveira et al., 2004).

Após ultrapassar essas barreiras, o processo de infecção pelo DENV se inicia com a ligação do vírus aos receptores na superfície de células susceptíveis, com endocitose da partícula mediada por receptor liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, que se dissocia em seguida e libera o RNA viral para ser traduzido por ribossomos da superfície do retículo endoplasmático (Figura 3) (Allison et al., 1995). É suposto que a maquinaria de replicação viral se localize no interior das vesículas formadas no retículo endoplasmático, sendo responsável pela replicação do genoma do vírus (Burke et al., 2001).

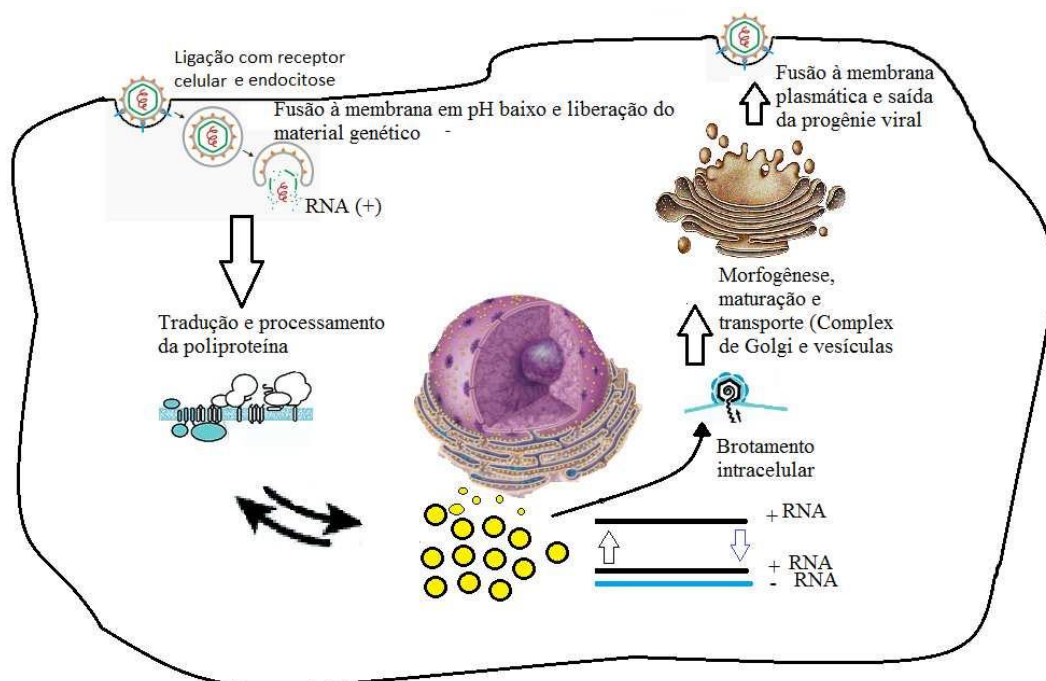


Figura 3. Ciclo de replicação viral. A entrada da partícula viral ocorre através da via de endocitose mediada por receptor. No pH ácido do endossoma a proteína sofre mudanças conformacionais que levam a fusão das membranas viral e endossômica (A). O RNA viral é traduzido e inicia-se o processo de replicação (B). A montagem das partículas virais ocorre no retículo endoplasmático (C, D), e as novas partículas imaturas recém formadas seguem pela via de secreção e completam a maturação na rede trans-Golgi (E). Posteriormente os vírus são liberados pela célula hospedeira (F). Adaptado Knipe e Howley, 2007.

1.5. Interação vírus-vetor

A transmissão do DENV pelo mosquito vetor está diretamente relacionada com a sua capacidade e competência vetorial, que pode variar entre diferentes espécies de mosquitos e entre

diferentes populações geográficas de uma mesma espécie (Rocco et al., 2001; Souza-Neto et al., 2019).

A competência vetorial é a habilidade intrínseca do vetor para infecção, replicação e transmissão do vírus (Bennett et al., 2002). Ela depende de vários fatores que permitem que um artrópode seja capaz de se infectar e transmitir um patógeno a um hospedeiro vertebrado, como por exemplo as barreiras anatômicas (MIB, MEB e as duas das glândulas salivares) que determinam a eficiência da infecção no vetor e a susceptibilidade à infecção (Figura 4) (Beerntsen BT, 2000). A capacidade vetorial depende do efeito modificador que fatores ambientais - como a frequência de contatos homem-mosquito, em função da abundância de mosquitos e seu tropismo exercem sobre a competência do vetor (Forattini, 1992). Os determinantes desta variabilidade não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que fontes extrínsecas e intrínsecas ao vetor são responsáveis por governar a susceptibilidade de uma população a um determinado arbovírus (Tabachnick, 2013).

A relação biológica vírus-vetor depende sobretudo dos seguintes fatores: genéticos, preferência alimentar, suscetibilidade ao patógeno infeccioso e concentração viral no hospedeiro vertebrado infectado. A interação entre imunidade inata do hospedeiro e microbioma residente está relacionada com alguns fatores como: 1) o sistema imune do vetor (vias de sinalização antiviral, *small* RNAs); 2) as suas barreiras físicas e moleculares; 3) mecanismos virais de escape destas defesas (Mukherjee et al., 2019; Rothman, 2020). Quando é infectado pelo vírus, o mosquito não tem alterações fenotípicas que o levem à morte (Obbard & Dudas, 2014). No entanto alguns trabalhos demonstram alterações fisiológicas nos insetos infectados, tais como: diminuição na atividade locomotora e na taxa de fecundidade; aumento da taxa de alimentação por sangue e da sobrevivência (Maciel-de-Freitas et al., 2011; Lima-Camara et al., 2011). Também já foi observada uma variação molecular do padrão de expressão de proteínas do intestino médio do *Ae. aegypti* após a infecção por DENV2, o que pode ter relação direta com a microbiota intestinal do mosquito, uma vez que a função de proteção da microbiota contra patógenos é um fator diretamente relacionado à competência vetorial (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010; Kramer & Ciota, 2015).

No mosquito, os vírus são adquiridos quando a fêmea do *Aedes* se alimenta de sangue em um humano em fase de viremia e inicia-se o ciclo de transmissão da dengue (Chouin-Carneiro et al., 2016). Nos primeiros 1-2 dias pós-infecção (dpi), as partículas virais infectam o epitélio do intestino médio onde iniciam sua replicação (Beerntsen et al., 2000). Após um período de 7 a 14 dias é atingido o pico máximo de vírus no intestino médio nas células do esôfago e nos outros órgãos (WHO, 2009). Em seguida, o vírus rompe a barreira intestinal e ao atingir a hemolinfa, se dissemina pelo corpo do vetor, infectando todos seus órgãos. A concentração máxima de vírus nestes órgãos se dá entre 12 e

18 dpi, que podem ser transmitidos pela saliva para um hospedeiro humano suscetível durante o próximo repasto sanguíneo (Salazar et al., 2007). Há também relatos da transmissão vertical do DENV, na qual as fêmeas transmitem o DENV aos ovos por passagem transovariana, mas este evento não possui significância epidemiológica conhecida por ocorrer muito raramente (Martínez et al., 2014; Vikram et al., 2015).

No homem, posteriormente a maturação vírus-induzida, ocorre a migração para os linfonodos e outros órgãos linfóides, com disseminação dos vírus para a circulação. No período de viremia (três a cinco dias), no qual os vírus circulam livres no plasma ou dentro de monócitos/macrófagos (Poloni, 2009; Laughlin et al., 2012). Durante o curso da infecção, ocorre a liberação de uma variedade de citocinas e mediadores, tais como as interleucinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, e interferon INF- α , que têm papel importante na gênese dos sintomas (Allonso et al., 2012).

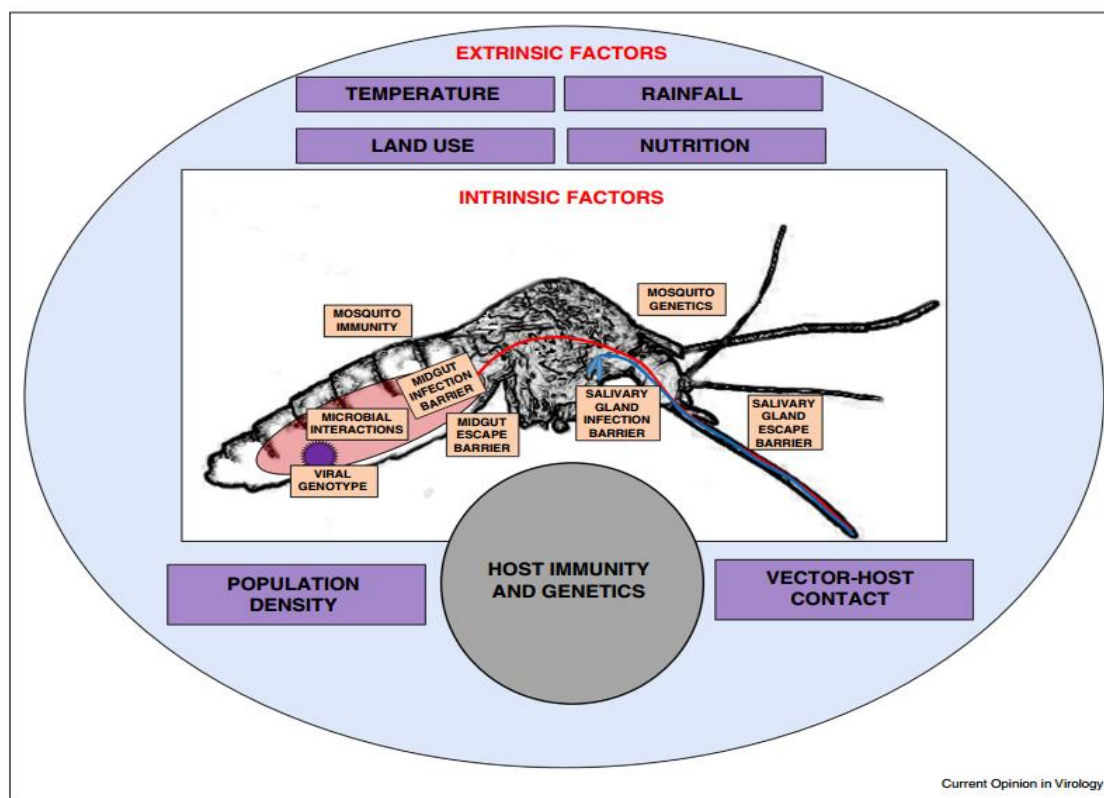


Figura 4. Fatores extrínsecos (temperatura, nutrição, quantidade de chuva, densidade populacional e contato vetor-hospedeiros) e intrínsecos (imunidade do mosquito, genética dos mosquitos, barreiras anatômicas e fisiológicas) que afetam a capacidade vetorial no mosquito vetor (Fonte: Kramer & Ciota, 2015).

1.6. Controle do vetor

Atualmente, as estratégias de controle do vetor podem ter diferentes objetivos dependendo dos recursos tecnológicos disponíveis, das condições socioeconômicas e medidas políticas existentes.

Segundo o manual da OMS, há três categorias de métodos de controle: químico, mecânico e biológico (WHO, 2012).

O controle químico é um dos métodos mais utilizados para tentar eliminar o inseto e consiste no uso de produtos químicos que podem ser, por exemplo, neurotóxicos, análogos de hormônio juvenil e inibidores de síntese de quitina para matar larvas e/ou insetos adultos (Zara et al., 2016). Porém, o seu uso negligenciado provoca impactos ambientais danosos no solo e na água, gera populações resistentes ao produto e desequilíbrio na cadeia ecológica, podendo matar insetos benéficos (Maciel-de-Freitas et al., 2011).

O controle mecânico refere-se à eliminação do ambiente físico de oviposição. Este método pretende interromper o desenvolvimento do ciclo do mosquito em médio prazo, implementando armadilhas e retirando ou adequando locais com potencial de acúmulo de água parada - os criadouros. Também se pode impedir diretamente a disseminação dos adultos, utilizando telas em ralos, janelas, portas e outros meios de acesso aos domicílios (Manrique-Saide et al., 2015; Zara et al., 2016).

O controle biológico envolve predação ou parasitismo do vetor, realizado por organismos metazoários ou microbiológicos. Um dos métodos de controle é feito por patógenos que liberam toxinas, como as bactérias *Bacillus thuringiensis var. israelenses* que agem como bioinseticida, não agredem o meio ambiente e já têm produtos disponíveis no mercado, como Bt-horus, Inova-Bti e Strike Bio-BTI (Ritchie, et al., 2010; Araújo et al., 2013). Outras ferramentas de biocontrole com micro-organismos são: interação das bactérias do gênero *Wolbachia* com o vetor, utilizada para reduzir a transmissão do vírus; fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*; nematoides entomopatogênicos como *Heterorhabditis bacteriophora* e *Steinernema rarum* (Sousa et al., 2013; Dutra et al., 2016). No entanto, o uso intensivo e repetido de biocidas pode levar ao desenvolvimento de resistência a mosquitos e efeitos indesejados em espécies não-alvo (Guégan et al., 2018).

Atualmente, estão sendo utilizadas estratégias genéticas para o controle de vetores, como por exemplo as técnicas de: produção de mosquitos transgênicos, produção de genes letais ou introdução de gene que reduza ou bloqueie a transmissão de doenças (Massonnet-Bruneel et al., 2013). Outra estratégia utilizada é baseada na técnica do inseto estéril, de dois tipos: 1) liberação de machos esterilizados por radiação; 2) integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico de fêmeas imaturas (Robinson et al., 2004; Bellini et al., 2013).

1.7. Microbiota intestinal de *Ae. aegypti* e competência vetora

Entende-se por microbiota a presença de micro-organismos que estabelecem residência permanente ou não, sem causar infecções ou nenhum outro dano ao hospedeiro em situações normais (Trabulsi & Alterthum, 2005). Os fungos, protozoários, vírus e bactérias compõem a microbiota intestinal e podem auxiliar a imunidade dos insetos (Kernbauer et al., 2014, Liu et al., 2019). No entanto, a maioria dos estudos têm se dedicado a microbiota bacteriana intestinal.

A utilização de micro-organismos simbiotes para reduzir a competência vetorial dos mosquitos aos patógenos humanos e controlar a disseminação das doenças transmitidas por estes vetores tem sido muito estudada (Cirimotich et al., 2011a; Apte-Deshpande et al., 2012; Bando et al., 2013).

Os mosquitos, assim como os demais insetos, têm seu intestino colonizado por micro-organismos simbiotes necessários para o seu desenvolvimento e para o funcionamento de diversos processos fisiológicos que auxiliam a: digestão do sangue, nutrição, reprodução, maturação do sistema imune, proteção contra patógenos e produção de vitaminas por algumas bactérias (Gaio et al., 2011; Weiss & Aksoy, 2011; Hurst & Hutchence, 2010). A variabilidade nas comunidades microbianas pode causar efeitos sobre a competência vetorial e alguns gêneros bacterianos podem mediar a susceptibilidade entre os mosquitos e os vírus, e interferir diretamente nos processos de reconhecimento, internalização e/ou replicação viral (Apte-Deshpande et al., 2012; Dennison et al., 2014).

Em culicídeos, a microbiota intestinal é essencial ao desenvolvimento e sobrevivência das formas imaturas, uma vez que larvas criadas em condições assépticas morrem rapidamente (Coon et al. 2014). Além disso, a adição de bactérias inativadas não produz o mesmo efeito, o que sugere que estes micro-organismos produzem nutrientes ou outras moléculas limitantes no criadouro e/ou auxiliam a digestão nas larvas (Mitraka et al. 2013).

A alteração de algumas bactérias específicas já tem sido correlacionada com um efeito direto na competência vetorial, como é o caso de *Enterobacter* sp. em *Anopheles gambiae* e de *Chromobacterium* em *Ae. aegypti*, que reduzem significativamente a suscetibilidade às infecções de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) e DENV, respectivamente (Cirimotich et al., 2011a; Ramirez et al., 2012). A suscetibilidade também aumenta devido à presença de bactérias específicas, como a *Serratia odorifera* e leva ao aumento de DENV2 em *Ae. aegypti* (Apte-Deshpande et al., 2012).

Outro estudo demonstrou que a reintrodução dos gêneros bacterianos *Proteus* e *Paenibacillus* no intestino médio do vetor após o tratamento com antibióticos, causou redução significativa de DENV, o que indica que essa reintrodução aumentou a expressão de genes do sistema imune inato

para causar um efeito antiviral (Ramirez et al., 2012). Isso evidencia que, em conjunto com os fatores genéticos do vetor, a microbiota intestinal interfere diretamente na produção de moléculas com ação antiviral e nos processos de reconhecimento, internalização e/ou replicação viral (Cirimotich et al., 2011a). Dessa forma, o estudo da sua influência na susceptibilidade do mosquito ao vírus, é uma forte justificativa para as investigações do uso da microbiota para o controle das doenças transmitidas por vetores.

1.8. Composição da microbiota intestinal

A composição do microbioma do mosquito pode variar dependendo de fatores como: espécie, sexo e fase de vida do mosquito; sua origem e localização geográfica; comportamento alimentar e o órgão pesquisado (Terenius et al., 2012; Moro et al., 2013). A relação entre esses micro-organismos e os insetos é complexa e pode variar de parasitismo para comensalismo ou mutualismo (Dillon & Dillon, 2004). Em relação a influência da microbiota intestinal na biologia dos insetos destaca-se a capacidade da comunidade microbiana de modular a infecção por organismos invasores, dentre eles patógenos transmitidos por vetores aos vertebrados (Azambuja et al. 2005; Cirimotich et al. 2011b).

O ciclo de vida do mosquito consiste em estádios aquáticos, larval, pupal e um estágio adulto terrestre. A microbiota do mosquito nestas fases pode ser distinta, devido a grande diferença entre os respectivos habitats (Moll et al., 2001). Por exemplo, as larvas desenvolvidas a partir de um rígido protocolo de esterilização (axênicas – sem microbiota), não conseguem atingir os estágios seguintes de desenvolvimento (De Block & Stoks, 2005; Crean & Marshall, 2011; Coon et al., 2014).

A diferença mais relevante na composição da microbiota ocorre entre macho e fêmea, devido a alimentação sanguínea, que por si só é um fator que altera a comunidade presente no intestino. Após a hematofagia, a microbiota intestinal da fêmea passa por alterações significativas com a redução da diversidade e aumento da carga bacteriana (Wang et al., 2011; Coon et al., 2014). Esta dinâmica ocorre por conta da síntese da matriz peritrófica (MP), que limita gêneros bacterianos no espaço ectoperitrófico, devido à afinidade destas bactérias com a MP ou com as células epiteliais do intestino e respectiva competição (Rodgers et al., 2017).

Contrastando com a complexidade aparentemente associada à formação da comunidade microbiana intestinal, alguns gêneros de bactérias são frequentemente encontrados no intestino dos culicídeos, como, por exemplo, *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Gusmão et al. 2010; Zouache et al. 2011; Ramirez et al. 2012; Terenius et al. 2012; Osei-Poku et al. 2012; Minard et al. 2015). No caso do *Ae. aegypti*, estas bactérias têm sido detectadas tanto em imaturos e adultos mantidos em laboratório quanto em mosquitos coletados no campo (Quadro 1). A presença de DENV

diminui significativamente o número total de bactérias do intestino do mosquito, mas desconhece-se o mecanismo pelo qual o vírus provoca alterações na composição da microbiota intestinal, e se também interfere especificamente na abundância relativa de bactérias anti-DENV (Ramirez et al., 2012).

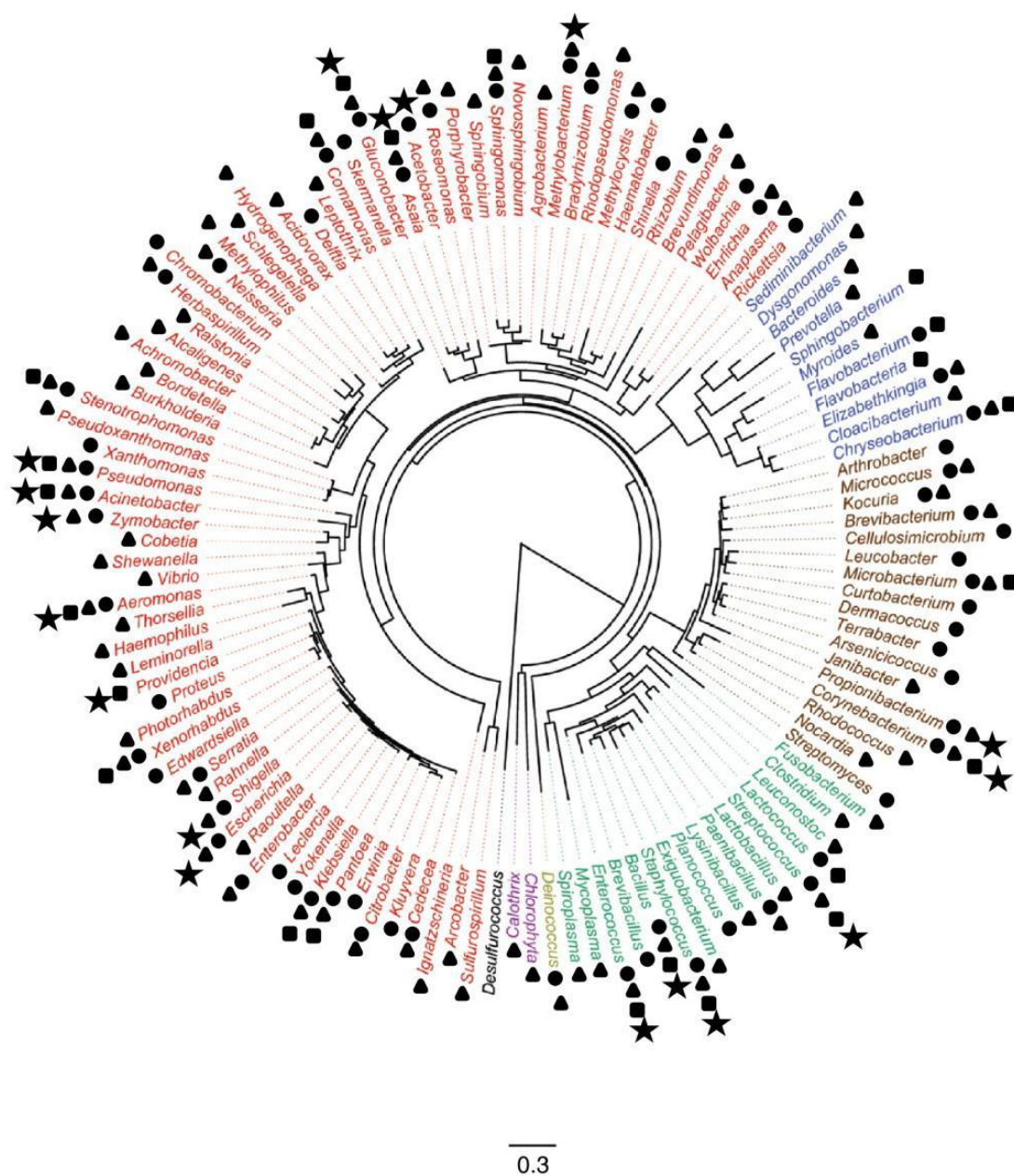
A árvore filogenética elaborada por Minard e colaboradores (2013) apresenta os gêneros bacterianos identificados em mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Mansonia* da família Culicidae (Figura 5).

Quadro 1. Gêneros bacterianos identificados na microbiota de *Ae. aegypti*.

Origem da população	Linhagem ou local de coleta	Metodologia utilizada	Fase do ciclo de vida	Sexo	Tamanho amostral total	Gêneros bacterianos identificados	Referências Bibliográficas
Laboratório	Rockefeller (Brasil)	Clonagem	Adultos	Fêmeas	100 médios intestinos	<i>Asaia, Bacillus, Klebsiella Pichia Serratia, Enterococcus, Cedecea, Citrobacter, Enterobacter</i>	Gusmão et al. 2010
Natural	Madagascar	Meios LB e PYC ágar	Adultos	Machos e fêmeas	04 indivíduos	<i>Bacillus, Asaia, Acinetobacter Staphylococcus, Enterobacter, Pseudomonas</i>	Zouache et al. 2011
Natural	Índia	Nutriente ágar	Larvas L3 e L4	-	15 intestinos médios	<i>Aeromonas, Edwardsiella, Pantoea, Pseudomonas, Serratia Bacillus, Brevibacillus, Burkholderia,</i>	Apte-Deshpande et al. 2012
Natural	Quênia	Sequenciamento Shotgun	Adultos	Fêmeas	10 intestinos médios	<i>Acetobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Asaia, Bacillus, Chryseobacterium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia/Shiguella, Gluconobacter, Lactococcus, Methylobacterium, Micrococcus, Pantoea, Propionibacterium, Providencia, Pseudomonas, Sphingomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Zymobacter</i>	Osei-Poku et al. 2012
Natural	Panamá	LB ágar	Adultos	Fêmeas	Não informado (intestino)	<i>Acetobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Asaia, Bacillus, Chromobacterium, Chryseobacterium, Comamonas, Enterobacter, Lactococcus, Leclercia, Micrococcus, Paenibacillus, Pantoea, Proteus, Pseudomonas, Roseomonas, Serratia, Shigella, Shinella, Staphylococcus</i>	Ramirez et al. 2012

Laboratório	Moyo (Quênia)	Clonagem	Adultos	Fêmeas	15 intestinos médios	<i>Bacillus, Pedobacter, Pseudomona, Rahnella,</i>	Charan 2013
Laboratório	Rockefeller	TSA sangue-ágar	Adultos	Fêmeas	90 abdomens	<i>Burkholderiaceae, Elizabethkingia, Enterococcus, Klebsiella, Pantoea, Serratia, Sphingomonas</i>	Terenius et al. 2012
Natural	Índia	Nutriente ágar	Adultos	Fêmeas	30 intestinos médios	<i>Aeromonas, Enterobacter, Klebsiella, Lysinibacillus, Micrococcus, Pantoea, Pseudomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas</i>	Yadav et al. 2015
Natural	Índia	Caldo de lisogenia, TSA e Columbia sangue ágar	Adultos	Fêmeas	31 intestinos médios	<i>Bacillus, Enterococcus, Exiguobacterium, Pseumonas, Staphylococcus, Yersinia</i>	Charan et al. 2016
Laboratório	Não informado	Sequenciamento Shotgun	Larvas L4	-	40 larvas inteiras	<i>Flavobacteriaceae Sphingobacteriales, Microbacteriaceae *</i>	Coon et al. 2014
Laboratório	Não informado	Sequenciamento Shotgun	Adultos	Fêmeas	120 indivíduos inteiros	<i>Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Microbacteriaceae, Propionibacteriaceae, Paenibacillus, Sphingobacteriales*</i>	Coon et al. 2014
Natural	Tailândia	TTGE	Larvas L4	-	Não informado	<i>Brevibacillus, Clostridium</i>	Dada et al. 2014
Natural	Índia	Clonagem	Adultos	Fêmeas	31 intestinos médios	<i>Aeromonas, Bacillus, Burkholderia, Moraxella, Pseudomonas, Sphingomonas, Serratia</i>	Charan et al. 2016

* Classificação taxonômica indicada apenas ao nível de família.



- *Aedes* mosquitoes (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. bromeliae*, *Ae. triseriatus*)
- ▲ *Anopheles* mosquitoes (*An. albimanus*, *An. arabiensis*, *An. coustani*, *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. maculipennis*, *An. stephensi*)
- *Culex* mosquitoes (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens*)
- ★ *Mansonia* mosquitoes (*M. africana*, *M. uniformis*)

Figura 5. Gêneros bacterianos identificados em Culicídeos (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Mansonia*). A árvore foi construída com base na sequência do gene 16S rRNA. As cores dos ramos indicam os filos: Proteobacteria (vermelho), Bacteroidetes (azul), Actinobacteria (marrom), Firmicutes, Tenericutes and Fusobacteria (verde), Cyanobacteria (roxo) e Deinococcus-Thermus (amarelo). Adaptado de Minard et al. 2013.

Atualmente, o estudo da filogenia e a classificação e identificação taxonômica de bactérias envolve o uso de marcadores moleculares, dentre os quais estão os genes ribossomais (Vandamme et al. 1996). O mais utilizado é o gene que codifica o 16S rRNA (~1500 pb) (Head et al. 1998). Este gene apresenta nove regiões variáveis com diversificação suficiente para permitir a utilização da sua sequência como ferramenta de classificação e identificação taxonômica, mas também possui regiões conservadas que possibilitam o desenho de iniciadores "universais" ou até mesmo específicos para certos grupos taxonômicos de bactérias (Head et al. 1998) (Figura 6). O gene 16S rRNA pode ser resolutivo quanto à família e em alguns casos, ao gênero da bactéria (Stackebrandt e Goebel 1994; Rosselló-Mora, 2012). A identificação molecular ao nível de espécie deverá envolver a análise de um conjunto mais amplo de genes ubíquos.

O corte de $\geq 97\%$ é baseado em dados que comparam a semelhança de 16S rRNA contra a hibridação DNA-DNA para bactérias em culturas puras. A hibridação DNA-DNA é expressa como uma porcentagem da quantidade do genoma de um organismo que hibrida ou liga-se ao genoma de um outro organismo. Alguns dos dados sugerem que dois organismos pertencem a uma mesma espécie e a sua hibridação DNA-DNA for $\geq 70\%$. Mas há um problema com este limiar, porque dois organismos que partilham $\geq 97\%$ 16S rRNA genes idênticos podem ou não podem pertencer à mesma espécie. Um exemplo são os ecótipos da cianobactéria *Prochlorococcus*, e outro os genes 16S rRNA de três espécies de *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. thuringiensis* e *B. subtilis*) que são $>99\%$ idênticos, mas as suas características fisiológicas são muito diferentes, e por isso há distinção entre as três espécies (Kirchman, 2012; Rosselló-Móra, 2012). Há ainda autores que sugerem valores de corte na identidade do gene 16S rRNA para vários níveis taxonômicos (Tabela 1).

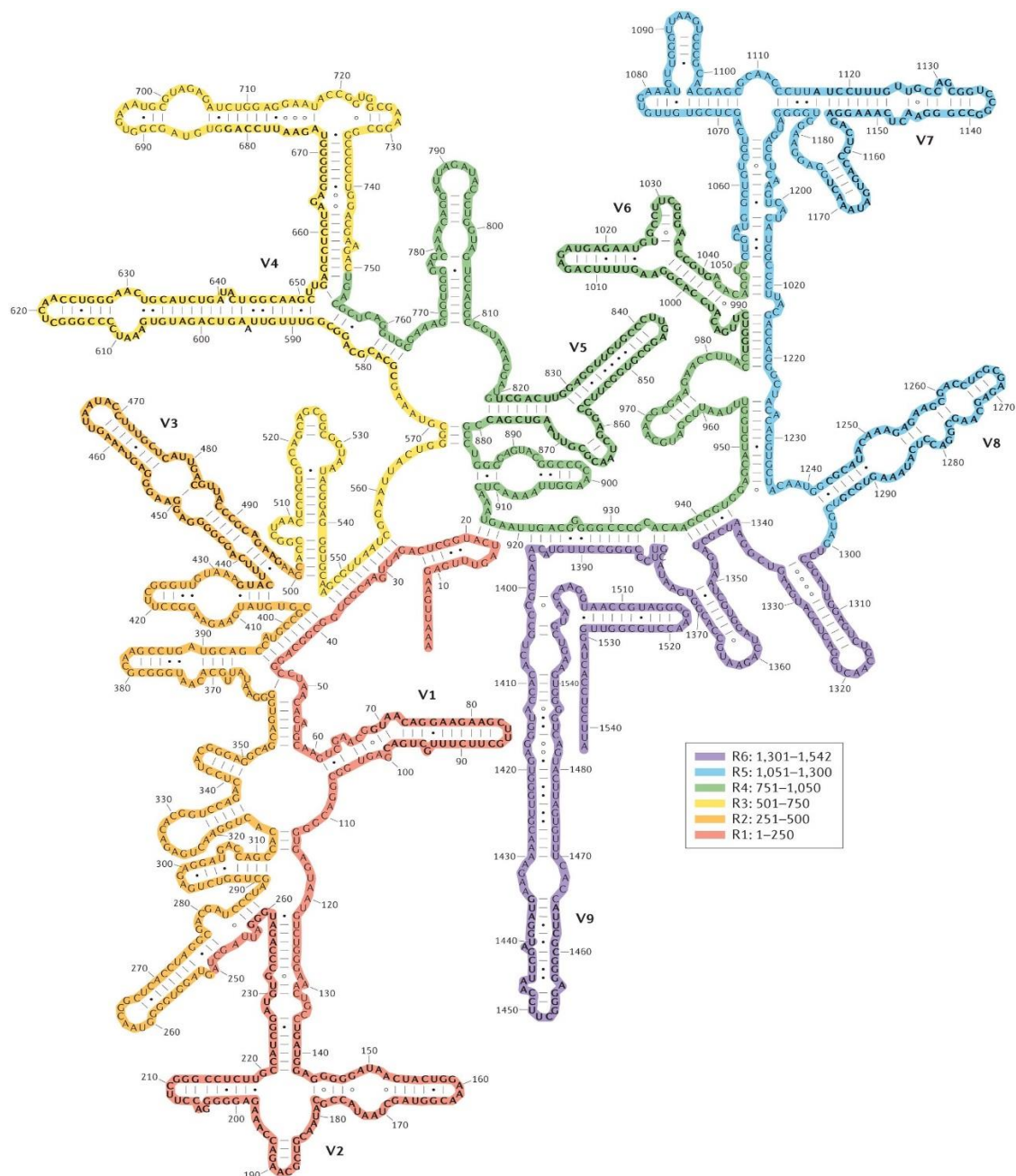


Figura 6. Regiões variáveis do RNA ribossômico 16S. Estrutura secundária do rRNA 16S. Em vermelho, fragmento R1 incluindo regiões V1 e V2; em laranja, fragmento R2 incluindo a região V3; em amarelo, fragmento R3 incluindo a região V4; em verde, fragmento R4 incluindo regiões V5 e V6; em azul, fragmento R5 incluindo regiões V7 e V8; e em púrpura, fragmento R6 incluindo a região V9 (YARZA et al., 2014).

Tabela 1. Determinação da hierarquia taxonômica de acordo com a similaridade de sequências 16S rRNA.

Hierarquia Taxonômica	Identidade
Cepa/estirpe	>97%
Espécie	97-99%
Gênero	>95%
Família	>90%
Ordem	>84%
Classe	>78%
Filo	>75%

Fonte: Kirchman (2012) e Konstantinidis; Tiedje (2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar as alterações na diversidade microbiana intestinal de uma população de mosquitos *Ae. aegypti* do município de Botucatu, SP em diferentes fases de vida e em resposta à infecção pelo vírus de Dengue tipo 4.

2.2. Específicos

- Identificar a diversidade da microbiota intestinal de uma população de mosquitos *Ae. aegypti* em Botucatu, SP através do gene bacteriano 16S rRNA;
- Comparar a microbiota intestinal nos diferentes estágios de desenvolvimento do mosquito e com diferentes dietas (sacarose e sangue);
- Verificar a variação da diversidade da microbiota intestinal do vetor *Ae. aegypti* em resposta à infecção pelo vírus de Dengue tipo 4 e vírus inativado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e manutenção das colônias de mosquitos *Ae. aegypti*

Foram coletadas 156 larvas de *Ae. aegypti* ao longo do período de novembro de 2017 a setembro/2018 (Tabela 2) em seis diferentes áreas no município de Botucatu, SP (Figura 7). Uma vez coletadas, as larvas foram mantidas no insetário do Laboratório de Genômica Funcional e Microbiologia de Vetores (Vectomics) da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA/UNESP) em Botucatu - SP, e ficaram

acondicionadas em bandejas até o desenvolvimento de pupas. Depois foram transferidas em gaiolas separadas para emergência do inseto adulto com a finalidade de identificação e confirmação morfológica e molecular da espécie do mosquito *Ae. aegypti*. Os mosquitos adultos foram mantidos em condições padrão de insetário (temperatura $27\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $80\pm10\%$ e fotoperíodo de 12h/12h). Esta população apresenta nível de resistência elevada ao vírus dengue de acordo com pesquisas do nosso grupo de trabalho (dados não publicados).

Tabela 2. Dados de coleta de larvas de mosquitos em seis diferentes áreas no município de Botucatu-SP (Geração F5).

Identificação do Criadouro	Nº de larvas coletadas	Datas das Coletas	Coordenadas Geográficas (Latitude/Longitude)	Código do cadastro SisGen
Criadouro 1	28	05/11/2017	-22.8948723 / 48.4413564	A2A7375
	16	03/02/2018		
	12	08/09/2018		
Criadouro 2	22	27/11/2017	-22.8966984 / -48.4423633	AA8D993
Criadouro 3	14	14/12/2017	-22.8753892 / -48.4426605	AFE0D95
Criadouro 4	08	08/01/2018	-22.8596054 / -48.435603	A13C31C
Criadouro 5	26	12/02/2018	-22.8898889 / -48.4448785	A468740
	16	13/03/2018		
Criadouro 6	14	14/08/2018	-22.8733367 / -48.4335125	A380334

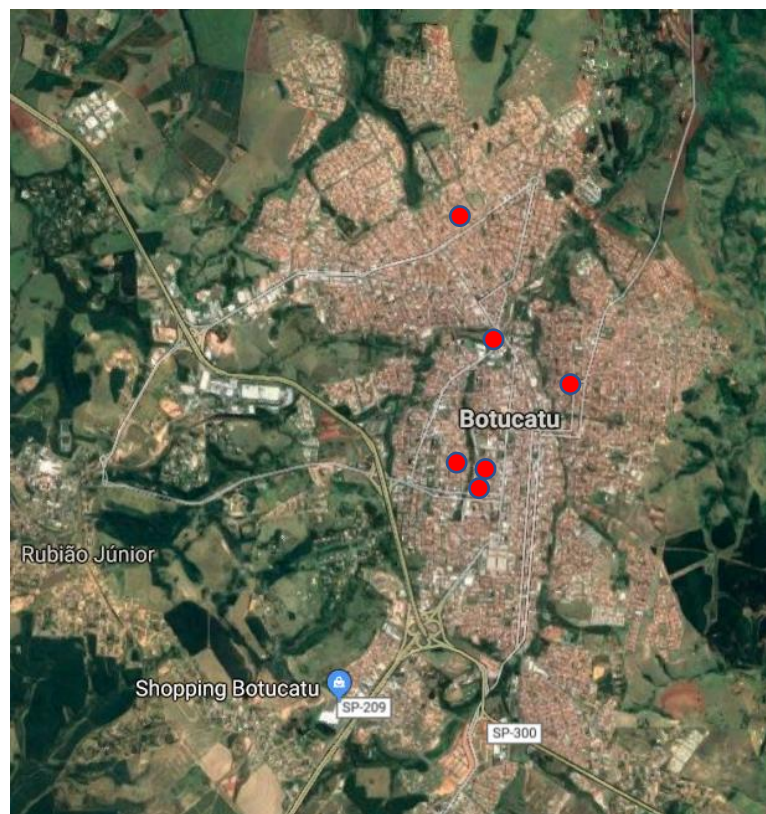


Figura 7. As seis diferentes áreas no município de Botucatu-SP onde foram coletadas as larvas de mosquitos *Ae. aegypti*. Fonte: 2018 Google-Imagens ©2018 TerraMetrics, Nasa, Dados cartográficos ©2018 Maplin.

Os ovos foram colocados para eclosão em bandejas com água destilada e suplementada com ração para peixe ornamental TetraMin (Tetra®). Após sete dias as pupas foram capturadas e transferidas para um recipiente plástico com água limpa, e acondicionadas em gaiolas para criação de mosquitos adultos. O recipiente foi mantido na gaiola por até três dias, período suficiente para os adultos emergirem.

Cada grupo de *Ae. aegypti* continha 15 larvas ou mosquitos para dissecções de acordo com as fases de vida, o tipo de alimentação (sacarose ou sangue) e infecção com sorotipo DENV-4 ativado ou inativado (Figura 8). Para os adultos alimentados com sangue de carneiro foi utilizado alimentador artificial modelo Isotemp Circulators 4100 H7 (Fisher Scientific), cobertos com papel parafilme foram abastecidos com sangue de carneiro e aquecidos à temperatura de 37°C através de um banho com circulação de água. Foram deixados nas gaiolas por 1 hora e as fêmeas ingurgitadas foram separadas para posterior dissecação. O grupo de adultos alimentados com sangue infectado com vírus DENV-4 (1/1) durante 1 hora. As fêmeas foram privadas de alimentação de sacarose por um período de 24h antes da alimentação. Para o grupo de adultos alimentadas com sangue infectado com DENV-4 inativado (proporção 1/1) foi realizada a inativação do vírus por calor 56°C por 1 hora. Os grupos de

mosquitos com 72 horas, foram subdivididos em dissecções dos intestinos dos insetos 24 horas após ingestão dos alimentos e 96 horas para as análises da microbiota intestinal.

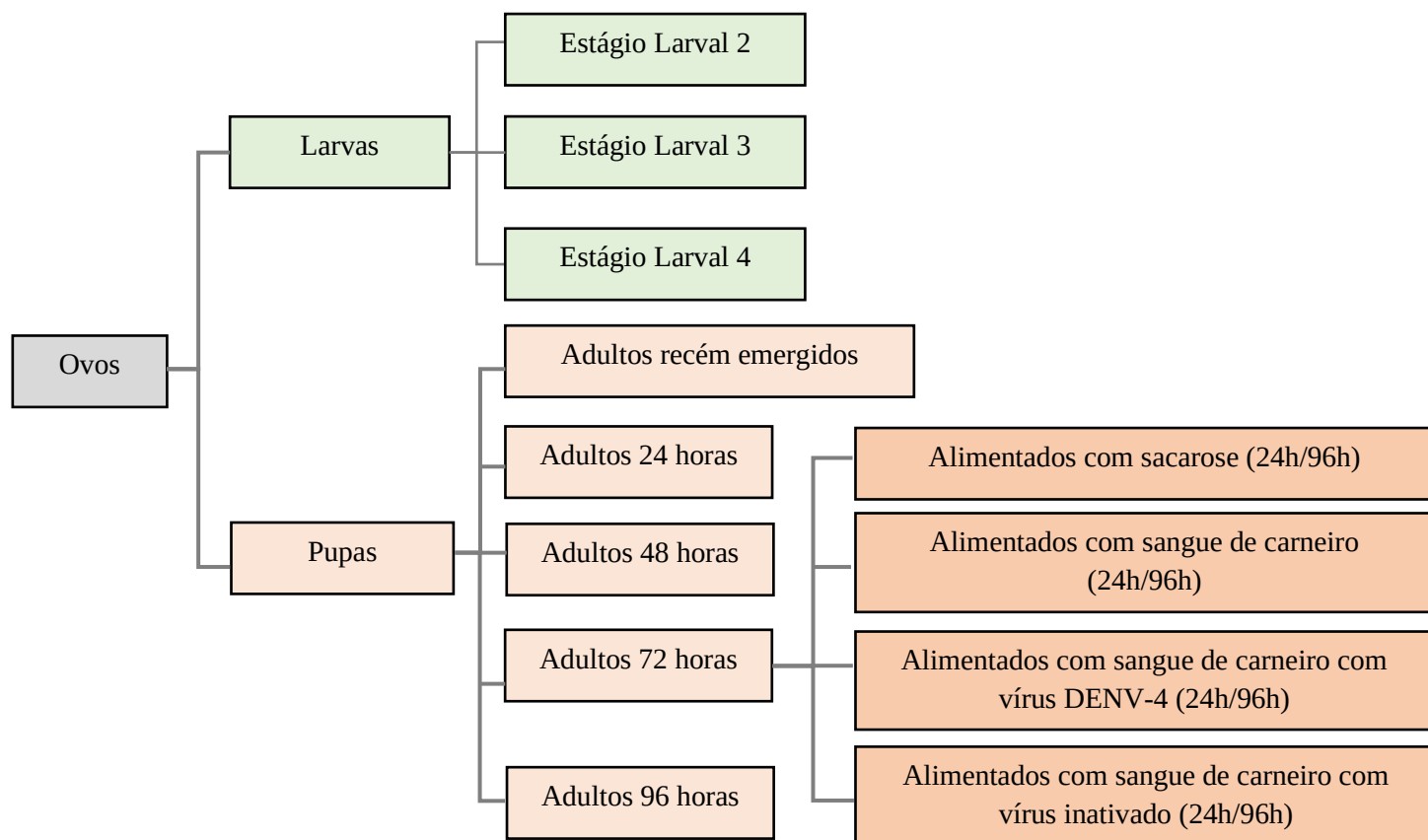


Figura 8. Desenho esquemático dos pontos para dissecção do intestino em grupos. Grupos de 15 larvas em diferentes estágios alimentados com ração de peixe; grupo de 15 adultos alimentados com solução estéril de sacarose 10% (m/v); grupo de 15 adultos alimentados com sangue de carneiro; grupo de 15 adultos alimentados com sangue infectado com DENV-4; grupo de 15 adultos alimentados com sangue infectado com DENV-4 inativado por calor. Foi realizada triplicata biológica.

3.2. Confirmação da espécie *Ae. aegypti* por PCR

Para confirmação molecular dos mosquitos foram realizadas as análises dos mosquitos coletados, sendo 5 larvas coletadas aleatoriamente, 5 mosquitos machos e 5 fêmeas e realizado pela técnica reação em cadeia polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para *Ae. aegypti*, 18SFHIN (F: GTAAGCTTCCTTTTACACACCGCCCGT) e aeg.r1 (R: TAACGGAC-ACCGTTCTAGGCCCT) (Higa et al., 2010). Os reagentes utilizados foram: 12,5µl de GoTaq, 1,0µl de cada primer, 3µl de DNA e 7,5 de µl água NF, totalizando 25 µl. Para a programação da reação de PCR utilizamos as seguintes etapas: 97°C por 4 minutos, 30 ciclos de 96°C por 30 segundos para

desnaturação, 48°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores, 72°C por 2 minutos para a fase de extensão da fita e extensão final 72°C por 4 minutos (Higa et al., 2010).

3.3. Confirmação do sorotipo DENV-4 antes da infecção

Foram utilizadas alíquotas de vírus DENV-4 devido à sua disponibilidade em nosso laboratório. As cepas são brasileiras, sendo o DENV-4 cedido pelo professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior. A confirmação das alíquotas foi efetuada por PCR e o sequenciamento por sequenciador automático de DNA Sanger (Modelo: ABI 3500 - Applied Biosystems) no Instituto de Biotecnologia (IBTEC - UNESP) com o primer universal para Flavivírus (F: GGTCTCCTCTAACCTCTAG e R: GAGTGGATGACCACG-GAAGACATGC) utilizados para amplificar parte da região da proteína não estrutural altamente conservada 5 (NS5) (Tanaka, 1993). Os reagentes utilizados foram: 12,5µl de GoTaq; 1,0µl de cada primer; 3µl de cDNA e 7,5 de µl água nuclease free (NF) totalizando 25 ul. Para a programação da reação de PCR utilizaram-se as seguintes etapas: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 53°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores, 72°C por 1 minuto para a fase de extensão da fita e extensão final 72°C por 5 minutos (Tanaka, 1993).

3.4. Cultivo celular C6/36

Para a replicação viral foi utilizada a linhagem de *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) C6/36 adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em garrafas de cultura celular de 75 cm² com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - suplementado com soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) 10% inativado, 1% L-glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais – e colocadas no interior de incubadoras modelo Water-Jacketed CO₂ Incubator (Shel lab) a 28°C e 5% CO₂.

3.5. Replicação, isolamento e infecção com DENV-4

Após a confirmação anterior, as garrafas T25 com a monocamada de células de *Ae. albopictus* C6/36 com 80% de confluência foram infectadas com alíquota de DENV-4. Primeiramente, o meio de cultura foi descartado da garrafa T25, deixando apenas de 1-3 ml de meio na garrafa e adicionados 500µl de vírus com 5x10⁶ PFU/ml. Em seguida a garrafa foi colocada em um agitador gangorra (K40-3012 - Kasvi) por 15 minutos e depois deixada em estufa de CO₂ à 28°C durante 45 minutos. Após esse período foram adicionados mais 9 ml do mesmo meio de cultura e incubado por 5 dias para produzir o isolamento viral. O líquido sobrenadante com o meio de cultura e as partículas virais foi transferido para Tubo Falcon de 50 ml e centrifugado à 22000 g por 5 minutos para separação das

células das partículas virais. Após a centrifugação, foram feitas alíquotas de 500µl para infecção dos mosquitos (Xi et al., 2008).

As fêmeas de *Ae. aegypti* da população de Botucatu foram infectadas com DENV-4 através de uma alimentação sanguínea artificial contendo partículas virais. Foi utilizado sangue comercial de carneiro, contendo uma solução de 400 µl com o sangue combinado com partículas virais, na proporção de 1:1 (Xi et al., 2008) e foram colocados em alimentador artificial modelo Isotemp Circulators 4100 H7 (Fisher Scientific) por 1 hora (Figura 9).

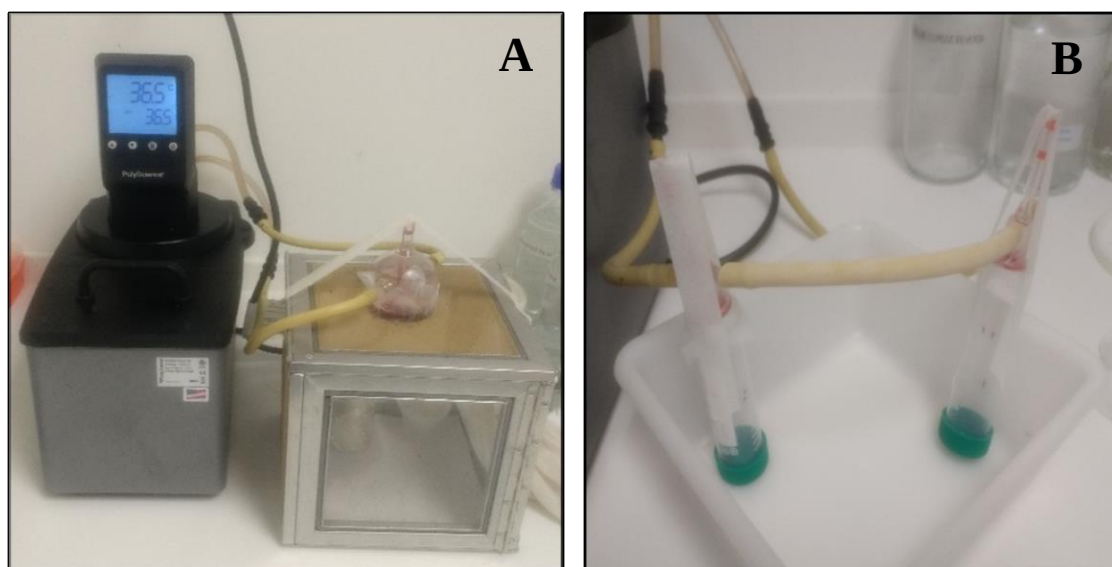


Figura 9. A) Fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue de carneiro desfibrilado com auxílio do alimentador artificial que mantém a temperatura do sangue a 36°C; **B)** Fêmeas de *Ae. aegypti* foram infectadas com DENV-4 através de uma alimentação sanguínea artificial combinado com partículas virais na proporção de 1:1. Fonte: Próprio autor.

3.6. Quantificação da Carga Viral absoluta de DENV-4 por PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para a quantificação da carga viral das alíquotas para infecção das células e partes dos mosquitos infectados com o DENV-4 empregou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando o equipamento QuantStudio3 Real Time PCR System (Applied Biosystems), no qual um par de iniciadores é utilizado para amplificar parte da região 5'UTR do DENV-4 (F: TCGGAAGCTTGCTTAACACA e R: TTCGTTGGTTCATTTTCCAG) (Sedda et al., 2018) e outro para amplificar parte da região que codifica a proteína ribossomal (Rp49/L32) (gene constitutivo de *Aedes aegypti*) utilizada como controle endógeno (F: ACAAGCTTGCCCCCAACT e R: CCGTAACCGATGTTTGGC) (Bonizzoni et al., 2011). As reações foram processadas de acordo com o protocolo sugerido pelo do kit GoTaq®1-Step RT-qPCR

(Promega) com reação total de 10 µl. Os reagentes utilizados foram: 5µl de GoTaq; 1,0µl de cada primer DENV-4; 0,2µl GoScript™MRT mix e 2,8µl de RNA viral. Para a programação da reação de PCR utilizou-se as seguintes etapas: 37°C por 15 minutos para a transcrição reversa; 95°C por 10 minutos para inativação da etapa de transcrição reversa e ativação da fase de amplificação; 40 ciclos com 95°C por 10 segundos para desnaturação da fita dupla, 60°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores, 72°C por 30 segundos para a fase de extensão da fita e extensão final 95°C por 5 minutos para dissociação, acrescido da temperatura de *melting* (T_m).

Foi realizada a detecção do RNA viral DENV-4 por meio de RT-qPCR para verificar a carga viral em intestinos dos mosquitos. Para isso foram infectados dez mosquitos por via oral com suspensão contendo sangue e DENV-4, e após 72 horas de infecção os intestinos dos mosquitos foram dissecados. Também foram analisadas dez amostras de intestinos com DENV-4 inativado por calor e amostras de controles, ou seja, sem infecção por DENV-4.

3.7. Extração de RNA

Para verificação da carga viral por qPCR, foram utilizados mosquitos adicionais alimentados com sangue infectados e após dissecação foram mantidos em 200µl de Trizol® Reagent (Life Technologies). Para o isolamento de RNA total pós homogeneização dos mosquitos macerados com reagente Trizol foi feita incubação em temperatura ambiente por 10 minutos e adicionado ao microtubo 40µl de clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 20000 g (rotações por minuto) por 15 minutos a 4°C. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo e neste foi adicionado 100 µl de isopropanol gelado e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Na sequência o microtubo foi novamente centrifugado a 20000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado com cuidado para não descartar o sedimento de RNA. O sedimento foi lavado com 200 µl de etanol 75% e depois de centrifugado por 5 minutos a 8000 g a 4°C, o etanol foi descartado e o microtubo deixado aberto para secagem do sedimento. O RNA foi homogeneizado em 50 µl de água livre de RNAses e estocado em freezer -80°C até a sua utilização.

3.7.1. Quantificação DNA/RNA total

A quantificação das amostras de DNA/RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific). A concentração de RNA foi mensurada em ng/µL, sendo convertida em µg/µL para ser utilizada na preparação do cDNA de cada amostra.

3.7.2. Tratamento do RNA com DNase

Em microtubos de 200 µL adicionaram-se: 2 µL do RNA total, 1 µL de tampão de reação 10X para DNase, 2 µL de DNase, 5 µL de água NF, totalizando 10 µL que foram colocados a 37°C. Após 30 minutos de incubação acrescentou-se 1 µL de EDTA 25 mM e depois manteve-se o tubo a 65°C por 10 minutos para ser de imediato resfriado em gelo.

3.7.3. Síntese de cDNA

Foi adicionado nas amostras 1 µL de Random *primers* e incubadas a 65°C por 5 minutos. Efetuou-se a síntese de cDNA utilizando o kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). As reações foram preparadas com os mosquitos individuais ingurgitados - provenientes dos ensaios de infecção - seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Adicionou-se 4 µL de tampão de reação 5x, 1 µL da enzima RiboLock RNase, 2 µL de Mix de dNTP e 1 µL da enzima RevertAid, totalizando volume final de 20 µL. Incubaram-se as amostras no termociclador Mastercycle Nexus X2(Eppendorf) a 25°C por 5 minutos, seguidos de 42°C por 1 hora e 70°C por 5 minutos, e no final armazenaram-se essas amostras em -20°C.

3.8. Dissecção dos mosquitos

Antes da dissecção todo o material utilizado ficou cerca de 20 min em luz ultravioleta (UV) e as pinças foram autoclavadas juntamente com o material preparado previamente antes como tampão fosfato-salino-estéril (PBS) 1x e água milli-Q. As superfícies das fêmeas de *Ae. aegypti* foram assepsiadas através da imersão individual em etanol a 70% por 3 minutos, seguida de cinco enxagues em PBS 1x por 2 minutos cada enxague. Dessa forma, o material isolado dos intestinos não sofreu interferência da microbiota superficial externa do mosquito. As pinças foram lavadas em álcool 100% e 2 enxaguadas água milli-Q. A dissecção foi executada com o auxílio de um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss) (Coleman & James, 2007), seguindo o protocolo padrão. Cada intestino dissecado foi mantido em tampão ATL do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen) em -20°C.

3.9. Extração de DNA

Os intestinos dissecados foram mantidos individualmente em 180 µL tampão ATL do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente foram adicionados 20µl de proteinase K (20 mg/ml) e 200µl de etanol (96-100%), misturados por vortex e incubados 56°C por 1 hora. O líquido foi transferido para coluna e

centrifugados a 6000 g durante 1 minuto. Foi descartado o líquido do tubo de coleta e adicionado 500µl de Tampão Buffer AW1, seguido de nova centrifugação por 1 minuto a 6000 g e descarte do líquido do tubo de coleta. Posteriormente foram adicionados 500µl de Tampão Buffer AW2, e centrifugado por 3 minutos a 20000 g. A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 ml e adicionou-se 100µl de tampão AE ao centro do filtro, incubado à temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e centrifugado 6000 g por mais 1 minuto. Armazenaram-se as amostras extraídas a -20°C.

3.10. Preparo das bibliotecas da microbiota

A PCR foi utilizada para a amplificação do gene 16S rRNA, utilizando-se pares de *primers* que compreendem a região hipervariável V4. Estes *primers* foram idealizados especificamente para análises de microbioma bacteriano a partir do rRNA 16S, presente na subunidade menor do ribossomo bacteriano (Caporaso et al., 2012). Enquanto no protocolo dos kits de preparo de biblioteca da Illumina, são necessárias duas PCR, uma para amplificação do fragmento de 16S rRNA e outra para a adição dos adaptadores, nesta metodologia os *primers* são separados em diferentes regiões, adaptador Illumina, index referente à amostra e região do primer referente à região constante do RNA ribossomal 16S (Figura 10). O *primer forward* (F) é o mesmo para todas as amostras e não possui a segunda região descrita anteriormente (F:AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCG GTAA). Por se tratar de um sequenciamento multiplex- em que as amostras são sequenciadas concomitantemente, cada um dos *primers reverse* (R) também contém um *index*, ou seja, uma sequência que será utilizada para diferenciar uma amostra de outra durante o sequenciamento (Tabela Suplementar 1). As reações realizaram-se em triplicata técnica.

Cada amostra corresponde a um intestino de mosquito, sendo utilizada 10 µl de DNA molde, uma quantidade acima do normal devido à baixa concentração de bactérias no material isolado. Usaram-se os reagentes: Tampão PCR 10x *Taq Platinum* (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); MgCl₂ 1,5 mM; 1 U de *Platinum® Taq DNA* polimerase (Invitrogen Life Technologies); dNTPs 2,5 mM (GE Healthcare); 1 µl de cada primer *forward* e *reverse* (10 pmol/µl), resultando num volume final de 25 µl. As amplificações efetivaram-se no termociclador Mastercycle Nexus X2(Eppendorf), iniciando em 94°C por 3 min, seguidas de 40 ciclos de 94°C por 45 s (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min e 30 s (extensão), e finalizando em 72°C por 10 min. Foram realizadas triplicatas técnicas para PCR. Os fragmentos amplificados visualizaram-se em transiluminador UV em géis de agarose a 2%, corados com HydraGreen (Actgene).

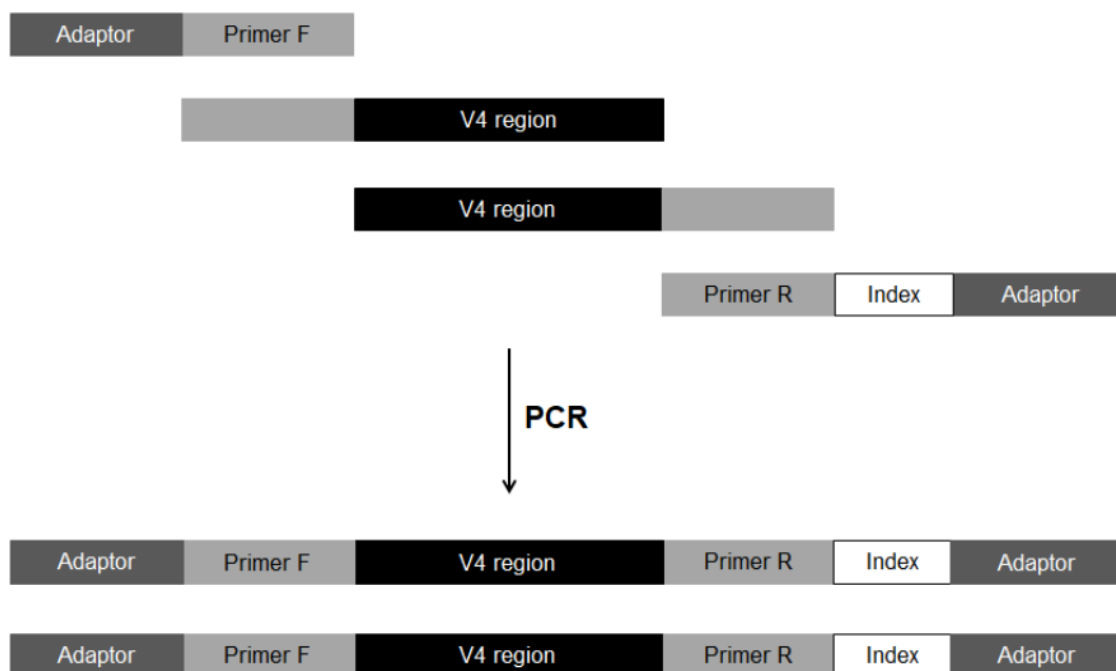


Figura 10. Esquema ilustrando a estratégia de uso dos *primers* utilizados na preparação das bibliotecas para o sequenciamento do microbioma (Nunes, 2018).

3.10.1. Purificação dos produtos de PCR

As bibliotecas geradas foram purificadas com o sistema de partículas magnéticas ou *beads* magnéticas (AMPure Agencourt) e um suporte magnético (Magnetic Stand – Life Technologies). A partícula magnética é formada por uma região que se liga ao DNA amplificado e outra que é atraída por magnetismo. Ao homogeneizar as partículas com o material amplificado, todo o DNA é ligado a elas. Em seguida posicionou-se a placa contendo o homogeneizado sobre o suporte magnético de modo que as partículas se agrupam na parede do recipiente formando um *pellet*. Nesta etapa descartou-se todo o sobrenadante e efetuaram-se duas lavagens com 200 µl álcool 70%. Para a dissociação do DNA das partículas magnéticas foi adicionado 40 µl de água *nuclease free* (Invitrogen) ao *pellet*.

3.10.2. Quantificação do produto de PCR purificado por qPCR

As bibliotecas purificadas foram quantificadas no aparelho QuantStudio 3 RealTime PCR (Applied Biosystems®). Foi necessária uma diluição no respectivo tampão de Quant da biblioteca NEBNext (1X) de cada amostra, conforme instruções do fabricante. Prepararam-se quatro padrões para a confecção de curvas de referência que delimitam os valores esperados da quantificação. Utilizou-se 2,0 µl de cada amostra diluída e 8 µl de solução preparada com fluorescência, fornecida pelo kit de quantificação NEBNext Library Quant (New England Biolabs). A técnica usou *primers*

que se anelam aos adaptadores Illumina presentes nas amostras. Após a quantificação, ajustou-se a concentração de cada amostra para 4 nM ideal para o sequenciamento.

3.10.3. Preparo do cartucho de sequenciamento Illumina

Eventuais variações na concentração de DNA amplificado em cada amostra podem influenciar a qualidade da reação de sequenciamento e o posterior resultado final. Para que isso não ocorra, ajustou-se a concentração de todas as amostras para 4,0 nM e adicionaram-se 5,0 µl de cada amostra em um *pool*. Combinaram-se os 5,0 µl deste *pool* com todas as amostras em uma solução de NaOH 0,2 N recém preparada e tampão Hyb, obtido no kit MiSeq Reagent V2 (300 ciclos), obtendo-se ao final um pool de bibliotecas à 10 pM. Juntou-se este conteúdo ao cartucho (kit MiSeq Reagent v2) e adicionaram-se 3 *primers* (sentido, *index sequence* e anti-sentido) em compartimentos diferentes, que correspondem às sequências de adaptadores (Caporaso et al., 2012).

3.10.4. Sequenciamento Illumina e processamento das sequências

Procedeu-se ao sequenciamento de nova geração (NGS) no equipamento de MiSeq Personal Sequencer (*Illumina*) do Hemocentro (UNESP/Botucatu), pela *workflow Metagenomics*, com três kits MiSeq Reagent V2 (300 ciclos) com capacidade para gerar 15 milhões de reads cada. A plataforma Illumina oferece a possibilidade de sequenciamento em multiplex, que permite o processamento de várias amostras em uma única corrida. Cada amostra é amplificada com um adaptador, que consiste em uma sequência de nucleotídeos específicos para cada amostra a ser processada, o que permite a identificação direta dos micro-organismos de cada amostra. Os dados foram pré-processados pelo software MiSeq Report, que gera arquivos no formato fastq e de multiplexados. Executaram-se as análises com o software CLC Microbial Genomics Module (Qiagen) seguindo as orientações do manual do usuário.

3.11. Análises estatísticas

Processaram-se as análises estatísticas no *software* CLC Microbial Genomics Module (Qiagen), utilizando os parâmetros de alfa e beta diversidade. A alfa diversidade é um parâmetro utilizado nas análises de microbioma que identifica se cada amostra do estudo é representativa para serem posteriormente comparadas, enquanto a segunda estima as diferenças de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) entre as amostras do estudo. As OTUs baseiam-se em um agrupamento de bactérias em nível de similaridade na sequência do gene 16S rRNA, banco de dados Silva 97%. Esta

abordagem é especialmente útil quando se trata de micro-organismos ainda não descritos, grupos candidatos e/ou não cultiváveis (Schloss e Westcott, 2011).

Para o cálculo de alpha-diversidade construiu-se uma árvore filogenética com as 100 OTUs mais abundantes da análise usando o método *Maximum Likelihood* que se baseia no alinhamento múltiplo de sequencias pelo software MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by LogExpectation*) pelo software CLC Microbial Genomics Module. Para estimar as diferenças fez-se uma análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a medida de Bray-Curtis. O índice de Bray-Curtis pode ser expresso como uma proporção de similaridade ou dissimilaridade (distância) na abundância das espécies. Para completar os dados de beta-diversidade executou-se a análise PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) no software CLC Microbial Genomics Module (Figura 11).

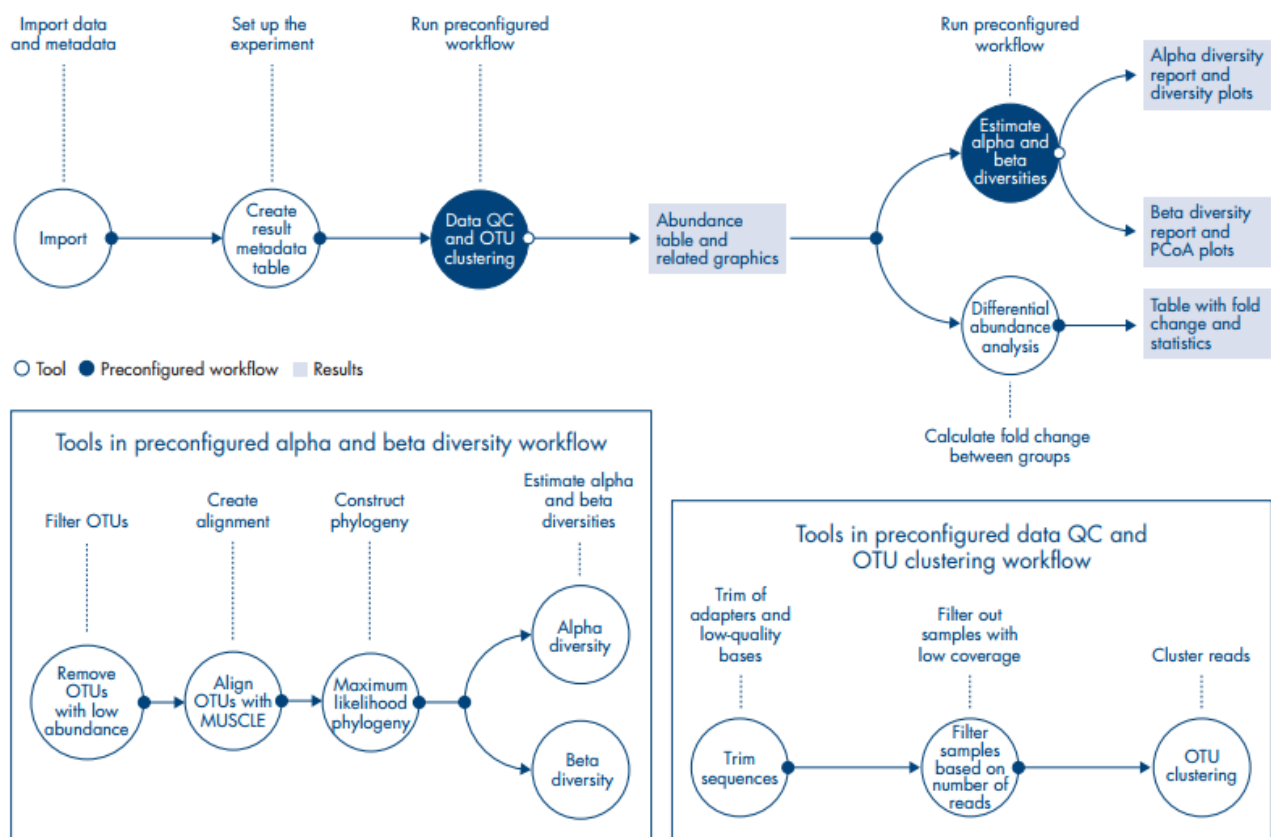


Figura 11. Fluxo de trabalho e ferramentas usadas para análise de dados no CLC Genomics Workbench 10.0. (Acesso: <https://digitalinsights.qiagen.com/?whitepapers=characterizing-microbiome-targeted-sequencing-bacterial-16s-rna-fungal-regions>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Confirmação morfológica e molecular da espécie *Ae. aegypti* e dissecação do intestino

Realizou-se a análise morfológica com a lupa estéreo microscópio (ZEISS Stemi DV4) e observou-se as principais características do *Ae. aegypti*: 0,5 cm de comprimento (em média) corpo escuro com pequenos riscos brancos no dorso, na cabeça e nas pernas. No mesonoto recoberto de escamas escuras há um desenho em forma de lira de escamas branco-prateadas. Visualizaram-se os fragmentos de amplificados em transiluminador UV em géis de agarose a 1%, corados com Hydra Green (Actgene), sendo que a banda de 550 pb confirma a espécie (Figura 12). Após confirmação da espécie *Ae. aegypti*, produziu-se as colônias de campo mantidas em condições padrões de insetário (temperatura $27\pm1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $80\pm10\%$, fotoperíodo de 12h /12h).

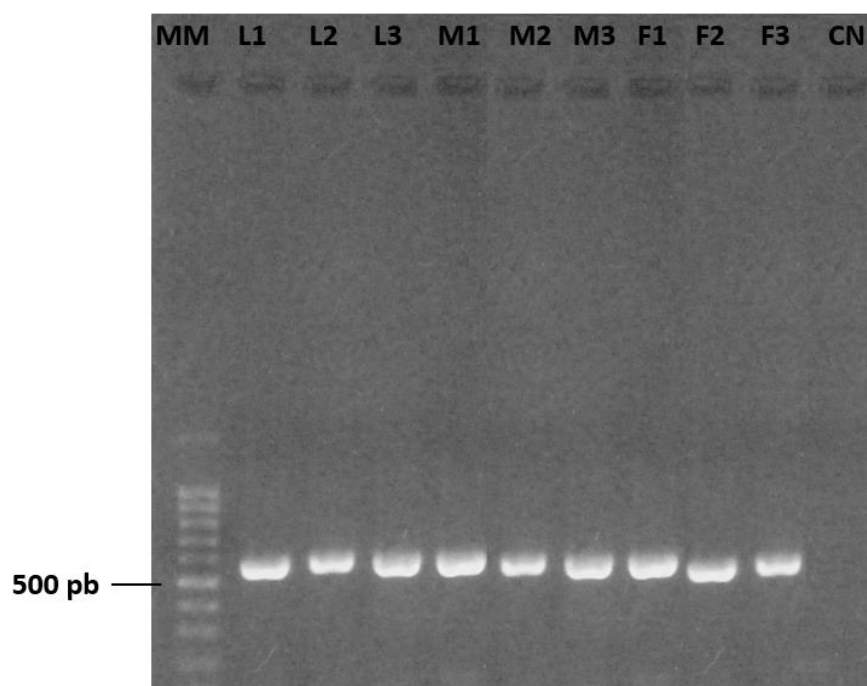


Figura 12. Gel de agarose da reação de PCR de larvas, mosquitos machos e fêmeas de *Ae. aegypti*. MM: Marcador molecular 1 Kb. L1, L2, L3 são amostras de larvas em estágio 4; M1, M2, M3 amostras de mosquitos adultos machos; F1, F2, F3 amostras de mosquitos adultos fêmeas; CN: controle negativo.

A dissecação foi executada de acordo com o item 3.5 e com o auxílio de um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss) (Coleman & James, 2007). Cada intestino dissecado (Figura

13) foi mantido em tampão ATL do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen) em -20°C.

Conforme exposto neste trabalho, decidiu-se coletar mosquitos *Ae. aegypti* de campo em Botucatu (SP) para estudar a diversidade microbiana intestinal, pois as cepas comumente utilizadas em laboratórios de Rockefeller nem sempre reproduzem as peculiaridades dos mosquitos no campo que estão normalmente expostos a uma diversidade maior de patógenos (Sim et al., 2013). Além disso, estudos recentes do nosso grupo de pesquisa observaram que, após se alimentarem com sangue contaminado DENV-4, apenas 30% dos mosquitos coletados em Botucatu (SP) se infectaram, enquanto o índice foi de 70 - 80% em Neópolis (SE) e Campo Grande (MS) que tem populações de mosquitos originárias de locais com maior incidência de dengue (Dreyer, 2015).

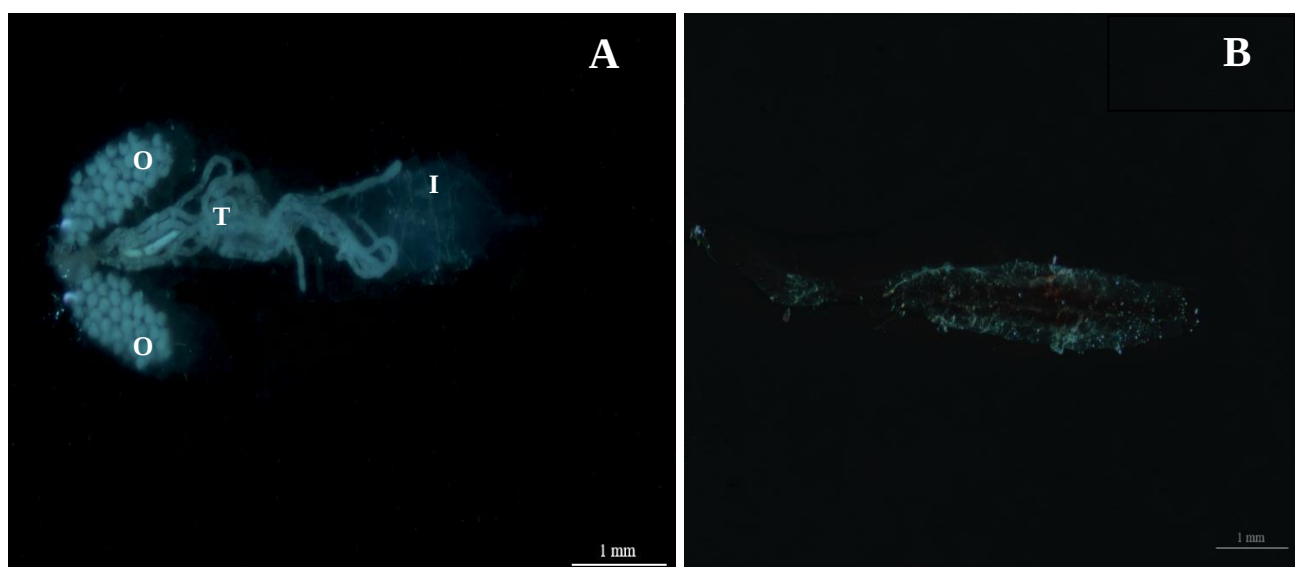


Figura 13. A) Mosquitos *Ae. aegypti* dissecados. O: Ovários, T: Túbulos de Malpighi, I: Intestino médio. B) Dissecação do intestino com resquícios de sangue.

4.2. Cultivo celular C6/36

Apesar da ampla disponibilidade de protocolos para cultura de células de mosquitos, neste trabalho foi necessário padronizar as condições experimentais em laboratório. Há três linhagens principais utilizadas para esta prática: clone de células C6/36 (*Ae. albopictus*), TRA 284 (*Toxorhynchites amboinensis*) e AP 61 (*Aedes pseudoscutellaris*). Dentre estas linhagens, o clone de células C6/36 do *Ae. albopictus* é o mais usado (Dalla-Bona et al., 2011; Poloni et al., 2009). O cultivo das células linhagem C6/36 em laboratório é o método mais rápido e sensível para o isolamento do vírus da dengue (De Paula e Fonseca, 2004). Testaram-se diferentes antibióticos: gentamicina, Pen-Strep (Penicillina-estreptomicina) e antifúngico anfotericina B em diferentes concentrações (0,4%,

0,6%, 0,8% e 1%) para evitar contaminações. Como se observou um crescimento lento das células quando se aplicaram altas concentrações de antibióticos ou se usou mais de um antibiótico em simultâneo, padronizou-se a utilização apenas de gentamicina à 0,4%.

A vantagem da utilização de sobrenadante de células frescas infectadas ao uso alíquotas congeladas, é o maior título viral, porque uma etapa de congelamento e descongelamento de uma suspensão de vírus diminui o título viral em dez vezes no mínimo (Gonçalves, 2010). Richards et al. (2007) submeteram *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* a um processo de alimentação artificial contendo sangue misturado com o vírus congelado da encefalite de Saint Louis e o vírus fresco da DENV-2. Verificou-se que as taxas de infecção e a competência vetorial foram significativamente maiores para mosquitos alimentados com sangue contendo células infectadas com vírus frescos. Miller (1987) obteve resultados semelhantes utilizando como modelos o vírus da febre amarela e o da febre do Valley Rift (Miller, 1987). A diminuição da infectividade com vírus congelado deve-se à redução do seu título viral, provocada por mudanças estruturais nos vírions, que restringem a ligação de seus receptores com as células dos mosquitos (Miller, 1987). A utilização de células frescas infectadas é bastante vantajosa pois acredita-se que as características destes vírus sejam mais próximas do real.

Com base na interpretação dos resultados descritos na literatura, utilizamos o sobrenadante de células frescas infectadas em nossos experimentos. Para o processo de estocagem de células em nitrogênio líquido, testaram-se alíquotas com meio de manutenção cultivo celular com 10%, 20%, 90%, 95% SFB e acrescentados com 10% DMSO (Dimetilsulfóxido) ou 5% DMSO. Observou-se maior viabilidade celular quando as células eram descongeladas por alíquotas contendo 95% SFB com 5% DMSO, ou seja, sem meio de cultivo celular, apenas com SFB.

Para promover a infecção celular com sorotipo DENV-4 manteve-se o cultivo celular sem adicionar o antibiótico, para não influenciar a microbiota dos mosquitos quando a oferta do sangue infectado (Figura 14). Manteve-se uma garrafa em condições normais com antibiótico, para a manutenção do cultivo celular.

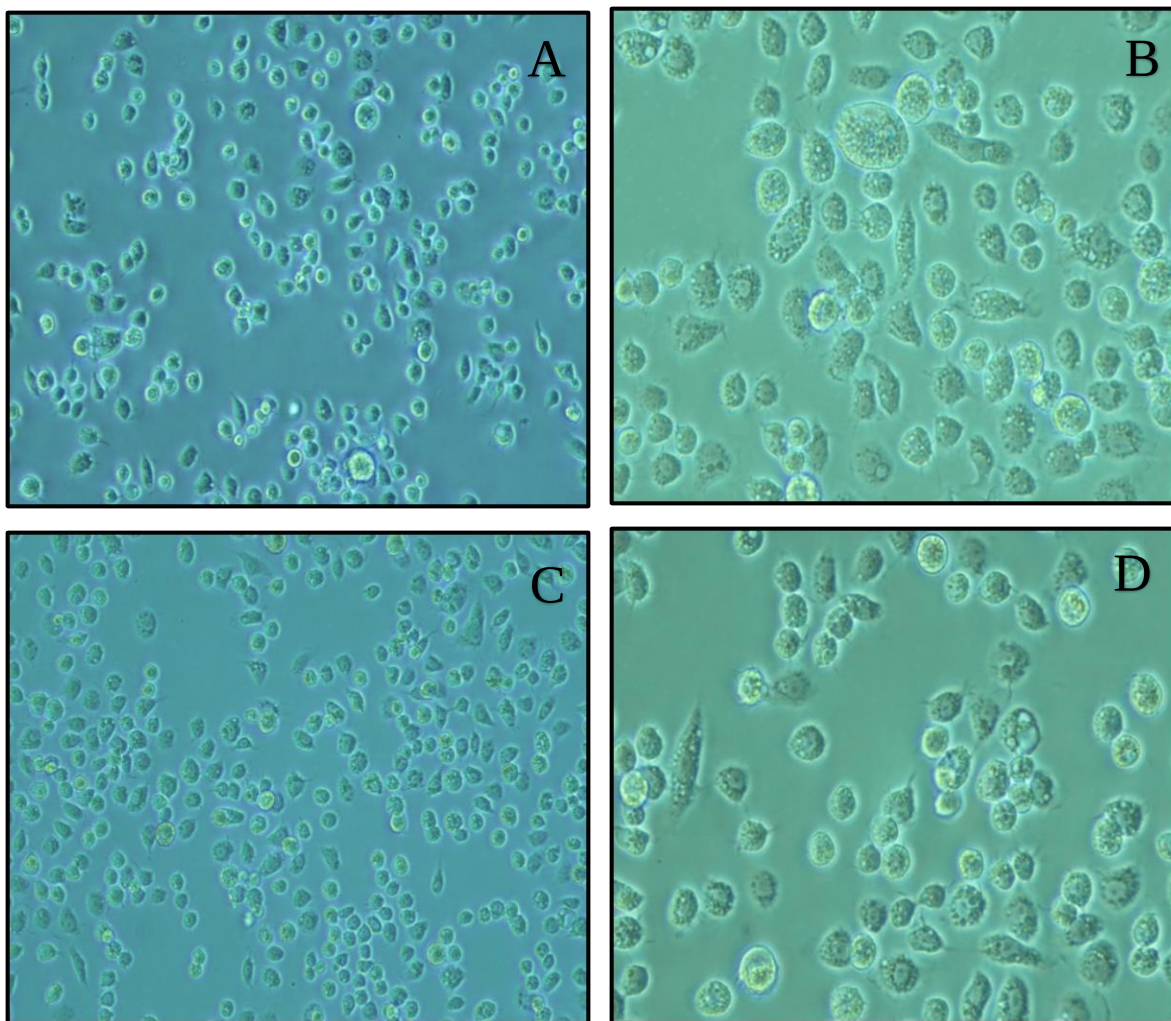


Figura 14. Cultura de células de inseto linhagem C6/36. A) Células C6/36 com gentamicina 0,4% (Aumento de 20x); B) Células com gentamicina 0,4% (Aumento de 40x); C) Células sem gentamicina 0,4% e sem presença de contaminantes aptas para realização de infecção celular (Aumento de 20x); D) Células sem gentamicina 0,4% e sem presença de contaminantes (Aumento de 40x). Fonte: Próprio autor.

4.3. Padronização do isolamento viral e quantificação absoluta de DENV-4 em células C6/36

Antes de iniciar as infecções celulares com DENV-4, o sorotipo DENV-4 foi confirmado por meio de Sequenciamento Sanger. Os fragmentos amplificados com *primer* universal para Flavivírus foram sequenciados e comparados com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as amostras confirmaram ser do sorotipo DENV-4 (Nº de acesso KP188563.1).

Quando as células C6/36 formaram monocamadas com 80% de confluência promoveu-se a infecção celular e no 5º dia após infecção foi possível observar a presença do efeito citopático do vírus DENV-4 para depois proceder ao isolamento viral (Figura 15), conforme padronização realizada

anteriormente em nosso laboratório (Oda, 2018). Calculou-se a quantidade de vírus presente nas amostras pelos valores de Ct (*Cycle threshold*) comparativamente aos valores de Ct da curva padrão, através da conversão dos valores de Ct em concentração viral (PFU/ml), a partir de uma alíquota previamente titulada (5×10^6 PFU/ml). Dessa forma, testaram-se as quantificações de RNA de DENV-4 isoladas e as amostras apresentaram média de Ct 11,7. A Tabela 3 e a Figura 16 representam os valores de Ct utilizados para a confecção de uma curva padrão de acordo com as concentrações em PFU/ml das amostras de DENV-4.

Os mosquitos foram infectados oralmente com o DENV-4 através de uma suspensão contendo sangue e DENV-4 ($4,6 \times 10^6$ PFU/ml). Quando os vírus são inoculados em culturas celulares, multiplicam-se logo após entrar na célula. Esta multiplicação viral provoca uma série de alterações morfológicas e fisiológicas na célula infectada que pode ser visualizada por microscopia óptica. O efeito citopático é o conjunto de alterações morfológicas que ocorrem nas células em cultura quando infectadas por vírus (Knipes, 2001) tais como: desorganização celular, aparecimento de espaços vazios (devido à lise e agregamento das células) e aumento de tamanho por causa da morte celular.

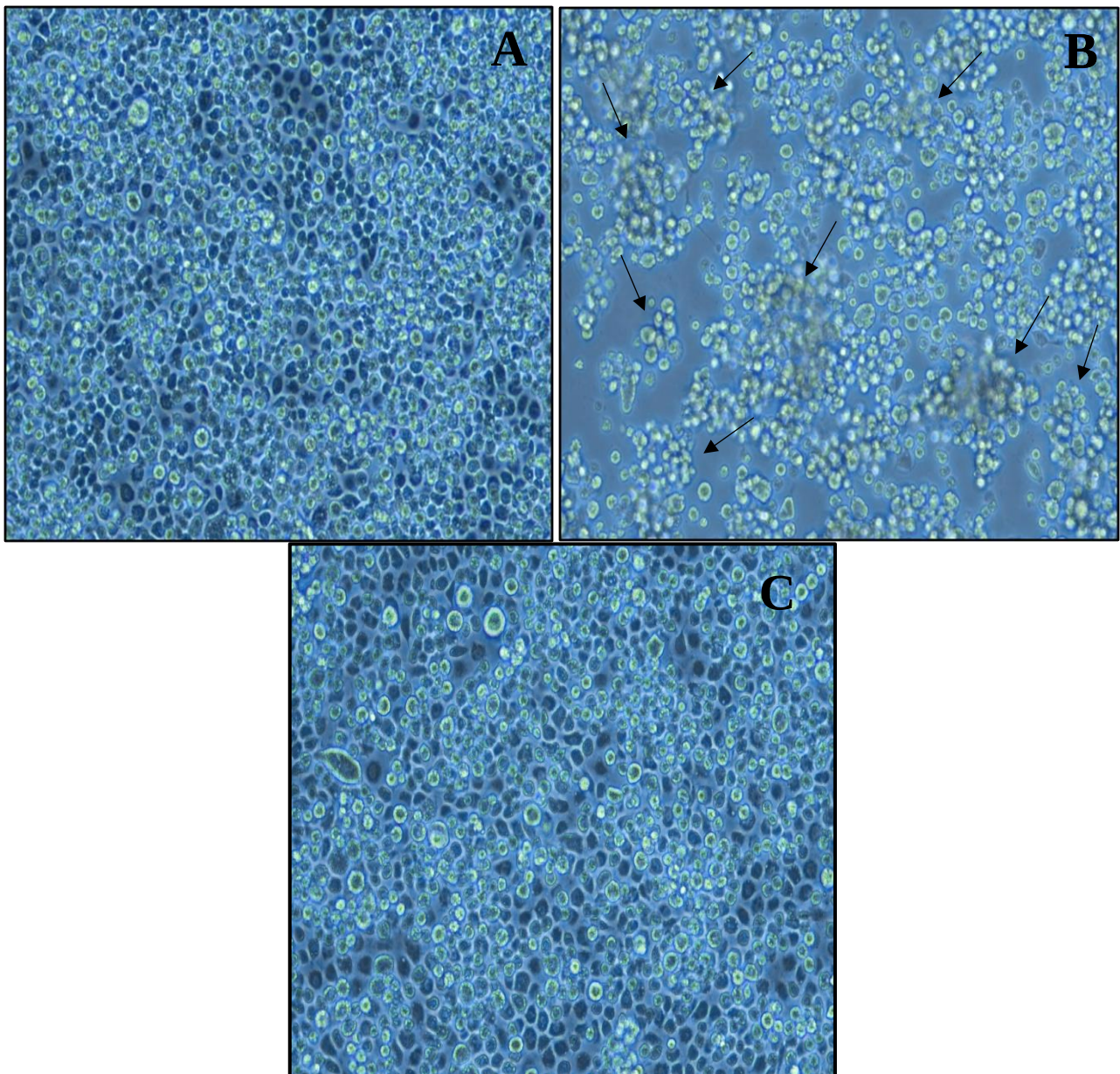


Figura 15. Comparação de células sem infecção e o efeito citopático do vírus da dengue em cultura de células de inseto linhagem C6/36. A) Células saudáveis (não infectadas); B) Células infectadas com DENV-4 que apresentaram efeito citopático. As setas indicam a formação de sincícios. C) Células infectadas com DENV-4 inativado por calor - não ocorreu formação de sincícios. Aumento de 20x em microscópio óptico. Fonte: Próprio autor.

Tabela 3. Tabela com número correspondente aos valores de concentração em PFU/ml e valores de Ct (cycle threshold).

Nº correspondente no gráfico	Concentração em PFU/ml	Valores de Ct
1	5.10^6	12.55
2	5.10^5	24.64
3	5.10^4	29.27
4	5.10^3	33.56
-	5.10^2	Indeterminado

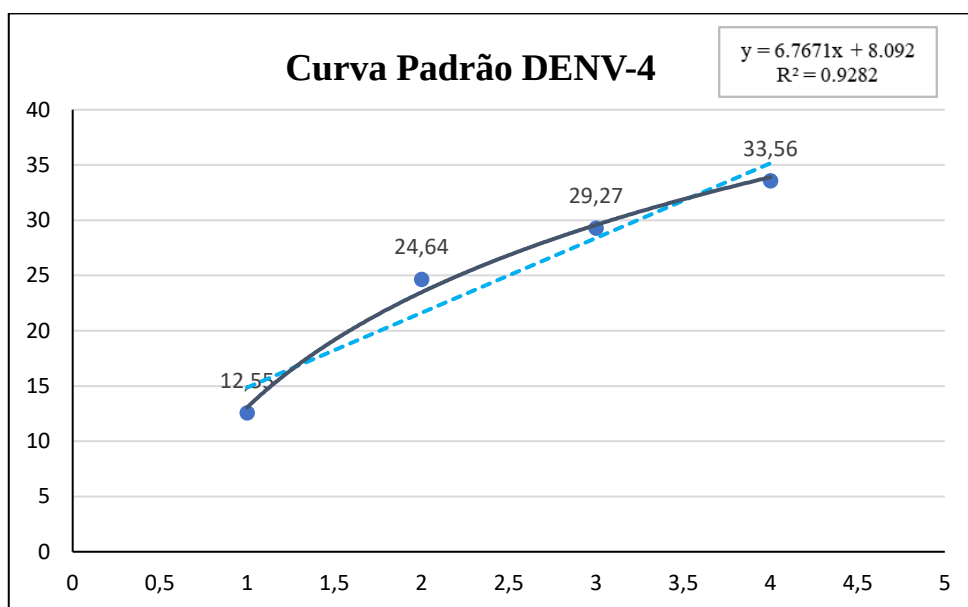


Figura 16. Curva padrão DENV-4 representa os valores de Ct correspondentes às concentrações em PFU/ml das amostras de DENV-4 e mais valores de R2, e a equação da curva padrão (Oda, 2018).

4.4. Quantificação absoluta de DENV-4 em intestinos de *Ae. aegypti*

Obtiveram-se os resultados moleculares da carga viral nos intestinos dos mosquitos através da detecção do RNA viral DENV-4 efetuada por RT-qPCR, observando a amplitude dos ciclos de detecção Ct. Os mosquitos infectados oralmente com a suspensão contendo sangue e DENV-4 (4.6×10^6 PFU/ml) apresentaram média de Ct 12,8. O grupo das amostras de intestinos com DENV-4 inativado por calor tiveram a média de Ct 26,4 e amostras de controles, ou seja, sem infecção por DENV-4 Ct 34,5 (Tabela Suplementar 2).

4.5. Extrações de DNA total para análises de metagenômica

Para estudar a diversidade microbiana intestinal do mosquito *Ae. aegypti* a forma de extração de DNA mais eficiente é aquela na qual se obtém uma maior concentração de DNA bacteriano, fundamental para prosseguir nas etapas posteriores. Foram testadas diferentes formas de

homogeneização e eluição dos intestinos antes da extração de DNA com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen): no primeiro teste (A) os intestinos foram incubados em tampão ATL sem homogeneização (intestinos inteiros) e eluídos com solução AE conforme as instruções do fabricante; no segundo teste (B) os intestinos foram incubados em tampão ATL sem homogeneização (intestinos inteiros) e eluídos com água NF; no terceiro teste (C) os intestinos foram macerados com auxílio de um pistilo em tampão ATL eluídos com solução AE; no quarto teste (D) os intestinos foram macerados com de um pistilo em tampão ATL eluídos com água NF. Cada teste foi realizado com 5 amostras. A quantificação das amostras extraídas demonstra que o teste com intestinos homogeneizados por maceração e eluídos com água NF (D) obteve maior concentração de DNA (Tabela 4).

A razão entre absorbâncias medidas a 260/280 é a forma mais conhecida de controle de qualidade de uma extração de DNA ou RNA. Os valores são resultados da divisão expressa a proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídos. É um bom indicador de contaminação por proteína. Os valores almejados são 1.8 para DNA e 2.0 para RNA. Já razão 260/230 pode indicar contaminação com diversos compostos: fenóis, guanidina, beads magnéticas e proteínas. Os valores almejados estão geralmente entre 1.8 e 2.2 (Pasakinskiene, 1999).

Tabela 4. Quantificação da concentração média da extração de DNA das amostras por grupos em diferentes formas de homogeneização e eluição em Nanodrop. A: intestinos inteiros e eluídos com solução AE, B: intestinos inteiros e eluídos com água NF, C: intestinos macerados eluídos com solução AE, D: intestinos macerados eluídos com água NF.

Grupos de amostras	Concentração média de DNA (ng/μl)	A260/A280	A260/A230
A	2,89	1,69	0,19
B	1,51	1,42	0,83
C	3,21	2,26	0,14
D	4,88	1,70	2,36

4.6. Padronização da reação de PCR de microbioma em triplicata

Para identificar as bactérias presentes no intestino dos mosquitos é habitualmente utilizado 16S rRNA, que possui uma grande diversidade de regiões. Caporaso et al. utiliza *primers* complementares a regiões conservadas, ou seja, capazes de anelar teoricamente em todas as eubactérias que amplificam

entre elas a mesma região hipervariável V4. Dessa forma, é possível comparar o produto amplificado com um banco de dados contendo essas regiões em diferentes táxons (Caporaso et al., 2012).

Os primeiros testes para a amplificação do gene 16S rRNA das amostras não tiveram sucesso pois não foi visualizado o produto de PCR no gel de agarose. Por ser um isolamento de DNA bacteriano de um único intestino, a concentração de DNA é baixa. Após testes com alterações da quantidade dos reagentes e modificações no ciclo de PCR, as amplificações foram padronizadas em desnaturação em 94°C por 3 min, seguidas de 45 ciclos de 94°C por 45 s, anelamento 60°C por 1 min e extensão 72°C por 1 min e extensão final 72°C por 10 min. Processou-se a reação de PCR das amostras em triplicata para o sequenciamento de NGS. Os produtos de PCR em triplicata foram visualizados no gel de agarose com auxílio do transiluminador em torno 400 pares de base (pb) e sem contaminação (Figura 17).

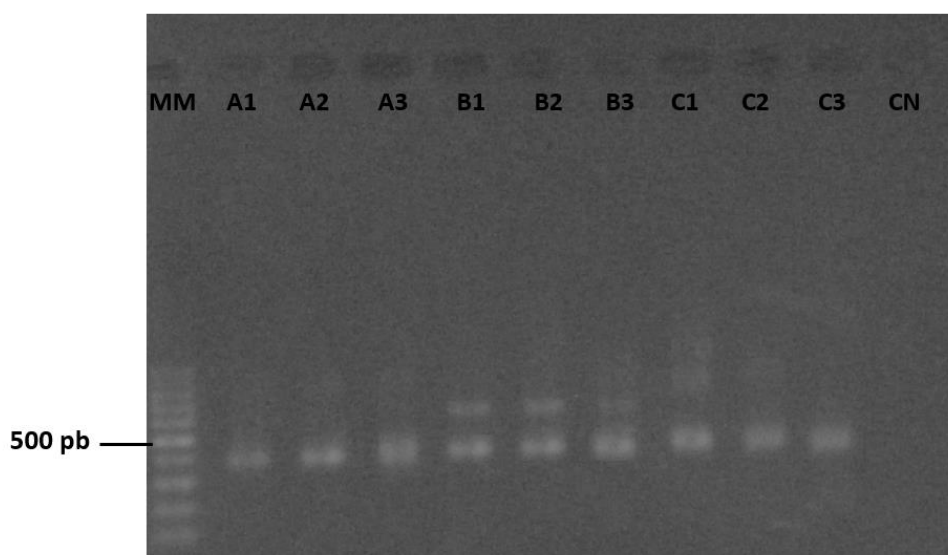


Figura 17. Produtos de PCR em triplicata técnica visualizados em gel de agarose com auxílio do transiluminador. MM: Marcador molecular 1 kb. A1, A2, A3 amostra de intestino dissecado de larvas L4 (Grupo 1); B1, B2, B3 amostra de mosquito macho alimentado com sacarose dissecado com 24h e C1, C2, C3 amostra de mosquito fêmea alimentada com sacarose dissecado com 24h (grupo 2); CN: controle negativo. Todas as amostras foram realizadas PCR em triplicata e um controle negativo por reação.

4.7. Análises da composição taxonômica bacteriana

Após a coleta, a geração de colônias no insetário e o preparo para sequenciamento, obteve-se um total de 240 amostras individuais de intestino de *Ae. aegypti*, que foram sequenciadas em quatro corridas, devido à disponibilidade de *primers* com indexes diferentes do laboratório (máximo de 96 amostras por corrida). É necessário o processamento das sequências, que incluem a triagem de controle do sequenciador (*chastity filter*), remoção de sequências quiméricas e filtragem das *reads* de

baixa qualidade, sendo atribuída a OTU (*operational taxonomic unit*) de acordo com o grau de 97% similaridade das sequências com banco de dados Silva do pacote de software ARB. Silva fornece conjuntos de dados abrangentes, com verificação de qualidade e regularmente atualizados de sequências de RNA ribossômico (rRNA) alinhadas pequenas (16S/18S, SSU) e subunidades (23S/28S, LSU) para todos os três domínios da vida (*bactérias*, *Archaea* e *Eukarya*).

Foi observada uma alta diversidade de bactérias nos intestinos, em todos os níveis de classificação taxonômica (Tabela 5) e identificou-se total de 2736 OTUs. Considerando a abundância combinada (soma de todas as *reads*), o filo mais abundante foi Proteobacteria (82%), seguido de Bacteroidetes (13%), Firmicutes (3%) e Actinobacteria (2%). Também se observou este perfil em outros estudos que caracterizam a microbiota intestinal de *Ae. aegypti* de diferentes locais pelo mundo, como Índia, Tailândia, Estados Unidos e Brasil (Yadav et al., 2015; David et al., 2016; Mancini et al., 2018).

As classes pertencentes a estes filos com maior representatividade são Gamaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Flavobacteria. A nível taxonômico de ordem foram identificadas 71 ordens com predominância de Pseudomonadales, Enterobacteriales, Rhodospirillales e Flavobacteriales, respectivamente. Nestas ordens, as famílias de bactérias mais frequentes e descritas no intestino de *Aedes* spp são Enterobacteriaceae, Acetobacteraceae, Enterococcaceae e Bacillaceae.

As OTUs mais abundantes foram: 14% de *Gluconobacter cerinus* (AB178401.1.1409); 12% de *Acinetobacter soli* (FJ976568.1.1388) e *Elizabethkingia anophelis* (ASYG01000021.3312.4808). Em outras espécies de mosquitos, como *Anopheles* e *Culex*, essas espécies de bactérias estão presentes, o que reforça a idéia de que estas bactérias são essenciais durante o ciclo de vida de mosquitos (Raharimala et al., 2016; Muturi et al., 2018).

Tabela 5. Níveis de classificação taxonômica das amostras das amostras.

Nível Taxonômico	Número de classificações
Reino	1
Filo	4
Classe	13
Ordem	71
Família	142
Gênero	274
Espécie	584

4.8. Diversidades alfa e beta das amostras totais

A cobertura de sequenciamento foi estimada por meio de curvas de rarefação. Todas elas alcançaram um platô, o que indica que se processou o sequenciamento em um nível suficiente para estimar a diversidade microbiana das amostras analisadas (Figura 18).

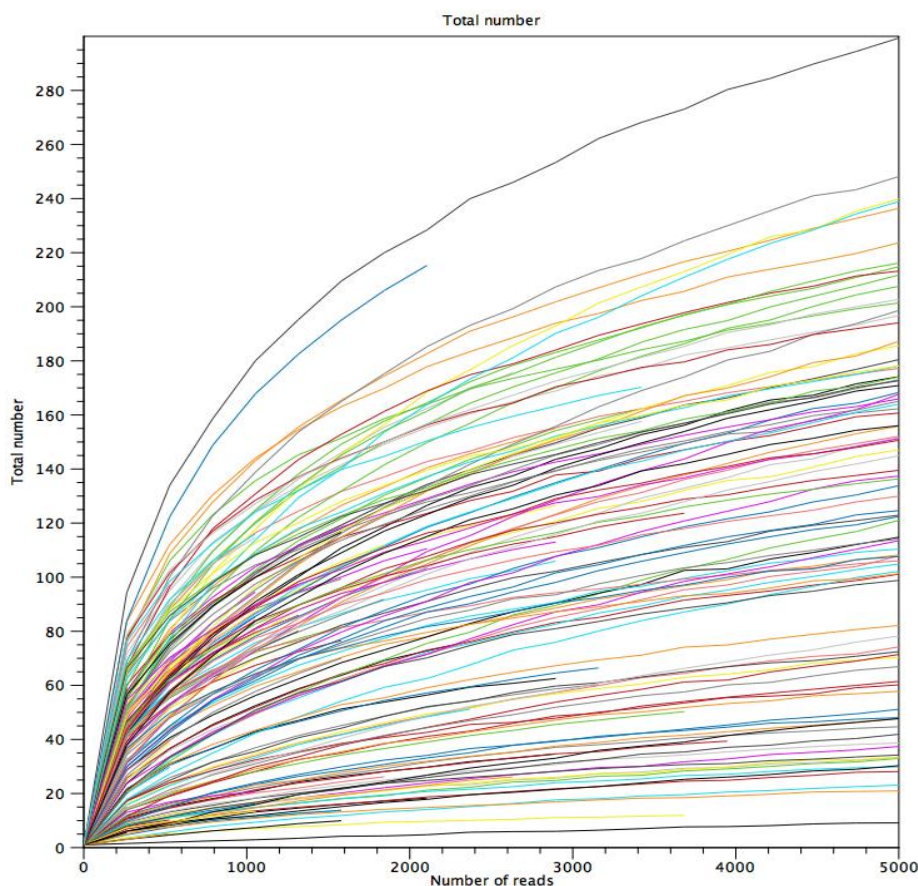


Figura 18. Análise de diversidade alfa. As amostras estão dispostas no gráfico de tal forma que o eixo horizontal representa o número de *reads* sequenciados, enquanto o eixo vertical representa os índices de heterogeneidade.

As análises de diversidade alfa e beta medem a quantidade e a abundância de espécies em habitats homogêneos ou habitats diferentes (Ricklefs, 2010). A análise do tipo *alpha* infere a diversidade taxonômica dentro de uma única amostra, estimando a riqueza (ou número de OTUs) e a distribuição dos táxons. A diversidade beta é a diferença entre as espécies presentes nas diferentes amostras (Morgan e Huttenhower, 2012). Neste estudo, a diversidade *alpha* foi estimada através de: índice de Simpson, que leva em consideração a riqueza, a uniformidade das amostras e a abundância de cada OTU, sendo que as OTUs dominantes têm mais peso do que raras; índice de Shannon, que é mais sensível a alterações na quantidade de OTUs raras (Hill et al., 2003).

Calculou-se a diversidade beta através de uma análise de coordenadas principais (em inglês: *Principal Coordinate Analysis – PCoA*). Cada uma das variáveis é plotada em um espaço cartesiano tridimensional com três eixos, em que cada um dos eixos explica a maior parte da variância em ordem decrescente: o primeiro eixo explica a maior parte da variância e o terceiro eixo explica a menor parte da variância. Os eixos não são correlacionados e são interpretados independentemente (Inacio et al., 2002; Manly, 2016).

Os resultados de beta diversidade entre as amostras foram mostrados conforme cada grupo de comparação nos resultados seguintes.

4.8.1. Efeitos dos estágios de desenvolvimento na microbiota do mosquito *Ae. aegypti*

Para conhecer melhor a dinâmica da microbiota, o presente estudo investigou a diversidade bacteriana intestinal ao longo de diferentes estágios de desenvolvimento do *Ae. aegypti* e da vida adulta de mosquitos fêmeas. Há vários indícios de que o ambiente influencia na diversidade da comunidade intestinal ao longo dos estágios de desenvolvimento.

Os nossos resultados de beta diversidade mostram que houve agrupamento entre as amostras dos estágios larvais - L2 e L3 - que se distanciaram de modo gradativo das amostras L4 (Figura 19-A), que se justifica pela alteração da composição do microbioma com aumento da ordem Rickettsiales de L2 para L3 e diminuição significativa em L4. Além disso, houve aumento da ordem Flavobacteriales em L4 (Figura 20).

Em relação aos diferentes estágios de desenvolvimento de fêmeas adultas do *Ae. aegypti* nos pontos recém emergidos (R.E.), 24h, 48h, 72h e 96h, o resultado mostra menor distância nos agrupamentos das amostras (Figura 19-B). Esta diferença na alteração da composição do microbioma deve-se a oscilações de três ordens principais: Pseudomonadales, Rhodospiralles e Flavobacteriales (Figura 21), o que demonstra que há uma intensa dinâmica entre as bactérias intestinais, mas com uma tendência a manter-se em equilíbrio.

Para complementar os dados de beta diversidade realizou-se a análise estatística de PERMANOVA, que compara dois grupos por vez, e na qual se confirmou a diferença significativa ($p \leq 0,05$) dos indivíduos entre cada estágio de desenvolvimento larval, entre L2-L4 e L3-L4 e em relação diferentes estágios de desenvolvimento de fêmeas adultas (Tabela 6). Os cálculos foram feitos com base na abundância das OTUs com maior quantidade de *reads* de todas as amostras, essa diferença pode ocorrer devido à grande diversidade de bactérias presentes em cada intestino, pois muitas delas são abundantes em poucas amostras, enquanto estão ausentes em outras. A distância de Bray-Curtis se baseia na abundância de espécies, mas outras métricas de beta diversidade como a distância métrica

Weighted UniFrac, consideram a aproximação filogenética entre as amostras, através da análise quantitativa da abundância de bactérias de filogenia próxima.

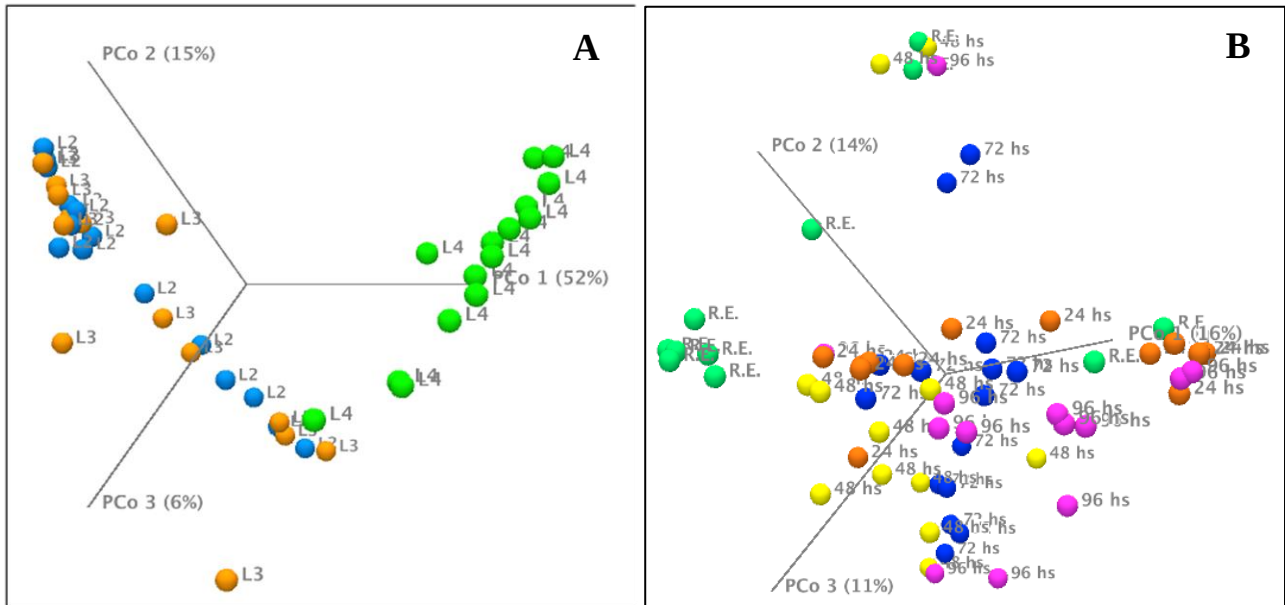


Figura 19. A) Análise de beta diversidade por estágio de desenvolvimento larval. L2: azul, L3: amarelo e L4: verde. B) **A)** Análise de beta diversidade por estágio de desenvolvimento de fêmeas adultas do *Ae. aegypti*. R.E.: verde, 24h: laranja, 48h: amarelo, 72h: azul e 96h: rosa.

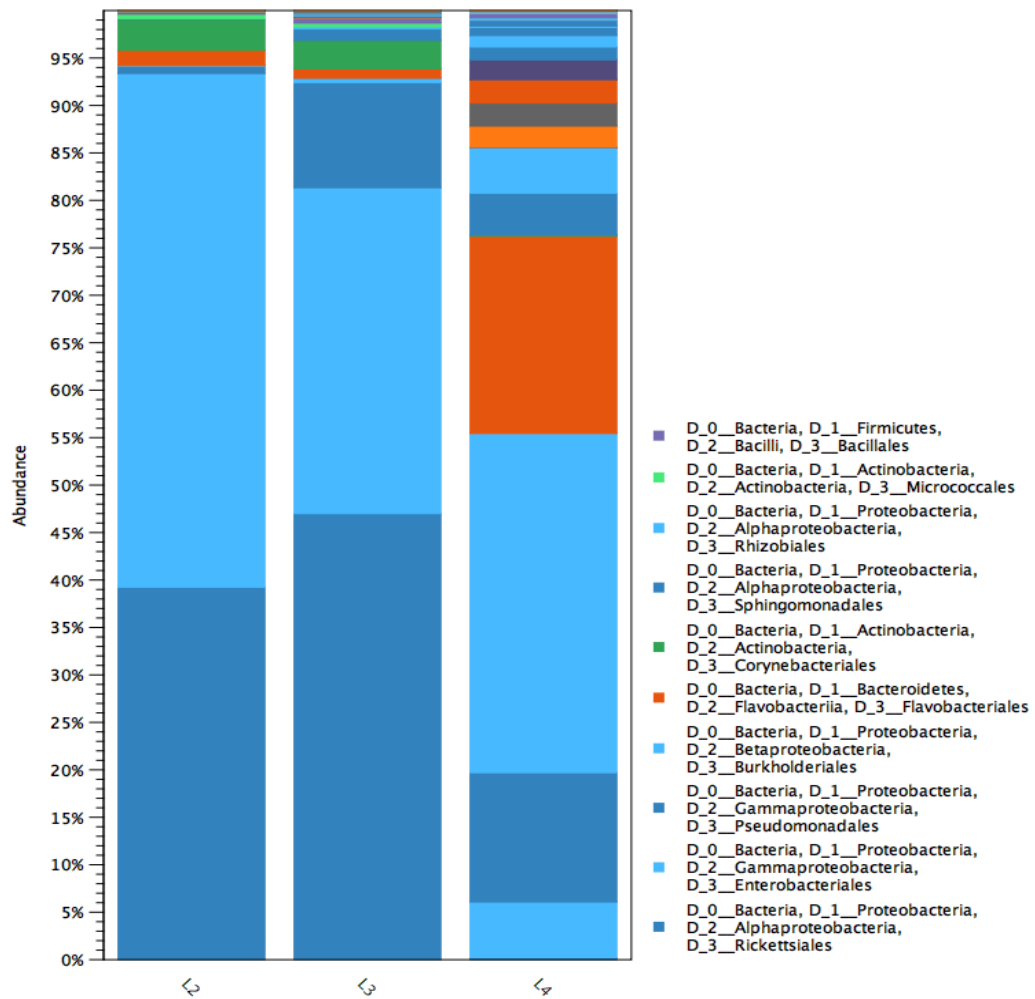


Figura 20. Análise de abundância das ordens bacterianas nos estágios de desenvolvimento larvais, L2, L3 e L4 de *Ae. aegypti* coletados em Botucatu, SP.

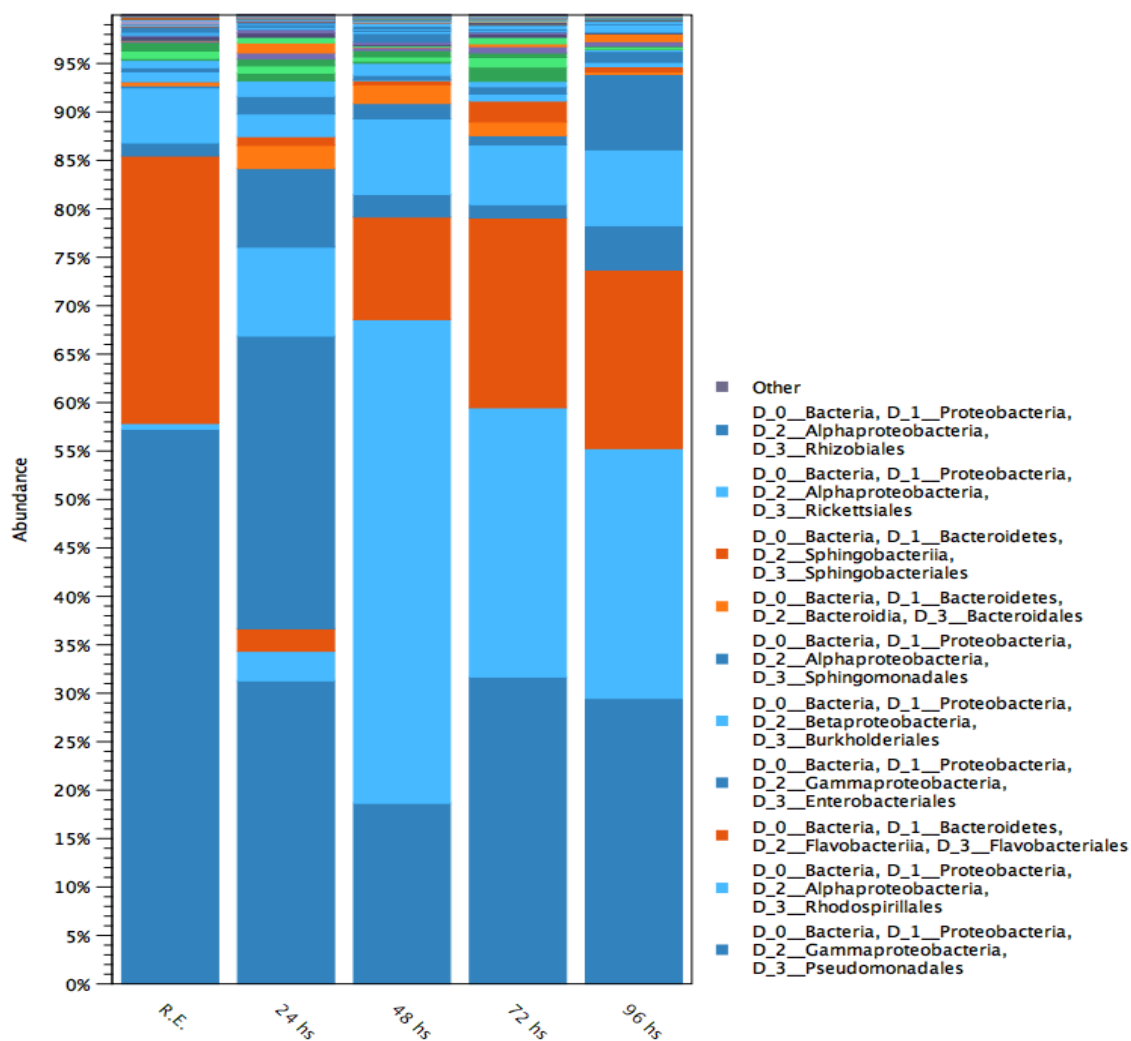


Figura 21. Análise de abundância das ordens bacterianas nos estágios de desenvolvimento de fêmeas adultas do *Ae. aegypti* coletados em Botucatu, SP.

Tabela 6. Resultados da análise estatística PERMANOVA entre os estágios de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*.

Grupo 1	Grupo 2	p-value	Bray- Curtis p-value*
L2	L3	0.18973	0.56919**
L2	L4	0.00001	0.00003
L3	L4	0.00001	0.00003
R.E.	24h	0.00046	0.00460
R.E.	48h	0.00158	0.01580
24h	48h	0.00007	0.00070
R.E.	72h	0.00001	0.00010
24h	72h	0.00001	0.00010
48h	72h	0.00105	0.01050
R.E.	96h	0.00013	0.00130
24h	96h	0.00007	0.00070
48h	96h	0.00029	0.00290
72h	96h	0.00001	0.00010

Os agrupamentos significativos pela PERMANOVA ($p \leq 0,05$).

*Correção de Bonferroni.

** Não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

Os gêneros mais frequentes encontrados no intestino das larvas de acordo com a literatura são: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Elizabethkingia*, *Acinetobacter* e *Ralstonia*. Os filos prevalentes na comunidade de microbiota são: Proteobacteria, Bacteroides, Firmicutes e Actinobacteria; na fase adulta os dez gêneros mais presentes são: *Gluconobacter*, *Acinetobacter*, *Elizabethkingia*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Prevotella* e *Enterobacter* (Osei-Poku et al. 2012; Moro et al., 2013; Kim et al. 2015).

Foi verificado que muitas bactérias têm oscilações ao longo dos estágios de desenvolvimento, com a diminuição de suas frequências em um estágio e aumento no seguinte, e vice-versa (Figura 22). A dinâmica da microbiota intestinal em relação à sua composição e abundância depende das interações com o hospedeiro e das interações que ocorrem entre os micróbios em coabitação (Chatzidaki-Livanis et al., 2017). As flutuações das ordens mais abundantes podem se relacionar com: competição das bactérias intestinais por recursos; regulação de componentes específicos do sistema imunológico do inseto; diferentes estímulos ambientais e fisiológicos do inseto (Chatzidaki-Livanis et al., 2017; Bauer et al., 2018).

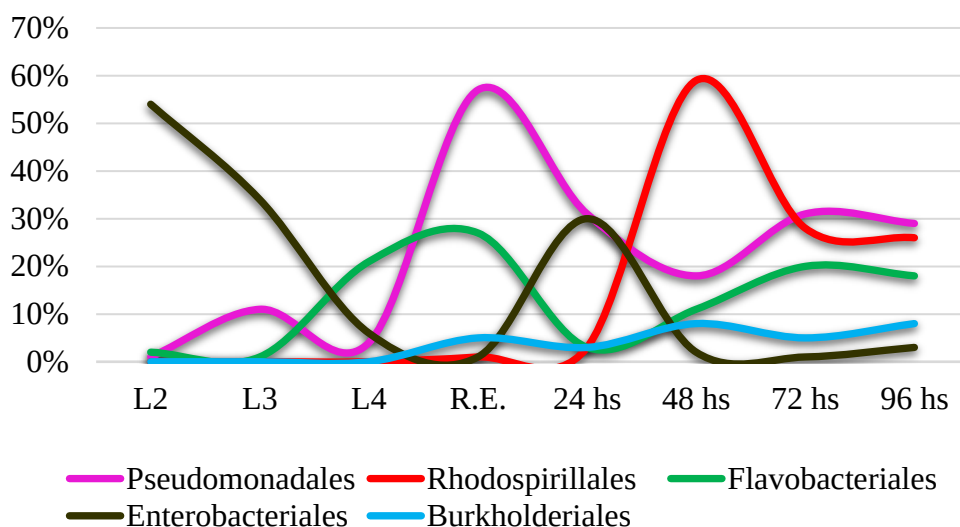


Figura 22. Dinâmica da frequência bacterianas das ordens mais abundantes entre os estágios de desenvolvimento da microbiota intestinal do *Ae. aegypti*.

Utilizou-se o software online Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>) para realização do mesmo, e apesar das oscilações de alguns grupos bacterianos, ao longo dos estágios identificaram-se: 33 das OTUs mais abundantes que são compartilhadas nos três estágios larvais (L2-L3-L4), 89 OTUs compartilhadas entre os estágios de desenvolvimento dos adultos *Ae. aegypti* - microbioma compartilhado. O compartilhamento de OTUs diminuiu de acordo com o desenvolvimento fisiológico larval: 94 entre L2-L3; 51 entre L3-L4 OTUs e apenas 34 entre L2-L4 (Figura 23; Tabela Suplementar 3). Algumas dessas OTUs compartilhadas entre os três estágios larvais são: *Pseudomonas* sp. (GU814629.1.1332), *Elizabethkingia anophelis* (ASYG01000021.3312.4808), *Acinetobacter calcoaceticus* (EU921464.1.1445), *Pectobacterium* sp. (JQ410812.1.1518), *Clostridium intestinale* (APJA01000027.93.), *Bacillus* sp. (HQ433468.1.1469), *Pusillimonas* sp. (KC442337.1.1373), espécies de bactérias compartilhadas entre vários estágios de desenvolvimento podem desempenhar um papel fundamental na manutenção fisiológica do inseto e que fazem parte do core microbiano do inseto.

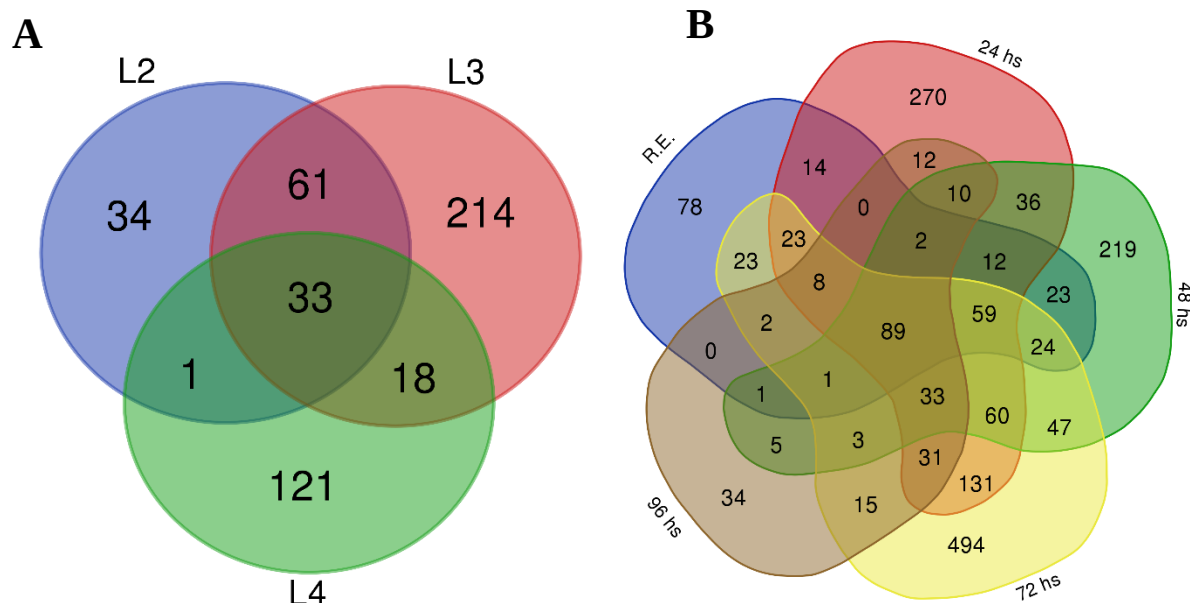


Figura 23. A) Diagrama de Venn das OTUs entre estágios larvais e desenvolvimento. B) Diagrama de Venn das OTUs entre estágios de desenvolvimento dos mosquitos adultos. R.E.: Grupo de amostras de mosquitos dissecados recém emergidos, 24h: Grupo de amostras de mosquitos dissecados com 24 horas, 72h: Grupo de amostras de mosquitos dissecados com 72 horas e 96 horas: Grupo de amostras de mosquitos dissecados com 96 horas.

Os mosquitos são organismos holometabólicos com um ciclo de vida em dois tipos diferentes de habitats: as larvas e pupas em habitats aquáticos e os adultos são terrestres (Clements, 2000). O habitat é um fator determinante da composição da comunidade intestinal, uma vez que aquisição de bactérias do ambiente influencia a variação intraespecífica da microbiota (Zouache et al. 2011; Osei-Poku et al. 2012; Kim et al. 2015). Estudo em *Anopheles* spp. demonstraram que a profundidade do local de reprodução na água pode influenciar a composição das bactérias (Gimonneau et al., 2014), mas em *Aedes* spp. tendem a se reproduzir em criadouros com profundidades rasas (Dickson et al., 2017). Entretanto, os resultados deste estudo mostraram diferença significativa entre os estágios larvais L2 e L3 e o L4. Os mosquitos interagem com a microbiota de maneira diferente, dependendo do seu estágio de vida. No estágio larval a microbiota é adquirida principalmente através da alimentação na água do local de reprodução (Bennett et al., 2019), o que confirma a relevância do habitat da larva na formação da microbiota de *Aedes* spp.

Em relação as diferenças encontradas na diversidade bacteriana da microbiota entre os estágios larvais L2-L3 com L4, tais variações podem estar correlacionadas com as diferenças fisiológicas e hormonais em cada estágio de desenvolvimento do inseto (Calado & Navarro 2002). Durante o último estágio larval, o inseto se alimenta menos e ocorre alterações hormonais em seu corpo devido a transição de larva para pupa (Zhu et al., 2003).

Durante a fase de pupa o tubo digestivo alimentar da larva se degenera e origina o mecônio (Clemens, 1992), que é eliminado 24-48h após a emergência do adulto (Romoser et al., 2000). Alguns estudos mostram que após emergência, o adulto alado contém uma quantidade muito reduzida de bactérias (Lindh et al., 2008). A composição da comunidade microbiana intestinal é alterada durante o desenvolvimento de larvas para adultos (Wang et al., 2011; Rosso et al., 2018) e essas alterações podem estar relacionadas com a: capacidade dos mosquitos em controlar a proliferação de bactérias (Hillyer et al. 2005); disponibilidade de nutrientes no tubo digestivo (Montagna et al. 2015); interação direta (ex. competição) entre as bactérias que colonizam este ambiente. O aumento significativo de *Elizabethkingia* em mosquitos pós emergência pode ser devido a essa competição entre bactérias no ambiente intestinal, que se traduz por exemplo, através da secreção de fatores antimicrobianos (Dong et al. 2009).

4.8.2. Influência do sexo na microbiota do mosquito

Nas análises beta diversidade houve um evidente agrupamento de acordo com o gênero do mosquito. Ambos os mosquitos fêmeas e machos tiveram o mesmo tempo de desenvolvimento (72h) e foram alimentados apenas com solução açucarada (Figura 24). A diferença significativa dos agrupamentos foi confirmada por PERMANOVA (valor de p igual à 0,00001 com correção de Bonferroni), e foi verificada diferença na composição taxonômica bacteriana, cerca de 21% da ordem Flavobacteriales e 33% Pseudomonadales em mosquitos fêmeas e cerca de 1% Flavobacteriales e 6% Pseudomonadales em mosquitos machos (Figura 25).

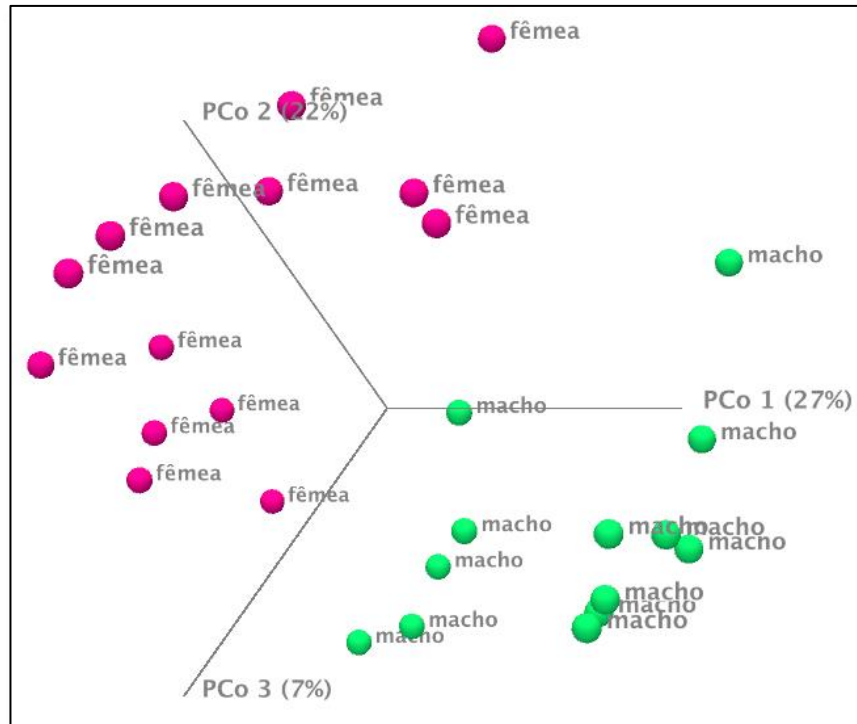


Figura 24. Análise de beta diversidade da microbiota de mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas e machos. Fêmeas: rosa e Machos: verde.

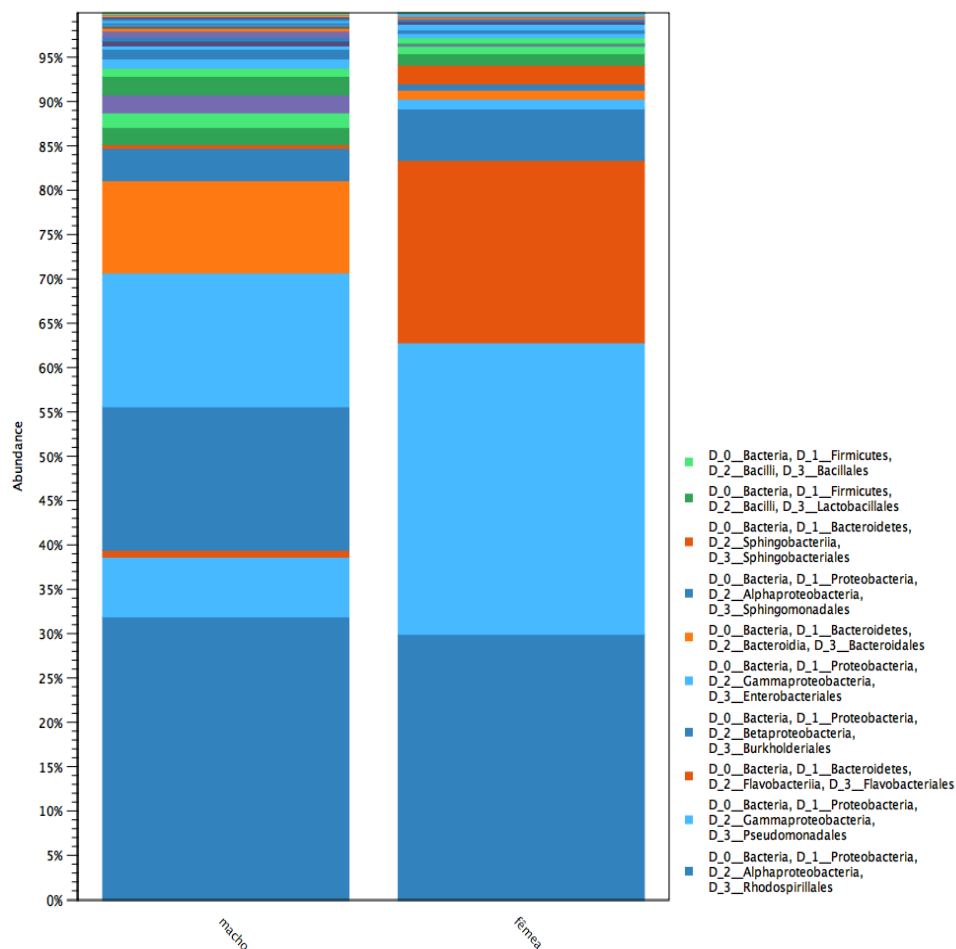


Figura 25. Abundância relativa de ordens bacterianas em machos e fêmeas de *Ae. aegypti* coletados Botucatu, Sp.

Na literatura, há diversos relatos que a diversidade da microbiota varia de acordo com o sexo dos mosquitos devido a hábitos alimentares distintos (Moro et al, 2013; Minard et al. 2012). Os mosquitos machos adquirem Actinobactérias associadas ao solo e à água através de alimentação de néctar, enquanto as fêmeas, as principais componentes do microbioma do intestino médio são as bactérias do filo Proteobacteria, especialmente Enterobacteriaceae (Moro et al, 2013). No entanto, há poucos estudos sobre a diversidade da microbiota em função do sexo dos mosquitos com os mesmos hábitos alimentares e tempo de vida.

Além disso, neste experimento houve diferença expressiva da composição bacteriana nas ordens Flavobacteriales e Pseudomonadales em mosquitos fêmeas e machos. A espécie bacteriana *Elizabethkingia anophelis* teve 16% da frequência total da microbiota das fêmeas, enquanto nos machos teve uma frequência menor que 0,05%, dados que corroboram um estudo em que *Elizabethkingia* spp. (Flavobacteriaceae) surgiu apenas em fêmeas alimentadas com açúcar (David et al., 2016). A literatura relata que em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, o filo Proteobacteria é dominante

em intestino, ovários, glândulas salivares, testículos e glândulas acessórias masculinas (Mancini et al., 2018; Scolari et al., 2019), que os gêneros *Acinetobacter* e *Enterobacter* são mais frequentes em machos de *Ae. albopictus* (Zouache et al. 2011). Estas diferenças podem estar relacionadas com o diferente tropismo de endossimbiontes para órgãos reprodutores masculinos e femininos como observado em *Anopheles* spp. (Segata et al., 2016).

4.8.3. Efeitos da dieta na microbiota do *Ae. aegypti*

Neste experimento foi analisado a beta diversidade da microbiota de adultos fêmeas de *Ae. aegypti* provenientes da população de campo em Botucatu, SP, estabeleceu-se em laboratório de acordo com a dieta (um grupo alimentado apenas sacarose e outro acrescido de ingestão de sangue), intestinos foram dissecados após 24 horas após ingestão dos alimentos e 96 horas. Observou-se menor distância nos agrupamentos das amostras dos intestinos dissecados com 24 horas após ingestão dos alimentos (Figura 26-A), tal como a análise estatística PERMANOVA confirmou diferença significativa ($p = 0,01788$) (Tabela 7).

Também se observou nítida distância o agrupamento desses grupos de amostras dos intestinos dissecados com 96 horas após ingestão dos alimentos (Figura 26-B), a análise estatística PERMANOVA confirmou diferença significativa ($p = 0.00024$) (Tabela 7).

Foi observado em ambos os grupos de mosquitos que tiveram os intestinos dissecados com 96 horas após ingestão dos alimentos (sacarose e sangue) que houve aumento expressivo da ordem Flavobacteriales, representada pela espécie *Elizabethkingia anophelis* (Figura 27). Além disso, foi constatado uma redução na diversidade da microbiota das OTUs dos mosquitos dissecados após 96 horas, diminuição na diversidade de 85% quando comparado aos grupos dissecados após 24 horas. Estes dados confirmam que a alimentação é um fator que tem forte influência na dinâmica da microbiota dos mosquitos.

Tabela 7. Análise estatística pareada PERMANOVA entre dietas com sacarose ou ingestão de sangue de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti* com os intestinos dissecados 24 e 96 horas após ingestão dos alimentos.

Grupo 1	Grupo 2	p-value	Bray- Curtis p-value*
Sacarose 24h	Sangue 24h	0.00298	0.01788
Sacarose 24h	Sacarose 96h	0.00002	0.00012
Sangue 24h	Sacarose 96h	0.00001	0.00006
Sacarose 24h	Sangue 96h	0.00001	0.00006
Sangue 24h	Sangue 96h	0.00001	0.00006
Sacarose 96h	Sangue 96h	0.00004	0.00024

Os agrupamentos significativos pela PERMANOVA ($p \leq 0,05$).
 *Correção de Bonferroni

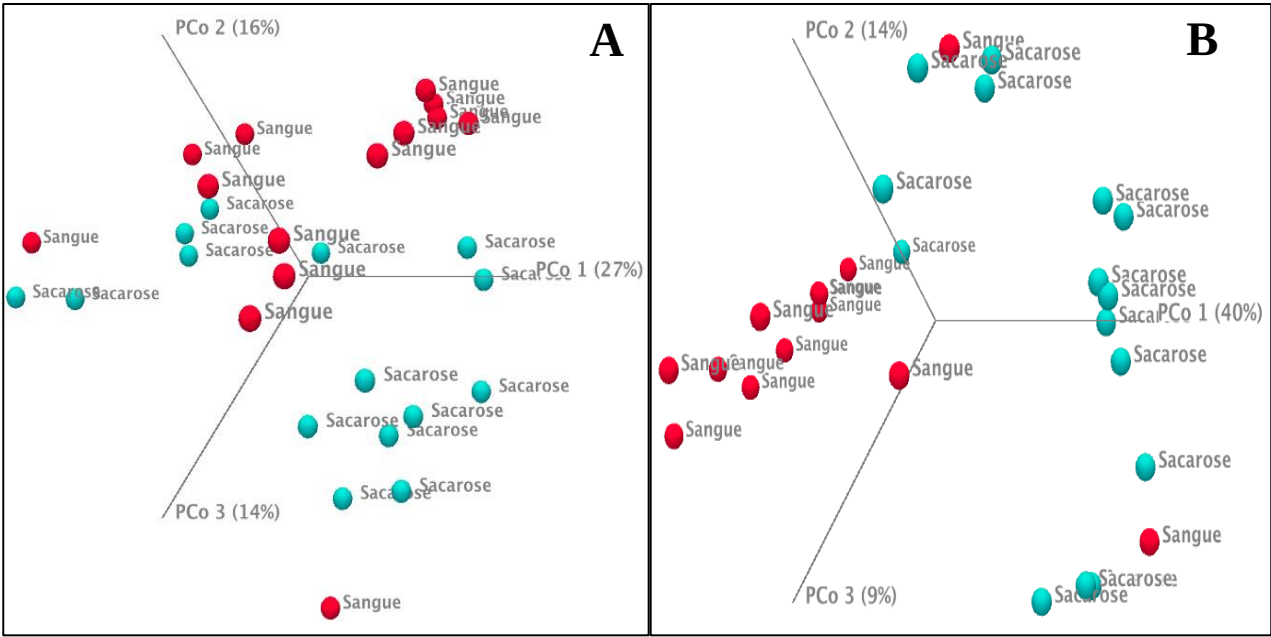


Figura 26. A) Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* de acordo com a dieta - sacarose ou ingestão de sangue de carneiro - após o intestino ter sido dissecado com 24 horas. Sacarose: azul e Ingestão de sangue: vermelho. **B)** Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* de acordo com a dieta - sacarose ou ingestão de sangue de carneiro - após o intestino ter sido dissecado com 96 horas. Sacarose: azul e Ingestão de sangue: vermelho.

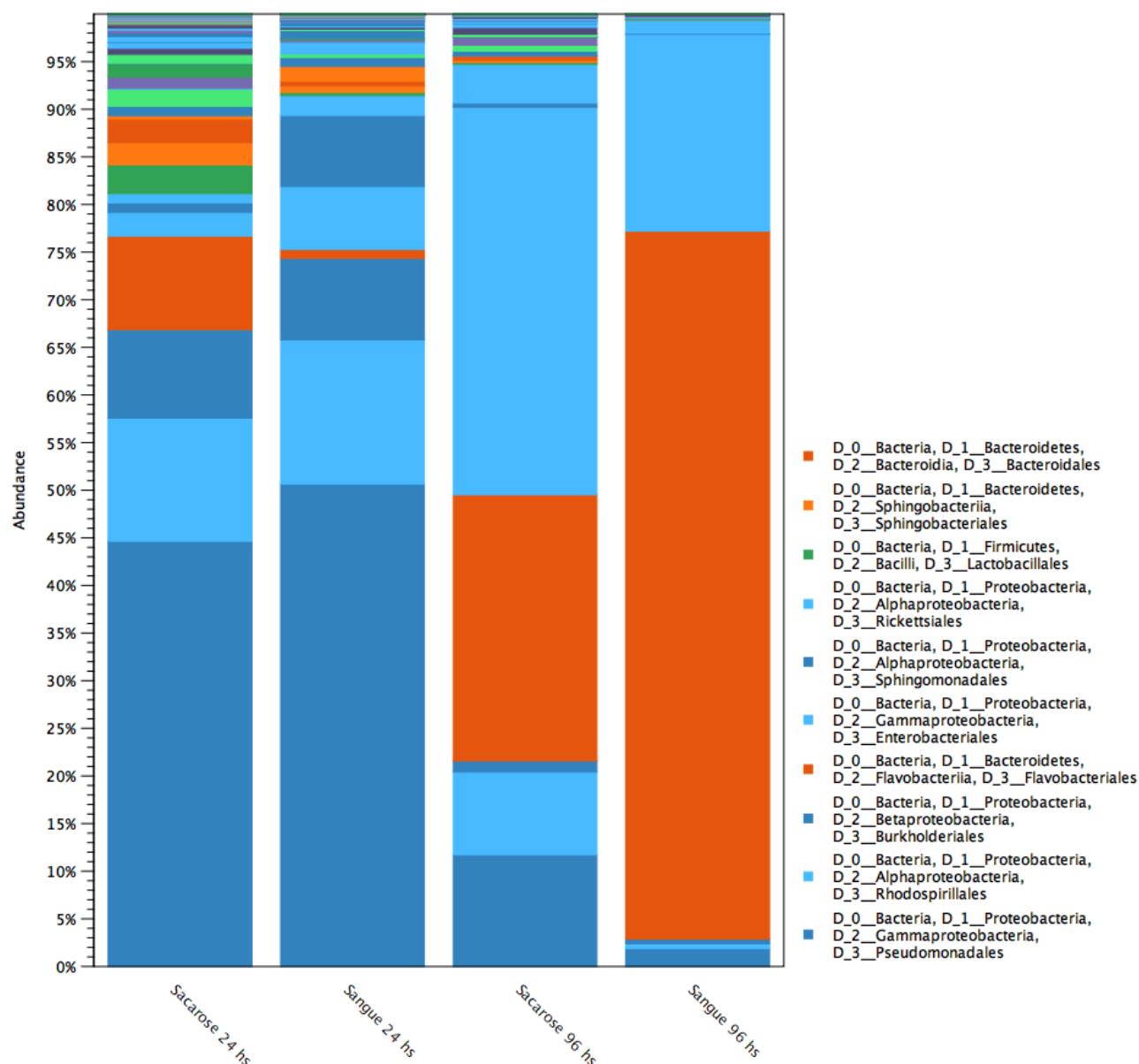


Figura 27. Análise de abundância de ordens bacterianas da microbiota intestinal de fêmeas de mosquitos de *Ae. aegypti* alimentadas com solução sacarose ou sangue com intestino dissecado após 24 ou 96 horas após ingestão dos alimentos.

Os diferentes comportamentos alimentares dos mosquitos podem contribuir nas diferenças relacionadas ao sexo observadas na composição da microbiota (Zouache et al., 2011; Minard et al., 2018). Ao contrário de alimentos açucaradas, a alimentação sanguínea vai direto para o intestino médio (Clemens, 1992). Como a alimentação sanguínea fornece um perfil nutricional diferente, mais rico, as comunidades bacterianas do intestino médio após a alimentação sanguínea são muito diferentes da alimentação açucarada (Coatsworth et al., 2018).

As fêmeas alimentadas com sangue tiveram diminuição significativa do gênero *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae), em relação às fêmeas alimentadas apenas com açúcar. Redução similar desse gênero ocorreu em *An. gambiae* após a ingestão de sangue (Wang et al. 2011). Os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* foram mais frequentes em fêmeas alimentadas com açúcar, enquanto *Serratia* e *Pantoea* também foram recuperados ao longo da digestão do sangue. As bactérias *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Serratia* são candidatos potenciais para modificações paratransgênicas para estratégias de controle de vetores (Mancini et al., 2018).

Outra informação relevante é que a microbiota é capaz de ativar o sistema imune dos insetos via IMD e Toll, por meio de bactérias Gram-negativas pela via IMD e por Gram-positivas e fungos pela via Toll. Essas vias de sinalização intracelular controlam a expressão de genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos. As famílias bacterianas Enterobacteriaceae e Acetobacteraceae são as que vivem mais próximas do epitélio do intestino desses insetos e, como tal as mais importantes na ativação das vias (Dong, 2009). A dieta é um dos fatores que modulam diretamente a diversidade da microbiota intestinal (Jupatanakul et al. 2014; Coon et al. 2016).

4.8.4. Influência na microbiota de mosquitos alimentados com sangue e sangue infectado DENV-4

Realizou-se a análise beta da diversidade da microbiota dos mosquitos quando eles foram alimentados com sangue de carneiro sadio ou esse sangue infectado com DENV-4 com intestinos dissecados com 24 e 96 horas após ingestão dos alimentos. Observou-se os agrupamentos entre os dois grupos de amostras (Figura 28), tal como a análise estatística PERMANOVA confirmou diferença significativa ($p = 0.00001$) com correção de Bonferroni. A alimentação sanguínea infectada com partículas virais DENV-4 causou alterações na microbiota. Em comparação com os mosquitos fêmeas alimentados apenas com sangue, os que foram infectados com DENV-4 apresentaram uma microbiota com aumento expressivo da ordem Flavobacteriales e Pseudomonadales e uma diminuição da ordem Rhodospirillales (Figura 29). Os mosquitos infectados com sorotipo DENV-4 tiveram alta frequência (42%) da OTU (DQ525591.1.1423) representada pelo gênero *Pseudomonas* sp..

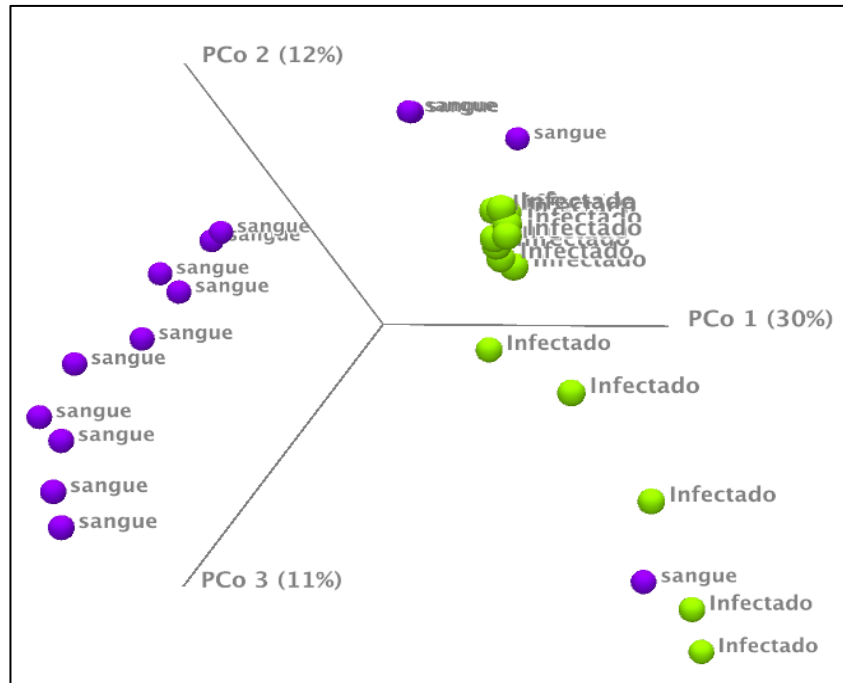


Figura 28. Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue de carneiro ou sangue de carneiro infectado com DENV-4. Sangue sadio: roxo e Sangue infectado: verde. Foram comparados grupos de mosquitos com intestinos dissecados com 24 e 96 horas após ingestão dos alimentos.

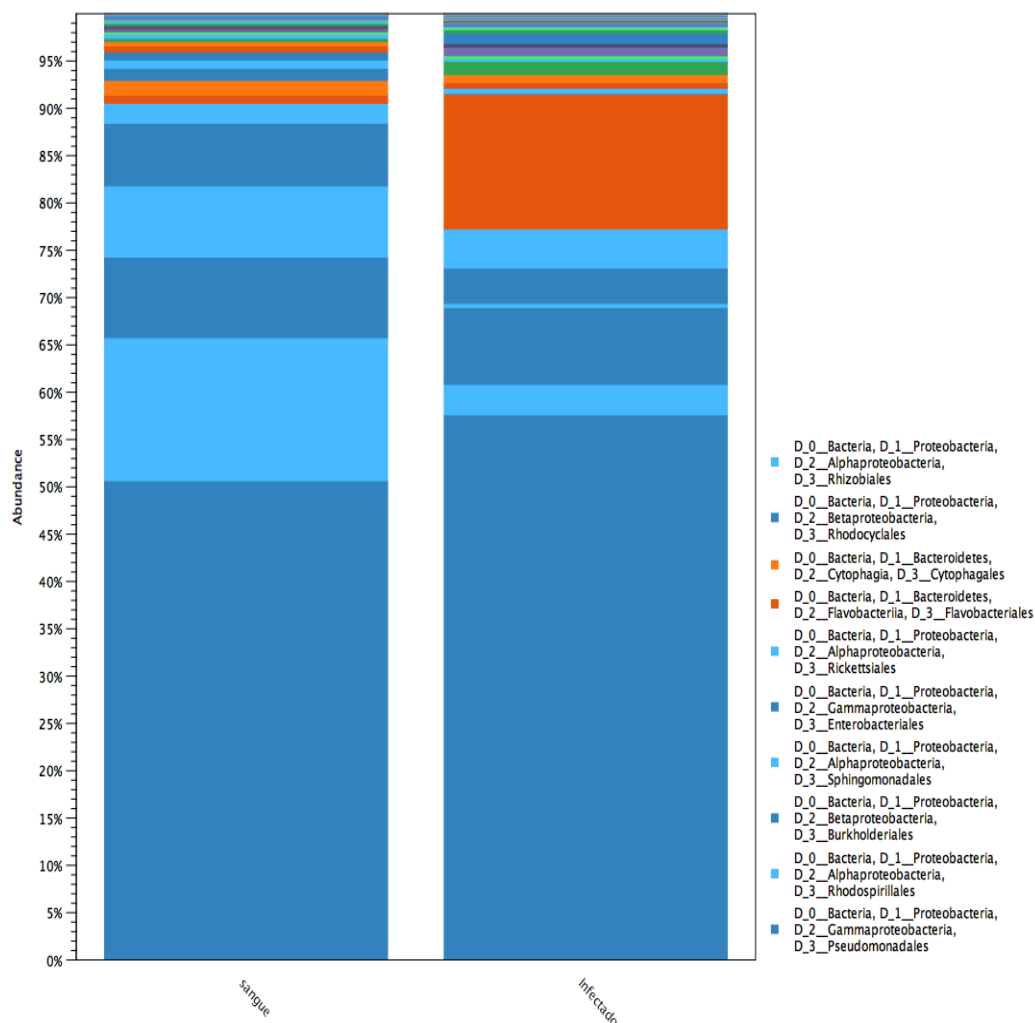


Figura 29. Análise de abundância relativa de ordens bacterianas da microbiota intestinal das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas apenas com sangue de carneiro e sangue de carneiro infectado DENV-4.

Estudos demonstraram que as bactérias associadas a insetos são capazes de modular a competência do vetor para arbovírus e outros patógenos por meio de mecanismos como a ativação da resposta imune, a competição de recursos ou a produção de moléculas antivirais (Jupatanaku et al., 2014). A presença de alguns vírus de bactérias (bacteriófagos) pode modular as bactérias hospedeiras e também regular o conteúdo bacteriano (Floch et al., 2016). As interações vírus-bactérias podem aumentar por serem suplemento nutricional ou diminuir devido à suscetibilidade a patógeno (Dennison et al., 2014).

Apesar de espécies bacterianas como *Proteus* sp., *Chromobacterium* sp., *Pseudomonas rhodesiae*, *Enterobacter ludwigii* e *Vagococcus salmoninarium* serem associadas a alterações na competência vetorial do vírus (Dong et al., 2011, Apte-eshpande et al., 2012, Boissière et al. 2012, Ramirez et al. 2012, Jupatanakul et al. 2014), elas não foram detectadas em nenhuma das amostras do

intestino médio deste experimento, tal como no estudo com infecção com DENV-2 (Coatsworth et al., 2018). Entretanto, no nosso trabalho encontramos algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* como *P.aeruginosa*, *P. putida*, *P. plecoglossicida*, *P. fluorescens*, *P. palleroniana*, *P. pseudoalcaligenes* e do mesmo gênero *Enterobacter*, como *E. aerogenes*, *E. bacterium* e *E. cloacae*.

O gênero *Pseudomonas* predominou na microbiota das amostras infectadas com sorotipo DENV-4, tal como relatado em mosquitos fêmeas selvagens na Itália (Rosso et al., 2018), em *Culex pipiens* na Bélgica (Raharimalala et al., 2016) e em *Anopheles stephensi* e *An. culicifacies* no sul do Irã (Chavshin et al., 2014). Esta bactéria - *Pseudomonas putida* - interagiu com patógenos transmitidos por mosquitos de *Anopheles* e *Plasmodium*, com efeitos positivos e negativos (Tchioffo et al., 2013; Bahia et al., 2014). A presença de *Pseudomonas* foi recentemente indicada como um bom candidato à paratransgênese, uma vez que cresce em meios de cultura comuns e é adequada para transformação genética (Raharimalala, et al., 2016).

4.8.5. Efeitos de infecção pelo DENV-4 e inativado em laboratório

A utilização de mosquitos fêmeas alimentados com sangue infectado com vírus inativado por calor (56°C), baseou-se em estudos que indicaram que todos os sorotipos podem ser inativados pelo tratamento de temperatura a 56°C por 30 minutos (Idris et al., 2018). Outros vírus da família Flaviviridae também perdem a infectividade quando tratados termicamente (Song et al., 2010; Madani et al., 2014). Essa perda de infectividade do vírus deve-se a alterações estruturais nas proteínas induzidas pelo calor e à degradação do RNA viral (Baert et al., 2008; Wigginton et al., 2012).

A análise de beta da diversidade mostra que houve nítido agrupamento das amostras entre os grupos de fêmeas infectadas com DENV-4 em relação aos de fêmeas com DENV-4 inativado por calor (Figura 30-a) após dissecação do intestino com 24 horas. Isso remete de novo à alteração da composição da microbiota, com aumento expressivo da ordem Flavobacteriales e diminuição da ordem Pseudomonadales em mosquitos fêmeas infectados com DENV-4 inativado por calor após terem intestino dissecados com 24 e 96 horas (Figura 31). Observou-se grande redução (84%) da diversidade das OTUs identificadas nesse grupo do vírus inativado. Houve diferença significativa ($p = 0,00016$) nos grupos cujo intestino foi dissecado com 24 horas, mas não houve diferença ($p = 0.40549$) nos grupos que tiveram dissecação do intestino com 96 horas, ou seja, após esse período de tempo, o microbioma se restabeleceu de forma similar, isso se deve por conta da sinalização imune no trato gastrointestinal nos primeiros dias de infecção, pois o houve replicação do vírus presente na hemolinfa. Na análise beta observa-se que não houve clusterizações desses grupos (Figura 30-B) e no gráfico de barras observa-se que ambos os grupos de mosquitos restabeleceram a quantidade das

OTUs identificadas após dissecação de 96 horas do que reflete a intensidade do mecanismo para manter a composição da microbiota (Figura 31).

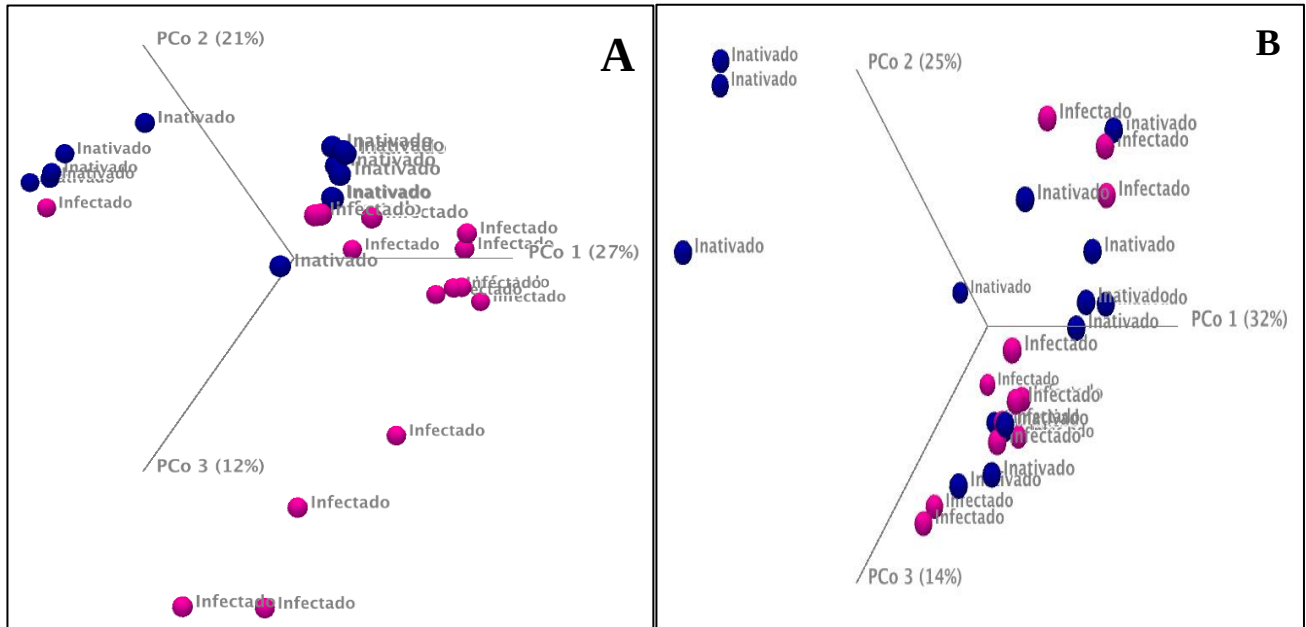


Figura 30. A) Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor, após intestino ter sido dissecado com 24 horas. DENV-4: rosa e DENV-4 inativado: azul. **B)** Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor, após intestino ter sido dissecado com 96 horas. DENV-4: rosa e DENV-4 inativado: azul.

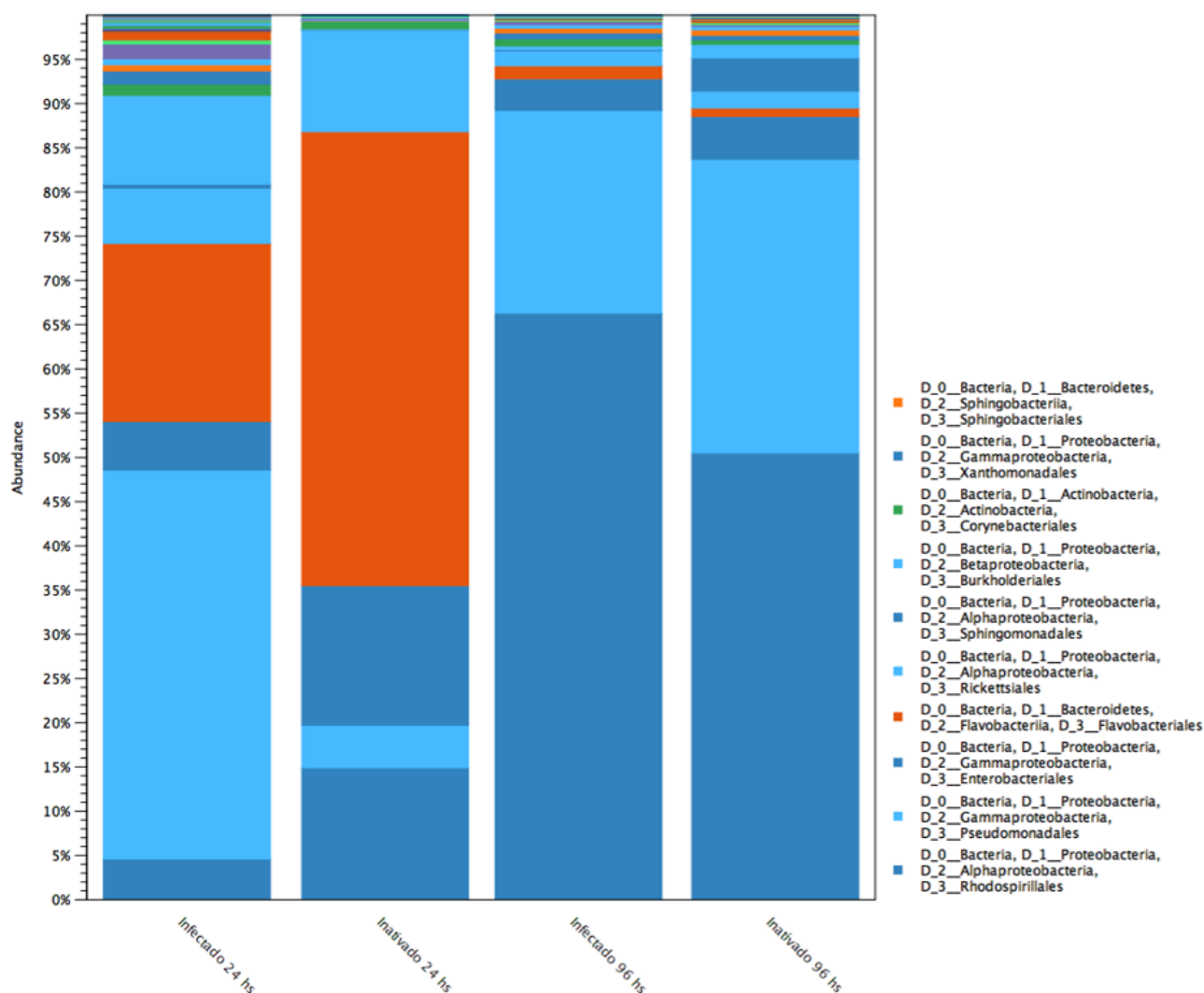


Figura 31. Análise de abundância relativa de ordens bacterianas da microbiota intestinal de mosquitos fêmeas do *Ae. aegypti* infectadas com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor após terem intestino dissecados com 24 e 96 horas após ingestão dos alimentos.

Estudos mostram que a infecção por arbovírus influencia a composição da comunidade microbiana do intestino. *Ae. albopictus* infectados por vírus Chikungunya (CHIKV) tiveram maior abundância relativa das classes bacterianas Beta e Gammaproteobacteria e menor de Alphaproteobacteria (Zouache et al., 2012). Associou-se à infecção em *Culex pipiens* pelo vírus do Oeste do Nilo (WNV) ao aumento da diversidade da microbiota, sobretudo de *Serratia* nas fêmeas infectadas (Zink et al. 2015). Em um estudo recente foi sugerido que o nível de infecção com o parasita *Ascogregarina taiwanensis*, está significativamente associado ao microbioma de *Ae. albopictus* (Seabourn et al., 2020). A diversidade genética de populações de *Ae. albopictus* foi também correlacionada positivamente com a abundância do microbioma deste mosquito, sugerindo a

influência de fatores genéticos do hospedeiro na modulação da comunidade intestinal (Minard et al. 2015).

Após dissecação do intestino das fêmeas alimentadas com sangue infectado com DENV-4 e vírus inativado com 24 horas, observou-se que a composição da microbiota se alterou, com aumento expressivo da ordem Flavobacteriales em mosquitos fêmeas infectadas com DENV-4, representado sobretudo pela espécie *Elizabethkingia anophelis* e *Pseudomonas* sp.. Os principais genes da resposta imune em *An. gambiae* são induzidos por diversas bactérias anti-Plasmodium isoladas da microbiota intestinal de anofelinos (*Comamonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas rhodesiae*, *Serratia marcescens*, *Elizabethkingia anopheles*), o que pode justificar o aumento dessas bactérias (Bahia et al., 2014). Destacou-se o aparecimento da ordem Rickettsiales representado pelo gênero *Wolbachia*, que tem a capacidade de bloquear a transmissão de dengue (Ormaetxe et al., 2011).

4.8.6. Comparação das microbiotas de mosquitos alimentados com sangue, sangue infectado DENV-4 e inativado

Quando se comparou em simultâneo a diversidade beta das microbiotas dos três grupos de mosquitos - alimentados com sangue, sangue infectado DENV-4 e inativado - com intestino dissecados com 24 e 96 horas, observou-se a clusterizações entre os grupos de amostras (Figura 32). A análise estatística PERMANOVA confirmou a diferença significativa entre a maioria dos grupos, com exceção do grupo com DENV-4 inativado 24 horas com o grupo de mosquitos alimentados com sangue 96 horas e o grupo infectado com o inativado 96 horas (Tabela 8). A semelhança da diversidade da microbiota entre o grupo infectado com o inativado 96 horas deve-se à um restabelecimento da microbiota ao longo do tempo.

A composição da microbiota se altera com a alimentação de sangue, pois há um aumento na abundância bacteriana, devido às competições entre as respectivas espécies (Jupatanakul et al., 2014 Coon et al., 2016).

A alimentação sanguínea misturada com DENV-4 se move para entrar nas células epiteliais do intestino médio 8 horas após a ingestão, portanto, analisamos a microbiota 24 e 96 horas após a ingestão, é um período suficiente para verificar se a proliferação significativa de bactérias afeta diretamente a infecção com DENV-4 (Junjhon et al., 2014). Houve diferença significativa entre a microbiota infectada com DENV-4 e alimentada com sangue, corroborando com a literatura que afirma que alguns patógenos exercem efeitos indiretos nas comunidades bacterianas presente na microbiota intestinal (Dheilly, 2014).

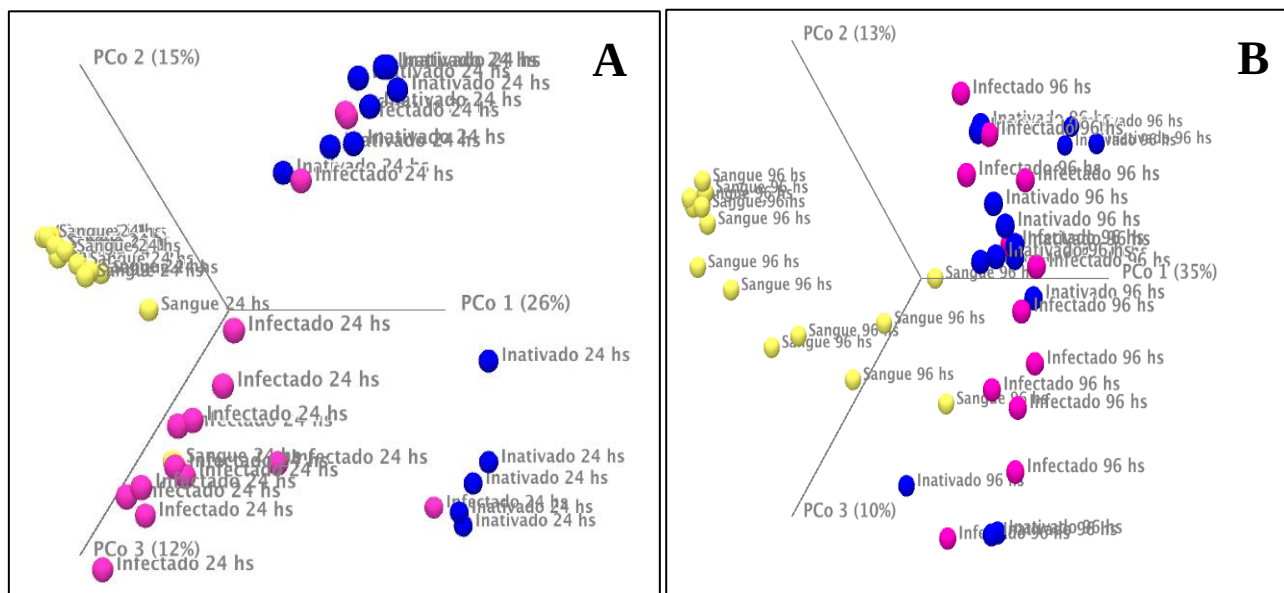


Figura 32. A) Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentados com sangue, infectados com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor, após intestino ter sido dissecado com 24 horas. Sangue: amarelo, DENV-4: rosa e DENV-4 inativado: azul. **B)** Análise de beta da diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentados com sangue, infectados com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor, após intestino ter sido dissecado com 96 horas. Sangue: amarelo, DENV-4: rosa e DENV-4 inativado: azul.

Tabela 8. Resultados da análise estatística PERMANOVA entre diversidade da microbiota das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentados com sangue, infectados com DENV-4 e DENV-4 inativado por calor.

Grupo 1	Grupo 2	p-value	Bray-Curtis p-value*
Sangue 24h	Infectado 24h	0.00001	0.00015
Sangue 24h	Infectado 96h	0.00001	0.00015
Infectado 24h	Infectado 96h	0.00001	0.00015
Sangue 24h	Inativado 24h	0.00001	0.00015
Infectado 24h	Inativado 24h	0.00020	0.00300
Infectado 96h	Inativado 24h	0.00001	0.00015
Sangue 24h	Sangue 96h	0.00001	0.00015
Infectado 24h	Sangue 96h	0.00006	0.00090
Infectado 96h	Sangue 96h	0.00001	0.00015
Inativado 24h	Sangue 96h	0.00522	0.07830**
Sangue 24h	Inativado 96h	0.00010	0.00150
Infectado 24h	Inativado 96h	0.00001	0.00015
Infectado 96h	Inativado 96h	0.41121	1.00000**
Inativado 24h	Inativado 96h	0.00001	0.00015
Sangue 96h	Inativado 96h	0.00001	0.00015

Os agrupamentos significativos pela PERMANOVA ($p \leq 0,05$).

*Correção de Bonferroni

**Não houve diferença estatística significativa

Há cada vez mais pesquisas sobre a microbiota de insetos, devido aos efeitos observados em diversos parâmetros biológicos dos insetos como: reprodução, capacidade de transmissão de agentes etiológicos de diversas espécies, sobrevivência após infecção com uma determinada bactéria, e as relações entre hospedeiros, bactérias e agentes etiológicos. Estes estudos trazem respostas interessantes sobre os mecanismos e efeitos causados pela presença e/ou remoção da microbiota através de antibióticos, a sua diversidade em relação à localidade e também a capacidade de transmissão de vírus (Finney et al., 2015; Buck et al., 2016; Villegas et al., 2018).

Os resultados obtidos nesse estudo poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial e/ou redução da transmissão de arbovírus. A interpretação destes dados ainda é desafiadora, pois há poucos estudos que relacionam o perfil funcional da microbiota e a biologia dos insetos. Deste modo, fatores moduladores da diversidade da microbiota, como a dieta, a idade ou estágio de desenvolvimento possuem implicações na diversidade bacteriana presente no intestino dos mosquitos.

5. CONCLUSÕES

Os moduladores da diversidade da microbiota, como a dieta, sexo e estágio de desenvolvimento possuem implicações na diversidade bacteriana presente no intestino dos mosquitos. Os estágios de desenvolvimento têm efeito direto nas alterações da microbiota intestinal do mosquito *Ae. aegypti*, enquanto a microbiota de machos e fêmeas apresenta diferenças, independentes da dieta. O fator dieta influencia significativamente na alteração da microbiota, uma vez que a alimentação sanguínea reduz a diversidade da microbiota intestinal. A alimentação sanguínea infectada com partículas virais DENV-4 causou alterações na microbiota. Os mosquitos infectados com DENV-4 tiveram microbiota mais semelhante com o grupo inativado após 96 horas de ingestão do alimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of virology*, 69(2), 695-700.

Allonso, D., Belgrano, F. S., Calzada, N., Guzmán, M. G., Vázquez, S., & Mohana-Borges, R. (2012). Elevated serum levels of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in dengue-infected patients are associated with disease symptoms and secondary infection. *Journal of clinical virology*, 55(3), 214-219.

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

Araújo, A. P., Diniz, D. F. A., Helvecio, E., De Barros, R. A., De Oliveira, C. M. F., Ayres, C. F. J., & Silva-Filha, M. H. N. L. (2013). The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasites & vectors*, 6(1), 297.

Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, 21(12), 568-572.

Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 543-546.

- Bahia, A. C., Dong, Y., Blumberg, B. J., Mlambo, G., Tripathi, A., BenMarzouk-Hidalgo, O. J., & Dimopoulos, G. (2014). Exploring Anopheles gut bacteria for Plasmodium blocking activity. *Environmental microbiology*, 16(9), 2980-2994.
- Balmaseda, A., Hammond, S. N., Pérez, L., Tellez, Y., Saborío, S. I., Mercado, J. C., ... & Rocha, C. (2006). Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(3), 449-456.
- Bando, H., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Badolo, A., Aonuma, H., Nelson, B., & Kanuka, H. (2013). Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in Anopheles mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Scientific reports*, 3, 1641.
- Bauer, M. A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2018). Microbial wars: competition in ecological niches and within the microbiome. *Microbial cell*, 5(5), 215.
- Beerntsen, B. T., James, A. A., & Christensen, B. M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 115-137.
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *Journal of medical entomology*, 50(2), 317-325.
- Bennett, K. E., Olson, K. E., de Lourdes Muñoz, M., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J. A., Higgs, S., & Beaty, B. J. (2002). Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67(1), 85-92.
- Bennett, K. L., Gómez-Martínez, C., Chin, Y., Saltonstall, K., McMillan, W. O., Rovira, J. R., & Loaiza, J. R. (2019). Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., & Myers, M. F. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504.
- Black IV, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M., & Beaty, B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of medical research*, 33(4), 379-388.
- Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., & Morlais, I. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS pathogens*, 8(5).

Bonizzoni, M., Dunn, W. A., Campbell, C. L., Olson, K. E., Dimon, M. T., Marinotti, O., & James, A. A. (2011). RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. *BMC genomics*, 12(1), 82.

Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., ... & Hay, S. I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(8), e1760.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. (2020). Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, *chikungunya* e Zika), Semana Epidemiológica 1 a 29.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. (2019a). Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, *chikungunya* e Zika), Semana Epidemiológica 5.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. (2019b). Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, *chikungunya* e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 34.

Buck, M., Nilsson, L. K., Brunius, C., Dabiré, R. K., Hopkins, R., & Terenius, O. (2016). Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.

Burke, D. S., & Monath, T. P. (2001). Flaviviruses. Fields BN, Knipe DM, Howley PM eds. *Fields Virology*.

Calado, D. C., & Navarro-Silva, M. A. (2002). Influência da temperatura sobre a longevidade, fecundidade e atividade hematofágica de *Aedes albopictus* (Stegomyia) Skuse, 1894 (Diptera, Culicidae) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, 46(1), 93-98.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., & Gormley, N. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621.

Carabali, M., Hernandez, L. M., Arauz, M. J., Villar, L. A., & Ridde, V. (2015). Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. *BMC infectious diseases*, 15(1), 301.

Carpenter, S. J., & La Casse, W. J. (1974). *Mosquitoes of North America (North of Mexico)*. Univ of California Press.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). West Nile virus in the United States: guidelines for surveillance, prevention, and control (4th revision).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). Surveillance and control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States. Retrieved February, 7, 2016.

Charan, S. S., Pawar, K. D., Gavhale, S. D., Tikhe, C. V., Charan, N. S., Angel, B., Shouche, Y. S. (2016). Comparative analysis of midgut bacterial communities in three aedine mosquito species from dengue-endemic and non-endemic areas of Rajasthan, India. *Medical and veterinary entomology*, 30(3), 264-277.

Charan, S. S., Pawar, K. D., Severson, D. W., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. (2013). Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. *Parasitology research*, 112(7), 2627-2637.

Chatzidaki-Livanis, M., Coyne, M. J., Roelofs, K. G., Gentyala, R. R., Caldwell, J. M., & Comstock, L. E. (2017). Gut symbiont *Bacteroides fragilis* secretes a eukaryotic-like ubiquitin protein that mediates intraspecies antagonism. *MBio*, 8(6).

Chavshin, A. R., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Pourmand, M. R., Raeisi, A., & Terenius, O. (2014). Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles culicifacies*, a first step in a paratransgenesis approach. *Parasites & vectors*, 7(1), 419.

Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., ... & Failloux, A. B. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004543.

Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M., & Dimopoulos, G. (2011a). Natural microbe-mediated refractoriness to Plasmodium infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332(6031), 855-858.

Cirimotich, C. M., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2011b). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell host & microbe*, 10(4), 307-310.

Clemens, A. N. (1992). *The Biology of Mosquitoes. Development, Nutrition and Reproduction*, Vol. 1. London: Chapman and Hall.

Clements, A. N. (2000). *The Biology of Mosquitoes, Volume 1. Development, Nutrition and Reproduction*, Vol. 2. Oxfordshire: CABI Publishing

Coatsworth, H., Caicedo, P. A., Van Rossum, T., Ocampo, C. B., & Lowenberger, C. (2018). The composition of midgut bacteria in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) that are naturally susceptible or refractory to dengue viruses. *Journal of Insect Science*, 18(6), 12.

Coffey, L. L., Vasilakis, N., Brault, A. C., Powers, A. M., Tripet, F., & Weaver, S. C. (2008). Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 6970-6975.

Coleman, J., Juhn, J., & James, A. A. (2007). Dissection of midgut and salivary glands from *Ae. aegypti* mosquitoes. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (5), e228.

Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016). Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 9(1), 375.

Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular ecology*, 23(11), 2727-2739.

Crean, A. J., Monro, K., & Marshall, D. J. (2011). Fitness consequences of larval traits persist across the metamorphic boundary. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65(11), 3079-3089.

Dada, N., Jumas-Bilak, E., Manguin, S., Seidu, R., Stenström, T. A., & Overgaard, H. J. (2014). Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. *Parasites & vectors*, 7(1), 391.

Dalla Bona, A. C., Twerdochlib, A. L., & Navarro-Silva, M. A. (2011). Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 51(2), 107-111.

David, J. P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A., & Paine, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120429.

David, M. R., Santos, L. M. B. D., Vicente, A. C. P., & Maciel-de-Freitas, R. (2016). Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(9), 577-587.

De Block, M., & Stoks, R. (2005). Fitness effects from egg to reproduction: bridging the life history transition. *Ecology*, 86(1), 185-197.

De Paula, S. O., & Fonseca, B. A. L. D. (2004). Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(6), 390-398.

Decker, K. D. (2012). Dengue fever: re-emergence of an old virus. *The Journal for Nurse Practitioners*, 8(5), 389-393.

Dennison, N. J., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current opinion in insect science*, 3, 6-13.

Dheilly, N. M. (2014). Holobiont–Holobiont interactions: redefining host–parasite interactions. *PLoS Pathog*, 10(7), e1004093.

Dickson, L. B., Jiolle, D., Minard, G., Moltini-Conclois, I., Volant, S., Ghoulane, A., & Lambrechts, L. (2017). Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. *Science advances*, 3(8), e1700585.

Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 71-92.

Dong, Y., Das, S., Cirimotich, C., Souza-Neto, J. A., McLean, K. J., & Dimopoulos, G. (2011). Engineered anopheles immunity to Plasmodium infection. *PLoS pathogens*, 7(12).

Dong, Y., Manfredini, F., & Dimopoulos, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS pathogens*, 5(5).

Dreyer, C. S. (2015). Caracterização das respostas transcricionais e microbiomas de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* com diferentes níveis de suscetibilidade ao vírus dengue. (Tese).

Dutra, H. L. C., Rocha, M. N., Dias, F. B. S., Mansur, S. B., Caragata, E. P., & Moreira, L. A. (2016). *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell host & microbe*, 19(6), 771-774.

Farnesi, L. C., Martins, A. J., Valle, D., & Rezende, G. L. (2009). Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 124-126.

Finney, C. A., Kamhawi, S., & Wasmuth, J. D. (2015). Does the arthropod microbiota impact the establishment of vector-borne diseases in mammalian hosts?. *PLoS pathogens*, 11(4).

Floch, M. H., Ringel, Y., & Walker, W. A. (Eds.). (2016). The microbiota in gastrointestinal pathophysiology: implications for human health, prebiotics, probiotics, and dysbiosis. *Academic Press*, (21)179-183

Forattini, O. P. (1992). Ecologia, epidemiologia e sociedade. In *Ecologia, epidemiologia e sociedade*.

Forattini, O. P. (2002). Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: v. 2. In *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia*, (2),860-860.

Fundação Nacional de Saúde, & Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). (2001). Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas.

- Gaio, A., Gusmão, D. S., Santos, A. V., Berbert-Molina, M. A., Pimenta, P. F., & Lemos, F. J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(L.). *Parasites & vectors*, 4(1), 105.
- Gimonneau, G., Tchioffo, M. T., Abate, L., Boissière, A., Awono-Ambene, P. H., Nsango, S. E., et al. (2014). Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. *Infect. Genet. Evol.* 28, 715–724.
- Gonçalves, C. M. (2010). O estudo da competência vetorial das populações de *Aedes aegypti* da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao Dengue vírus 2. (Tese).
- Guedes, D. R. D. (2012). Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco. (Tese).
- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Potier, P., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 6(1), 49.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Bacci Jr, M., Berbert-Molina, M. A., & Lemos, F. J. A. (2010). Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta tropica*, 115(3), 275-281.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., & Nathan, M. B. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews microbiology*, 8(12), S7-S16.
- Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527-533.
- Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology*, 35(1), 1-21.
- Henchal, E. A., & Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*, 3(4), 376-396.
- Higa, Y., Toma, T., Tsuda, Y., & Miyagi, I. (2010). A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 63(5), 312-316.
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*, 43(1), 1-11.

- Hillyer, J. F., Schmidt, S. L., Fuchs, J. F., Boyle, J. P., & Christensen, B. M. (2005). Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular microbiology*, 7(1), 39-51.
- Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution*, 3(1), 19-28.
- Hurst, G. D., & Hutchence, K. J. (2010). Host defence: getting by with a little help from our friends. *Current Biology*, 20(18), R806-R808.
- Idris, F., Muharram, S. H., Zaini, Z., & Diah, S. (2018). Effectiveness of physical inactivation methods of dengue virus: heat-versus UV-inactivation. *bioRxiv*, 427666.
- Inácio, P., Lewinsohn, T., Carmo, R. L. D., & Hogan, D. J. (2002). Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente & sociedade*, (10), 69-83.
- Junjhon, J., Pennington, J. G., Edwards, T. J., Perera, R., Lanman, J., & Kuhn, R. J. (2014). Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *Journal of virology*, 88(9), 4687-4697.
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4294-4313.
- Kernbauer, E., Ding, Y., & Cadwell, K. (2014). An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature*, 516(7529), 94-98.
- Kim, C. H., Lampman, R. L., & Muturi, E. J. (2015). Bacterial communities and midgut microbiota associated with mosquito populations from waste tires in East-Central Illinois. *Journal of medical entomology*, 52(1), 63-75.
- Kirchman, D. Processes in microbial ecology. (2012).
- Knipes, D. M., C. E. Samuel, and P. Palese. (2001). Virus-host cell interactions, In D. M. Knipes and P. M. Howley (ed.). *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 134–136.
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2007). Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Current opinion in microbiology*, 10(5), 504-509.
- Kramer, L. D., & Ciota, A. T. (2015). Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Current opinion in virology*, 15, 112-118.

Laughlin, C. A., Morens, D. M., Cassetti, M. C., Costero-Saint Denis, A., San Martin, J. L., Whitehead, S. S., & Fauci, A. S. (2012). Dengue research opportunities in the Americas. *The Journal of infectious diseases*, 206(7), 1121-1127.

Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127-128.

Lima-Camara, T. N., Bruno, R. V., Luz, P. M., Castro, M. G., Lourenço-de-Oliveira, R., Sorgine, M. H., & Peixoto, A. A. (2011). Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*, 6(3), e17690.

Lindenbach, B. D., Thiel, H. J., Rice, C. M., Thiel, H., Rice, C., & Chanock, R. M. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication.

Lindh JM, Borg-Karlson AK, Faye I. Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta Trop*. 2008; 107(3):242-50.

Liu, L., Gong, T., Tao, W., Lin, B., Li, C., Zheng, X., & Zhou, R. (2019). Commensal viruses maintain intestinal intraepithelial lymphocytes via noncanonical RIG-I signaling. *Nature immunology*, 20(12), 1681-1691.

Lorenzi, O. D. (2016). Reduced incidence of Chikungunya virus infection in communities with ongoing *Aedes aegypti* mosquito trap intervention studies—Salinas and Guayama, Puerto Rico, November 2015–February 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65.

Lourenço-de-Oliveira, R., Vazeille, M., De Filippis, A. M. B., & Failloux, A. B. (2004). *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(1), 43-54.

Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME journal*, 5(2), 169-172.

Maciel-de-Freitas, R., Koella, J. C., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2011). Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(8), 452-458.

Madani, T. A., Abuelzein, E. T. M., Azhar, E. I., & Al-Bar, H. M. (2014). Thermal inactivation of Alkhumra hemorrhagic fever virus. *Archives of virology*, 159(10), 2687-2691.

Malavige, G., Fernando, S., Fernando, D. J. (2007). Dengue viral infectious. *Postgrad Med J*, (80), 588-601.

Mancini, M. V., Damiani, C., Accoti, A., Tallarita, M., Nunzi, E., Cappelli, A., Bozic, J., Catanzani, R., Rossi, R., Valzano, M., Serrao, A., Ricci, I., & Spaccapelo, R. (2018). Estimating bacteria diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing. *BMC microbiology*, 18(1), 1-10.

Manly, B. F. J., Navarro, J. A. (2016). Multivariate statistical methods: a *primer*, 4ª edição.

Manrique-Saide, P., Che-Mendoza, A., Barrera-Perez, M., Guillermo-May, G., Herrera-Bojorquez, J., Dzul-Manzanilla, F., & McCall, P. J. (2015). Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 21(2), 308.

Martínez, N. E., Dzul-Manzanilla, F., Gutiérrez-Castro, C., Ibarra-López, J., Bibiano-Marín, W., López-Damián, L., & Manrique-Saide, P. (2014). Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 30(2), 143-146.

Massonnet-Bruneel, B., Corre-Catelin, N., Lacroix, R., Lees, R. S., Hoang, K. P., Nimmo, D., & Reiter, P. (2013). Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS One*, 8(5).

Miller, B. R. (1987). Increased yellow fever virus infection and dissemination rates in *Aedes aegypti* mosquitoes orally exposed to freshly grown virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6), 1011-1012.

Minard, G., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., & Valiente Moro, C. (2013). Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 63-73.

Minard, G., TRAN, F. H., Goubert, C., Bellet, C., Lambert, G., Khanh, H. K. L., & Valiente Moro, C. (2015). French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Frontiers in Microbiology*, 6, 970.

Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, 6(1), 146.

Minard, G., Tran, F. H., Van Tran Van, C. F., Potier, P., Roiz, D., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2018). Shared larval rearing environment, sex, female size and genetic diversity shape *Ae. albopictus* bacterial microbiota. *PloS one*, 13(4).

- Mitraka, E., Stathopoulos, S., Siden-Kiamos, I., Christophides, G. K., & Louis, C. (2013). Asaia accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. *Pathogens and global health*, 107(6), 305-311.
- Moll, R. M., Romoser, W. S., Modrakowski, M. C., Moncayo, A. C., & Lerdthusnee, K. (2001). Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of medical entomology*, 38(1), 29-32.
- Monath, T. P. (1994). Yellow fever and dengue - the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. In *Seminars in virology* (5)2, 133-145. Academic Press.
- Montagna, M., Chouaia, B., Mazza, G., Prosdocimi, E. M., Crotti, E., Mereghetti, V., ... & Cervo, R. (2015). Effects of the diet on the microbiota of the red palm weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). *PloS one*, 10(1).
- Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2012). Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol*, 8(12), e1002808.
- Moro, C. V., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2013). Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC microbiology*, 13(1), 70.
- Mukherjee, D., Das, S., Begum, F., Mal, S., & Ray, U. (2019). The mosquito immune system and the life of dengue virus: what we know and do not know. *Pathogens*, 8(2), 77.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.
- Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67-70.
- Muturi, E. J., Ramirez, J. L., Rooney, A. P., & Kim, C. H. (2018). Comparative Analysis of Gut Microbiota of *Culex restuans* (Diptera: Culicidae) Females From Different Parents. *Journal of medical entomology*, 55(1), 163-171.
- Nunes, T. B. (2018). Estudo funcional da via PI3K/AKT em *Aedes aegypti*. (Tese).
- Obbard, D. J., & Dudas, G. (2014). The genetics of host-virus coevolution in invertebrates. *Current opinion in virology*, 8, 73-78.
- Oda, L. T. E (2018). Estudo das análises da competência vetorial e associação global do genoma em mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu infectados com Dengue vírus. (Tese).
- Oliveira, R. L. D. (2015). Biologia e comportamento do vetor. In *Dengue: teorias e práticas* (pp. 75-92).

Ormaetxe, I., Walker, T., & O'Neill, S. L. (2011). Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO reports*, 12(6), 508-518.

Osei-Poku, J., Mbogo, C. M., Palmer, W. J., & Jiggins, F. M. (2012). Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Molecular ecology*, 21(20), 5138-5150.

Pasakinskiene, I., & Paplauskiene, V. (1999). Floral meristems as a source of enhanced yield and quality of DNA in grasses. *Plant Cell Reports*, 18(6), 490-492.

Pinto Junior, V. L., Luz, K., Parreira, R., & Ferrinho, P. (2015). Vírus Zika: revisão para clínicos. *Acta Médica Portuguesa*, 760-765.

Pitisuttithum, P., & Bouckenooghe, A. (2016). The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection.

Poloni, T. R. R. S. (2009). *Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real*. (Dissertação).

Raharimalala, F. N., Boukraa, S., Bawin, T., Boyer, S., & Francis, F. (2016). Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitology research*, 115(4), 1391-1399.

Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(3), e1561.

Rothman, A. L. (2020). Transcriptional and clonal characterization of B cell plasmablast diversity following primary and secondary natural DENV infection. *EBioMedicine*, 54(1), 1-14.

Richards, S. L., Pesko, K., Alto, B. W., & Mores, C. N. (2007). Reduced infection in mosquitoes exposed to blood meals containing previously frozen flaviviruses. *Virus research*, 129(2), 224-227.

Ricklefs, R. E. (2010). *A Economia da Natureza*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Ritchie, S. A., Rapley, L. P., & Benjamin, S. (2010). *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(6), 1053-1059.

Robinson, A. S., Franz, G., & Atkinson, P. W. (2004). Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(2), 113-120.

Rocco, I. M., Kavakama, B. B., & Santos, C. L. S. (2001). First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(1), 55-57.

Rodgers, F. H., Gendrin, M., Wyer, C. A., & Christophides, G. K. (2017). Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS pathogens*, 13(5), e1006391.

Romoser, W. S., Moll, R. M., Moncayo, A. C., & Lerdthusnee, K. (2000). The occurrence and fate of the meconium and meconial peritrophic membranes in pupal and adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 37(6), 893-896.

Rosselló-Móra, R. (2012). Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Environmental microbiology*, 14(2), 318-334.

Rosso, F., Tagliapietra, V., Albanese, D., Pindo, M., Baldacchino, F., Arnoldi, D., & Rizzoli, A. (2018). Reduced diversity of gut microbiota in two *Aedes* mosquitoes species in areas of recent invasion. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.

Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, 7(1), 9.

Santos, N. S. D. O., Romanos, M. T. V., & Wigg, M. D. (2008). *Introdução À Virologia Humana*. Grupo Gen-Guanabara Koogan.

Scolari, F., Casiraghi, M., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes* spp. and their microbiota: a review. *Frontiers in microbiology*, 10, 2036.

Seabourn, P., Spafford, H., Yoneishi, N., & Medeiros, M. (2020). The *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) microbiome varies spatially and with Ascogregarine infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(8), e0008615.

Sedda, L., Vilela, A. P. P., Aguiar, E. R. G. R., Gaspar, C. H. P., Gonçalves, A. N. A., Olmo, R. P., Kroon, E. G. (2018). The spatial and temporal scales of local dengue virus transmission in natural settings: a retrospective analysis. *Parasites & vectors*, 11(1), 79.

Segata, N., Baldini, F., Pompon, J., Garrett, W. S., Truong, D. T., & Dabiré, R. K. The reproductive tracts of two malaria vectors are populated by a core microbiome and by gender-and swarm-enriched microbial biomarkers. *Sci Rep*. 2016; 6: 24207.

Serufo, J. C., Nobre, V., Rayes, A., Marcial, T. M., & Lambertucci, J. R. (2000). Dengue: uma nova abordagem. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(5), 465-476.

Schloss, P. D., & Westcott, S. L. (2011). Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(10), 3219-3226.

Silveira, L. T. C., Tura, B., & Santos, M. (2019). Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC infectious diseases*, 19(1), 750.

Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J. L., Kang, S., Romero-Vivas, C. M., Mohammed, H., & Dimopoulos, G. (2013). Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(7), e2295.

Song, H., Li, J., Shi, S., Yan, L., Zhuang, H., & Li, K. (2010). Thermal stability and inactivation of hepatitis C virus grown in cell culture. *Virology journal*, 7(1), 40.

Sousa, N. A., Lobo, L. S., Rodrigues, J., & Luz, C. (2013). New insights on the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. *Letters in applied microbiology*, 57(3), 193-199.

Souza, L. J. D., Ronald, C., & Lopes, A. C. (2002). Aspectos clínicos da dengue: novos conceitos. *Rev Bras Clin Terap*, 28(2), 46-52.

Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 67, 191-209.

Stackebrandt, E., & GOEBEL, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.

Tabachnick, W. J. (2013). Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *International journal of environmental research and public health*, 10(1), 249-277.

Takken, W., & Verhulst, N. O. (2013). Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual review of entomology*, 58, 433-453.

Tanaka, M. (1993). Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, 41(3), 311-322.

Tchankouo-Nguetcheu, S., Khun, H., Pincet, L., Roux, P., Bahut, M., Huerre, M., ... & Choumet, V. (2010). Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PloS one*, 5(10), e13149.

Tchioffo, M. T., Boissiere, A., Churcher, T. S., Abate, L., Gimonneau, G., Nsango, S. E., ... & Morlais, I. (2013). Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria. *Plos one*, 8(12).

Teixeira, M. G., Costa, M. D. C. N., Barreto, F., & Barreto, M. L. (2009). Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de saúde pública*, 25, S7-S18.

Terenius, O., Lindh, J. M., Eriksson-Gonzales, K., Bussière, L., Laugen, A. T., Bergquist, H., & Faye, I. (2012). Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 556-565.

Trabulsi, L. R., & Alterthum, F. (2005). Microbiologia. In *Microbiologia*.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 60(2), 407-438.

Vasilakis, N., Forrester, N. L., Palacios, G., Nasar, F., Savji, N., Rossi, S. L., ... & González, A. V. (2013). Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *Journal of virology*, 87(5), 2475-2488.

Vikram, K., Nagpal, B. N., Pande, V., Srivastava, A., Saxena, R., Singh, H., ... & Richard, P. (2015). Detection of dengue virus in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Delhi, India. *Journal of vector borne diseases*, 52(2), 129.

Villegas, L. E., Campolina, T. B., Barnabe, N. R., Orfano, A. S., Chaves, B. A., Norris, D. E., & Secundino, N. F. (2018). Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. *PloS one*, 13(1).

Wang, Y., Gilbreath III, T. M., Kukutla, P., Yan, G., & Xu, J. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS one*, 6(9), e24767.

Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, 27(11), 514-522.

Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Sigstam, T., Bosshard, F., & Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental science & technology*, 46(21), 12069-12078.

World Health Organization (WHO). (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition.

World Health Organization (WHO). (2012). Handbook for integrated vector management.

World Health Organization (WHO). (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. França.

World Health Organization (WHO). (2016). Mosquito control: can it stop Zika at source. Geneva.

World Health Organization (WHO). (2020). Dengue and severe dengue. Geneva.

Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*, 4(7), e1000098.

Yadav, K. K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H. K., Prasad, G. B. K. S., & Veer, V. (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites & vectors*, 8(1), 641.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.

Zara, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 391-404.

Zhu, J., Chen, L., & Raikhel, A. S. (2003). Posttranscriptional control of the competence factor β FTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13338-13343.

Zink, S. D., Van Slyke, G. A., Palumbo, M. J., Kramer, L. D., & Ciota, A. T. (2015). Exposure to West Nile virus increases bacterial diversity and immune gene expression in *Culex pipiens*. *Viruses*, 7(10), 5619-5631.

Zouache, K., Michelland, R. J., FAILLOUX, A. B., Grundmann, G. L., & Mavingui, P. (2012). Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular Ecology*, 21(9), 2297-2309.

Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H. R., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 377-389.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1: Lista de *primers reverse* para cada amostra.

<i>Primer</i>	<i>Adaptador</i>	<i>Index</i>	<i>Estabilizadores</i>	<i>Específica 16S rRNA</i>
0	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	TCCCTTGTCTCC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	ACGAGACTGATT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GCTGTACGGATT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	ATCACCAGGTGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
4	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	TGGTCAACGATA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	ATCGCACAGTAA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GTCGTGTAGCCT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AGCGGAGGTTAG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	ATCCTTTGGTTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
9	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	TACAGCGCATAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
10	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	ACCGGTATGTAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
11	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AATTGTGTCGGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
12	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	TGCATACACTGG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
13	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AGTCGAACGAGG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
14	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	ACCAGTGACTCA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
15	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GAATACCAAGTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GTAGATCGTGTA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
17	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	TAACGTGTGTGC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
18	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CATTATGGCGTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
19	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CCAATACGCCTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
20	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GATCTGCGATCC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
21	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CAGCTCATCAGC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
22	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CAAACAACAGCT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
23	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GCAACACCATCC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
24	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GCGATATATCGC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
25	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CGAGCAATCCTA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
26	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AGTCGTGCACAT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
27	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GTATCTGCGCGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
28	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CGAGGGAAAGTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
29	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CAAATTTCGGGAT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
30	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AGATTGACCAAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
31	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AGTTACGAGCTA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

32	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GCATATGCACTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
33	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CAACTCCCGTGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
34	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TTGCGTTAGCAG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
35	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TACGAGCCCTAA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
36	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CACTACGCTAGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
37	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGCAGTCCTCGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
38	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACCATAGCTCCG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
39	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TCGACATCTCTT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
40	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GAACACTTTGGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
41	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GAGCCATCTGTA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
42	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TTGGGTACACGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
43	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AAGGCGCTCCTT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
44	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TAATACGGATCG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
45	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TCGGAATTAGAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
46	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGTGAATTCGGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
47	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CATTTCGTGGCGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
48	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TACTACGTGGCC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
49	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GGCCAGTTCCTA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
50	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GATGTTTCGCTAG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
51	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CTATCTCCTGTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
52	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACTCACAGGAAT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
53	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ATGATGAGCCTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
54	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTCGACAGAGGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
55	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGTCGCAAATAG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
56	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CATCCCTCTACT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
57	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TATACCGCTGCG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
58	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGTTGAGGCATT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
59	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACAATAGACACC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
60	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CGGTCAATTGAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
61	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTGGAGTCTCAT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
62	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GCTCGAAGATTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
63	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGGCTTACGTGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
64	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TCTCTACCACTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
65	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACTTCCAAC TTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
66	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CTCACCTAGGAA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
67	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTGTTGTCGTGC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

68	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CCACAGATCGAT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
69	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TATCGACACAAG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
70	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GATTCCGGCTCA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
71	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CGTAATTGCCGC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
72	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GGTGACTAGTTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
73	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ATGGGTTCCTGC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
74	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TAGGCATGCTTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
75	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AACTAGTTCAGG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
76	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ATTCTGCCGAAG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
77	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGCATGTCCCGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
78	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTACGATATGAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
79	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTGGTGGTTTCC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
80	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TAGTATGCGCAA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
81	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGCGCTGAATGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
82	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ATGGCTGTCTAGT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
83	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTTCTCTTCTCG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
84	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CGTAAGATGCCT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
85	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GCGTTCTAGCTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
86	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GTTGTTCTGGGA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
87	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GGACTTCCAGCT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
88	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CTCACAACCGTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
89	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CTGCTATTCCCTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
90	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ATGTCACCGCTG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
91	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGTAACGCCGAT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
92	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGCAGAACATCT	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
93	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGGAGTAGGTGG	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
94	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TTGGCTCTATTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
95	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	GATCCACGTAC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
96	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TACCGCTTCTTC	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
97	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TGTGCGATAACA	AGTCAGTCAGCC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Tabela Suplementar 2: Lista de amostras quantificadas por RT-qPCR, grupos controle, infectado com DENV-4, infectado com DENV-4 inativado e valores de Ct.

Nomes das amostras	Grupos	Valores de Ct
1	Controle	34,21
2	Controle	34,18
3	Controle	33,12
4	Controle	35,24
5	Controle	34,35
6	Controle	35,06
7	Controle	33,97
8	Controle	34,68
9	Controle	34,87
10	Controle	35,64
11	Infectado DENV-4	12,21
12	Infectado DENV-4	11,14
13	Infectado DENV-4	15,38
14	Infectado DENV-4	12,83
15	Infectado DENV-4	13,76
16	Infectado DENV-4	12,14
17	Infectado DENV-4	11,09
18	Infectado DENV-4	12,76
19	Infectado DENV-4	13,86
20	Infectado DENV-4	12,64
21	Inativado DENV-4	26,88
22	Inativado DENV-4	26,21
23	Inativado DENV-4	25,92
24	Inativado DENV-4	26,57
25	Inativado DENV-4	24,78
26	Inativado DENV-4	29,11
27	Inativado DENV-4	27,74
28	Inativado DENV-4	22,24
29	Inativado DENV-4	28,34
30	Inativado DENV-4	26,46

Tabela Suplementar 3: Lista de OTUs compartilhadas entre os estágios larvais e desenvolvimento.

Grupos compartilhados	Nº de OTUs compartilhadas	Nomes OTUs
L2-L3-L4	33	JX993406.1.1200 AB845279.1.1381 DQ840461.1.1308 AY695720.1.1387 HF572853.1.1272 DQ803169.1.1336 EU706241.1.1234 ASYG01000021.3312.4808 GQ379479.1.1204 HG799952.1.1818 JQ410812.1.1518

24h-48h-72h-96h-R.E

89

FJ390462.1.1455
EF010981.1.1437
JF197092.1.1371
DQ813307.1.1471
GU724598.1.1386
GU814629.1.1332
HM438647.1.1489
FJ976568.1.1388
EU461679.1.1414
JF830187.1.1508
JQ888298.1.1343
AY856847.1.1449
EU921464.1.1445
EU236315.1.1340
HM314278.1.1366
AB745642.1.1507
GU451187.1.1380
KC734136.1.1421
JQ659914.1.1440
AB696425.1.1468
GQ007953.1.1342
AJ275037.1.1439
EU730987.1.1454
JF706531.1.1366
HF572853.1.1272
EU706241.1.1234
JQ469832.1.1404
JN380992.1.1362
HG799952.1.1818
HM252934.1.1378
FJ390462.1.1455
JQ466170.1.1381
GU724598.1.1386
KF280301.1.1435
JQ448766.1.1407
EU704736.1.1232
KF010745.1.1485
EU461679.1.1414
EU704796.1.1279
AB178401.1.1409
EU475209.1.1402
HM314278.1.1366
KF188943.1.1289
HM248444.1.1359
AB745425.1.1505
AB845279.1.1381
FJ557924.1.1338
KF909220.1.1263

DQ796445.1.1306
DQ525591.1.1423
EU776140.1.1362
EU432170.1.1461
ASYG01000021.3312.4808
DQ813307.1.1471
GU826686.1.1256
HM438647.1.1489
KF464600.1.1265
FJ375487.1.1458
DQ192213.1.1346
FJ529916.1.1390
JQ468513.1.1420
AB508873.1.1440
JF163110.1.1353
GQ175352.1.1426
HE855909.1.1498
KC000258.1.1363
EU921464.1.1445
EF441885.1.1322
EU536498.1.1387
DQ801607.1.1348
JN391862.1.1500
GU553031.1.1504
FJ418771.1.1463
JX993406.1.1200
FJ375362.1.1346
FJ976568.1.1388
KC734243.1.1310
AB114256.1.1414
JQ665442.1.1351
HF572851.1.1257
HQ377322.1.1290
AB745642.1.1507
EF667914.1.1483
KC163803.1.1266
GQ007953.1.1342
AJ275037.1.1439
HM480364.1.1429
GU339282.1.1496
KC160761.1.1483
HM556150.1.1341
KF385053.1.1517
HE583162.1.1377
GQ867408.1.1451
FJ644573.1.1358
EU790196.1.1206
JX644294.1.1456

AY865607.1.1415
EF010981.1.1437
JX094902.1.1456
DQ232424.1.1327
EU767274.1.1360
JT845935.1.1202
AY856847.1.1449
AMQL01000001.12248.13793
KC311745.1.1399
JQ958876.1.1408
KF010706.1.1446
KF054789.1.1484
ADEN01000012.3720.5257
KC734136.1.1421
AB062283.1.1345
